

固定化青霉菌吸附活性艳蓝 KN-R 的脱色研究

董新姣*,周国玲 (温州大学生命与环境科学学院,浙江 温州 325027)

摘要: 利用植物载体玉米芯对青霉菌X5进行了固定化研究.通过正交试验确定载体固定化真菌的最优条件,考察了pH值、温度、盐浓度、葡萄糖浓度对菌株脱色的影响.结果表明,菌量为8g/L,载体大小为 $1/3 \times 1 \text{cm}^2 \times \pi \times 1 \text{cm}$,载体个数为15个,摇床转速为100r/min条件下玉米芯能够有效地固定菌体,固定化菌对染料脱色的最佳温度为30℃,pH值为3.0,葡萄糖浓度为10g/L,盐度对脱色有一定的影响,在最优条件下,固定化菌对活性艳蓝KN-R脱色率达到95%以上.固定化菌对活性艳蓝脱色符合二级动力学方程,生物吸附过程较好地符合Freundlich吸附模型,固定化菌体重复利用5次后,脱色率仍达73.51%.

关键词: 染料脱色; 青霉菌; 固定化; 植物载体

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2005)04-0494-05

Study on decolorization of reactive brilliant blue KN-R by the adsorption of immobilized *Penicillium jensenii*.
DONG Xin-jiao*, ZHOU Guo-ling (School of Life and Environmental Science, Wenzhou University, Wenzhou 325027, China). *China Environmental Science*, 2005,25(4): 494~498

Abstract: The immobilization studies on the *penicillium jensenii* was carried out utilizing plant-carrier, corn bar. The optimal condition for the strain immobilization of the medium was determined through orthogonal test. The influence of pH value, temperature, salinity and glucose concentration on the strain decolorization was investigated. The corn bar could immobilize effectively the strain under the conditions of the strain weight of 8g/L, the carrier size of $1/3 \times 1 \text{cm}^2 \times \pi \times 1 \text{cm}$, the carrier number of 15, the shaker speed of 100r/min; the optimum temperature and pH value were 30℃ and 3.0, the concentration of glucose was 10mg/L for the dye decolorization of immobilized strain; the concentration of salinity had definite influence on decolorization; the decolorization rate of the immobilized strain on reactive brilliant blue KN-R reached above 95% under the optimum condition, conforming to second-order dynamic equation. The bioadsorption process conformed relatively good to Freundlich adsorption model. The decolorization rate of the immobilized strain after reused for five times could still reach 73.51%.

Key words: dye decolorization; *penicillium jensenii*; immobilization; plant carrier

固定化菌技术处理化学工业废水具有许多优点.近年来,被用于制作固定化细胞^[1,2]的载体,主要集中在有机材料方面^[3-5].由于天然载体和有机载体在制作中分别存在机械强度低、易被微生物分解和对固定化微生物细胞的毒害作用、交联不容易和固定化颗粒易发生粘联等缺陷,应用前景不容乐观.因此,寻求新的固定化载体是十分必要的.植物载体来源广泛、价格低廉、具有较好吸附性能,在菌的固定化技术的研究以及利用真菌技术进行废水处理的实际应用方面,具有特殊的意义和潜在的价值,引起国内外关注^[6,7].本研究利用植物载体玉米芯对 1 株高效染料脱色青霉菌 X5 进行固定化,考察温度、pH 值、盐浓

度、碳源浓度等因素对活性艳蓝 KN-R 染料脱色的影响,确定了最优操作条件.同时研究载体的重复利用情况以及载体固定化脱色动力学,为开发新的载体材料用于染料废水的生物治理提供新的途径.

1 材料与方法

1.1 材料

玉米芯用自来水浸泡1h,加工成半径为1cm、

收稿日期: 2004-10-14

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(Y504233);浙江省教育厅科研基金资助项目(20040611)

* 责任作者, 副教授, xjdong@mail.wzptt.zj.cn

高为1cm的圆柱片,置于50℃的烘箱中烘干, 保存备用.

查氏培养基(g):NaNO₃ 2, K₂HPO₄ 1, KCl 0.5, MgSO₄ 0.5, FeSO₄ 0.01,蔗糖30,琼脂15~20.水1000mL,自然pH值.

马丁氏培养基(g):KH₂PO₄ 1,MgSO₄·7H₂O 0.5,蛋白胨5,葡萄糖10.水1000mL,自然pH值.

染料培养基:在马丁氏培养基中加入 100mg 的 KN-R.

青霉菌 X5:本实验室筛选、分离、保藏,经鉴定为詹青青霉(*Penicillium jensenii*).

1.2 方法

1.2.1 孢子悬浮液的制备 将青霉菌接种在查氏固体培养基斜面上,30℃培养 3d 后,加入适量无菌水用接种环将斜面上的孢子刮下,制成孢子悬浮液并用振荡器使其分散,4℃保存. 用血球记数法测定其浓度为 7.15×10⁷ 个/mL.

1.2.2 菌株的载体固定和脱色体系 在 100mL 的培养液中加入 15 块体积为 1/3×1cm²×π×1cm 的圆片,再加入 1mL 孢子悬浮液,置于摇床中,在 30℃, 100r/min 下振荡培养 3d,取出固定化菌体,再转移到含染料培养基中,于 30℃, 100r/min 下进行摇床脱色试验.

1.2.3 脱色率的测定 脱色 12h 后,取培养液的上清液,在 8000r/min 的转速下离心 10min,在染料最大吸收波长 594nm 处以不接菌染料溶液为对照,以蒸馏水为空白,测定光密度(OD)值,并按以下公式计算脱色率(P).

$$P(\%)=(A_0-A_1)/A_0\times100\%$$

式中:A₀ 为不接菌液的 OD 值;A₁ 为接菌染料的 OD 值.

1.2.4 影响固定化细胞脱色的条件试验 碳源试验中,改变染料培养基中的葡萄糖含量,而制成葡萄糖含量依次为 0,2,4,6,8,10,15g/L 的培养液;在盐浓度试验中,改变培养基中的盐度含量分别为 0,0.5,1.0,1.5,2.0%的培养液;在 pH 值试验中,改变溶液 pH 值,制成 pH 值分别为 3.0,4.0, 5.0, 6.0,7.0,8.0,9.0 的培养液.在温度试验中,改变温度,设置分别为 20,25,30,35,40℃的培养液.

1.2.5 吸附实验 吸附动力学实验是将 15 块固定化青霉菌于 250mL 的三角瓶中,加入 100mg/L 的染料溶液 100mL,在 30℃、100r/min 的摇床中振荡,每隔 20min 取样 1 次,测定染料的终浓度.

吸附平衡实验是将 15 块固定化青霉菌分别放入 100mL 不同浓度(10~400mg/L)的活性艳蓝 KN-R 染料培养基中(初始 pH 值为 3.0),在 30℃、100r/min 的条件下进行脱色. 反应到平衡(280min)后,各取上清液在 8000r/min 离心 10min 后,分别测定染料浓度,测定吸附染料后的载体固定化真菌的干重. 计算单位吸附量(Q_e):

$$Q_e=(C_0-C_e)V/[W-(C_0-C_e)V]$$

式中:C₀为染料的初始浓度,mg/L;C_e为染料的平衡浓度,mg/L;V为溶液的体积,L;W为吸附染料后的载体固定化真菌的干重,mg.

2 结果与讨论

2.1 菌种固定化细胞最优制备条件确定

在制备固定化细胞过程中,有诸多影响固定化脱色效果的因素,其中菌的接种量、载体的大小、数目和摇床的转速是主要的影响因素,实验中采用正交试验法,利用以上 4 种因素 3 个水平 L₉(3⁴)正交表,以染料的脱色率为指标进行了最优操作条件的确定.

按照表 1 中不同因素与水平,制得 9 组固定化微生物,每组 100mL 分别加入 KN-R 初始浓度为 100mg/L 的模拟染料废水,30℃,100r/min 摇床振荡培养 12h 后.测定脱色率(表 2).

表 1 正交因素设计

Table 1 A statistical table of elements and levels				
水平	因 素			
	A	B	C	D
1	4	1/4×1 ² ×π×1	10	60
2	8	1/3×1 ² ×π×1	15	100
3	12	1/2×1 ² ×π×1	20	140

注:因素 A 为菌量(g/L),因素 B 为载体大小(cm³),因素 C 为载体个数,因素 D 为摇床转速(r/min)

表 2 正交实验数据分析

Table 2 Analysis of experiment data

序号	因 素				脱色率(%)	
	A	B	C	D	1	2
1	1	1	1	1	84.18	81.33
2	1	2	2	2	99.82	99.64
3	1	3	3	3	98.93	99.02
4	2	1	2	3	98.67	98.22
5	2	2	3	1	98.22	98.13
6	2	3	1	2	97.16	97.87
7	3	1	3	2	97.60	97.96
8	3	2	1	3	97.42	97.60
9	3	3	2	1	98.40	98.76
K1	93.82	92.99	92.59	93.17		
K2	98.04	98.47	98.92	98.34		
K3	97.96	98.36	98.31	98.31		
R	4.34	5.20	6.73	5.56		

由表 2 可知,最优方案为 A₂B₂C₂D₂,载体个数(因素 C)对结果影响最大,其次是摇床转速(因素 D)和载体大小(因素 B),相对来看,菌量对脱色结果影响最小.从 K 值看,A₂B₂C₂D₂ 为最优组合.因此制备固定化青霉菌的最优操作条件为菌量为 8g/L,载体大小为 1/3×π×1cm²×1cm,载体个数为 15 个,摇床转速为 100r/min.

2.2 温度对染料脱色的影响

由图 1 可见,玉米芯固定青霉菌吸附活性艳蓝 KN-R 的最佳温度为 30℃. 此实验结果与大多数真菌的最佳生长温度相符合,说明载体固定化青霉菌对活性艳蓝 KN-R 的吸附与其生物量存在很大的关系,也说明温度对脱色效果有较大影响.

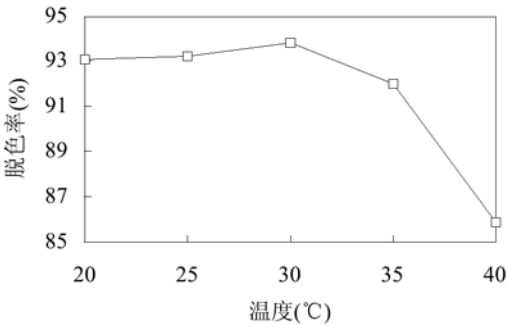


图 1 温度对活性艳蓝 KN-R 脱色率的影响
Fig.1 Effect of temperature on the decolorization of reactive brilliant blue KN-R

2.3 pH值对染料脱色的影响

由图 2 可见,最佳 pH 值为 3.0.

真菌大多偏好酸性环境,实验结果显示的最佳 pH 值也同时是真菌生长的最佳 pH 值,此结果与程永前等^[8]所做的白腐真菌对染料脱色的最佳 pH 值条件相似,但与金朝晖等^[9]所做的真菌对活性艳蓝 KN-R 的脱色条件的最佳 pH 值不同.

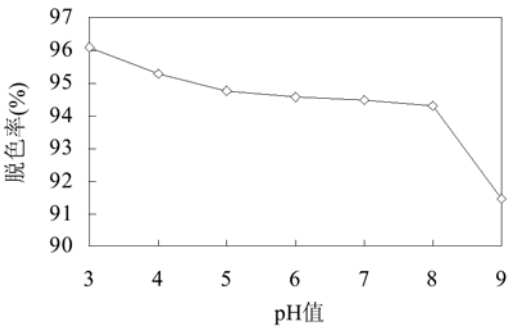


图 2 pH 值对活性艳蓝 KN-R 脱色率的影响
Fig.2 Effect of pH value on the decolorization of reactive brilliant blue KN-R

在酸性条件下,固定化青霉菌对活性艳蓝 KN-R 的脱色率比在碱性条件下要高.可能还跟活性艳蓝 KN-R 的脱色机制有关.活性艳蓝 KN-R 带有 2 个—SO₃Na,这使它具有水溶性,在水溶液中活性艳蓝 KN-R 会水解为负二价的染料阴离子和 2 个钠离子.而高浓度的 H⁺ 会使真菌表面的电负性变为电正性^[8,9],从而使真菌表面的吸附位点,如羧基、氨基、磷酸基能够有效地吸附染料负离子,并与其结合,达到脱色的目的.

2.4 盐浓度的影响

由图 3 可见,固定化真菌能在一个较大的盐浓度范围内对活性艳蓝 KN-R 进行吸附,脱色率维持在 95% 以上.实际印染或染料废水一般盐度较高,因此盐度对固定化青霉菌的作用不妨碍其工程应用.

2.5 碳源浓度的影响

由图 4 可知,最佳的葡萄糖浓度为 10g/L.

结果说明,当培养基中不加葡萄糖时,真菌因为缺乏碳源,而不能良好生长.但还有少量的生物量,可能是因为利用了玉米芯作为碳源的结果.此

时的脱色主要是玉米芯吸附的结果.而当培养基中的葡萄糖高达 10g/L 时,菌体生长加快,脱色率就迅速上升,但碳源浓度过高时反而会破坏菌体生长最佳 C/N 比,不利于菌体生长从而导致脱色率下降,但碳源浓度过高对吸附脱色的影响不大.

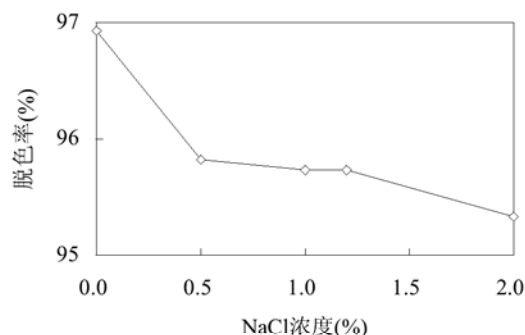


图 3 盐浓度对活性艳蓝 KN-R 脱色率的影响

Fig.3 Effect of the concentration of salt on the decolorization of reactive brilliant blue KN-R

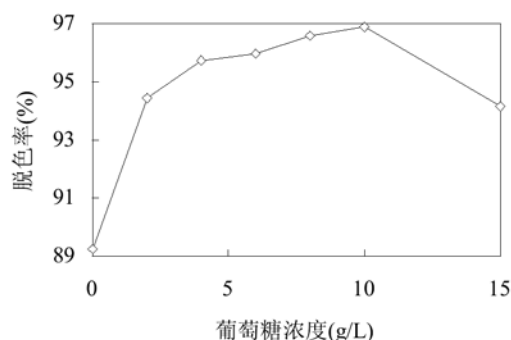


图 4 葡萄糖浓度对活性艳蓝 KN-R 脱色率的影响

Fig.4 Effect of concentration of glucose on the decolorization of reactive brilliant blue KN-R

2.6 微生物的固定化重复利用

把上述吸附过染料的载体固定化菌用甲醇洗脱,过滤后重新放入新的染料培养基中进行脱色 6h,测定脱色率.结果表明随着重复利用次数的增加,固定化青霉菌对活性艳蓝 KN-R 的脱色率呈直线下降.这可能是因为活性艳蓝 KN-R 对真菌的生长有阻碍作用,新的菌体生物量不能大量增加,而原来真菌表面的吸附位点慢慢地被利用而减少而导致脱色率的下降.但是下降的速率不是很大,第 2 次的脱色率还在 90%以上,为 92.44%.并且重复 5 次之后,脱色率仍为 73.51%.

比文献中其它菌脱色率还要高^[8].且载体固定化真菌的机械稳定性良好,此实验结果说明载体固定化真菌可用来重复吸附染料,经重复利用 5 次之后,还保持较高的脱色率,将其用于实际生产中有很潜力.

2.7 动力学试验

为了考察固定化微生物脱色的速率,做了固定化微生物对活性艳蓝 KN-R 的去除动力学曲线.由图 5 可见,大部分的染料在前 80min 被吸附,80min 之后,染料的吸附比较缓慢,到 280min 时,达到了吸附平衡.对实验数据进行分析, $1/C_t = 1/C_0 + 0.0017t$, $R^2 = 0.9795$.脱色速率符合二级动力学方程.

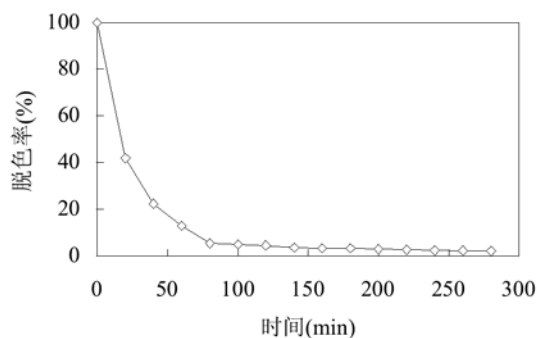


图 5 青霉菌体吸附染料的动力学曲线

Fig.5 Kinetics of dye adsorption by X5 fungus

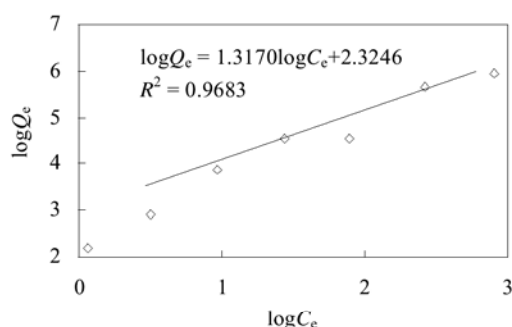


图 6 Freundlich 吸附等温模型

Fig.6 Freundlich Plot

利用固定化微生物对活性艳蓝 KN-R 等温吸附试验数据分别进行了 Langmuir 和 Freundlich 模型模拟,结果表明,真菌对活性艳蓝 KN-R 的等温吸附不符合 Langmuir 模型,而是符合 Freundlich 模型^[10](图 6).此结果说明了固定化青霉菌的吸附不是单纯的单分子层吸附而是玉

米芯和真菌复合吸附的结果.

3 结语

玉米芯可以有效地固定青霉菌,固定的青霉菌经 5 次重复后仍具有较好的脱色效果,试验结果表明固定化青霉菌受 pH 值、盐度、温度等因素影响较小,适合染料废水水质多变的特点,染料去除速率较快,动力学试验表明固定化菌体对活性艳蓝的吸附动力学符合二级动力学方程,等温吸附符合 Freundlich 模型,在废水处理领域中具有较高潜在应用价值.

参考文献:

- [1] 王建龙,施汉昌,钱 易.固定化微生物技术在难降解有机污染物治理中的研究进展 [J]. 环境科学研究,1999,12(1):60-64.
- [2] Wang X, Ruckenstein E. Immobilization of phanerochaete chrysosporium on porous polyurethane particles with application to biodegradation of 2-chlorophenol [J]. Biotech. Techniq., 1994,8(5):339-344.
- [3] Alleman R C, Logan B E, Gilbertson R L. Degradation of pentachlorophenol by fixed film of white rot fungi in rotating tube bioreactions [J]. Wat. Res., 1995,29(1):61-67.
- [4] 全向春,韩力平,王建龙.固定化皮氏伯克霍而德氏菌降解喹啉的研究 [J]. 环境科学, 2000,21(3):74-76.
- [5] Sun Yan, Li Jing, Tan Liyang. Study and comparison of a kind of microorganism and its immobilized cells for phenol degradation [J]. Research of Environmental Sciences, 1999,12(1): 1-4.
- [6] Chang Jo-shu, Chou Chien, Chen Shan-yu. Decolorization of azo dyes with immobilized *Pseudomonas luteola* [J]. Process Biochemistry, 2001,36:757-763.
- [7] Iqbal M, Zafar S I. Bioactivity of immobilized microalgal cells: Application potential of vegetable sponge in microbial biotechnology [J]. Letter in Applied Microbiology, 1993,17(6): 289-291.
- [8] 程永前,黄民生,张国莹.白腐真菌对染料脱色及降解过程机理和影响因素 [J]. 环境污染治理技术与设备,2000,1(6):25-34.
- [9] 金朝晖,柴英涛,李 铁,等.3 株真菌对活性艳蓝 KN-R 的脱色条件 [J]. 环境科学,2004,25(2):81-84.
- [10] Fu Yuzhu, Viraraghavan T. Removal of congo red from an aqueous solution by fungus *Aspergillus niger* [J]. Advances in Environmental Research, 2002,7:239-247.

作者简介: 董新姣(1966-),女,浙江东阳人,副教授,现从事环境微生物学和环境生物技术方面的研究.发表论文 40 余篇.