

响应面法优化一株链霉菌对偶氮染料 AR30 的降解脱色条件*

方继前 郭亚平** 谢练武 吴晓芙

(中南林业科技大学理学院, 长沙, 410004)

摘要 以一株对偶氮染料红 30 (AR30) 具有较强降解脱色作用的菌株 *Streptomyces* sp. FX649 为研究对象, 在单因素实验基础上, 选择染料初始浓度、培养时间、pH 与培养温度为主要因素, 采用 Box-Behnken 组合实验和响应面分析法对降解条件进行了精确优化. 经实验修正, 获得了最佳降解脱色条件, 即在染料浓度 $110 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、培养时间 36 h、pH 7.3 与培养温度 $31.3 \text{ }^\circ\text{C}$ 时该菌对染料 AR30 的降解脱色率为 95.1%.

关键词 偶氮染料, 生物降解, 响应面法.

随着现代人对色彩多样化的需求日益增大, 越来越多的化学染料被合成出来并广泛使用. 据统计, 2006 年为止全球使用的染料有 10 万多种, 而我国染料产量也达到了 69.93 万吨^[1]. 染料被广泛应用于纺织、食品、造纸、化妆品、制药等行业, 并产生了大量成分相当复杂的染料废水. 其中以含有芳环或杂环母核的偶氮染料为主染料废水, 是目前公认的难处理废水之一^[2], 对人体和环境造成了严重的危害^[3-5].

传统的物理化学处理方法如吸附、絮凝、氧化、过滤、电化学等很难将偶氮染料完全降解, 同时大都成本较高, 会带来二次污染. 相对来说, 生物处理法具有相对优势, 既处理效率高, 又无二次污染, 是经济、高效和环境友好的偶氮染料废水处理方法^[6-8]. 目前, 关于染料生物降解性能的研究报道很多, 偶氮染料的降解研究进展也很快, 已经发现可利用的微生物种类主要有真菌、细菌和藻类, 它们处理染料的机制主要是吸附和降解等^[9], 而且效果非常明显, 但是要获得最佳处理条件往往很难.

本文以一株对分散红 30 (AR30) 具有较强降解脱色作用的链霉菌为研究对象, 经 16s rDNA^[10] 分析和生理生化实验鉴定为 *Streptomyces* sp. FX649, 重点运用响应面法对其降解脱色条件进行了优化.

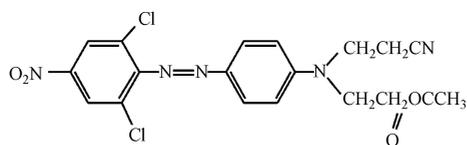
1 材料与方法

1.1 样品采集

本文中污泥样采自湖南省株洲市棉纺厂印染车间废水滤池, 运输时使用冰袋保护包装, 使用前置入 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中保存.

1.2 试剂与仪器

偶氮染料 AR30 ($\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{O}_4\text{N}_5\text{Cl}_2$), 分析纯, 浙江闰土染料有限公司赠送. 结构式如下:



AR30 配制成 $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的母液, 经 $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌备用.

筛选培养基: 葡萄糖 5 g, 琼脂 20 g, 加入染料母液 1 mL, 无菌水定容至 1 L.

富集培养液: 葡萄糖 5 g, 蛋白胨 2 g, 牛肉膏 3 g, Na_2HPO_4 3.5 g, KH_2PO_4 1.5 g, MgSO_4 0.2 g, $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, 无菌水 1 L, 调 pH 值为 7.0.

2012 年 1 月 25 日收稿.

* 环保部公益性行业科研专项(200909066), 湖南省教育厅科研项目(10C1338), 校青年基金(QJ2008017B)资助.

** 通讯联系人, E-mail: gypsfu@126.com

发酵培养液:葡萄糖 5 g, NH_4Cl 5 g, Na_2HPO_4 3.5 g, KH_2PO_4 1.5 g, MgSO_4 0.2 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, 染料 0.01—0.05 g, 无菌水 1 L, 调 pH 值为 7.0.

YXQ-LS-75S 自动立式高压灭菌锅(苏州江东精密仪器有限公司), YJ-1000 型超净工作台(吴江天润净化设备有限公司), D2F-6050 型真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司), DHP-9272 恒温培养箱(上海安竞生物科技有限公司). UV-2100 型紫外可见分光光度计(北京北分瑞利分析仪器公司).

1.3 实验方法

1.3.1 菌株的筛选、鉴定及培养

称取污泥样 5.0 g, 放入盛有 50 mL 无菌水并带有玻璃珠的三角烧瓶中, $250 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡约 20 min 后进行梯度稀释, 得到稀释 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 倍的稀释液. 分别取稀释液 200 μL 涂布于筛选培养基中, $32 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 3—5 d, 挑选脱色圈较大的菌落进一步分离纯化, 并对照伯杰氏细菌鉴定手册(第八版)进行初步鉴定^[11].

用接种环挑取纯化菌株于装有 100 mL 富集培养液的 250 mL 三角瓶中, 于 $32 \text{ }^\circ\text{C}$ 厌氧培养 2 d.

1.3.2 脱色率的测定

细菌脱色能力用脱色率衡量, 采用比色法测定: 将发酵液与对照培养液(不加菌)经离心机 $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 分别取上清液在 UV-vis 于 λ_{max} 445 nm 处测定吸光度, 分别计算发酵液与对照培养液中 AR30 的浓度 C_1 与 C_0 , 根据以下公式^[12]计算脱色率.

$$\omega = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100\%$$

式中, C_0 为不加菌的培养液中 AR30 浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), C_1 为加菌的培养液中 AR30 浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), ω 为脱色率(%).

1.3.3 染料浓度对脱色率的影响

25、50、75、100、125、150、175 和 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ AR30 的发酵培养液 50 mL, 置入 250 mL 三角瓶, 移入富集后的菌液 5 mL, 于 $32 \text{ }^\circ\text{C}$ 厌氧培养(下同)3 d, 平行实验 3 次, 以空白发酵液为对照, 计算脱色率.

1.3.4 培养时间对脱色率的影响

配制 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ AR30 的发酵培养液 50 mL 于 250 mL 三角瓶, 移入富集后的菌液 5 mL, 于 $32 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 3 d, 每 6 h 取样分析脱色率, 平行测定 3 次, 以空白发酵液为对照.

1.3.5 培养液 pH 对脱色率的影响

配制 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ AR30 的发酵培养液 50 mL, 分别调节 pH 值为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 和 9.0, 移入富集后的菌液 5 mL, 于 $32 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 3 d, 平行实验 3 次, 以空白发酵液为对照, 计算脱色率.

1.3.6 培养温度对脱色率的影响

配制 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ AR30 的发酵培养液 50 mL 于 250 mL 三角瓶, 移入富集后的菌液 5 mL, 在 26、28、30、32、34、36、38 $^\circ\text{C}$ 培养 3 d, 平行试验 3 次, 以空白发酵液为对照, 计算脱色率.

1.3.7 Box-Benhkn 组合实验设计

通过预实验发现, 生物量即加入体系的菌液体积, 在 2—20 mL 变化时对脱色效果影响不太显著, 所以将其固定为 5 mL, 相反, 染料浓度、培养温度、培养液初始 pH 和培养时间对脱色率的影响显著. 根据单因素实验结果, 选取 AR30 初始浓度、培养时间、培养液初始 pH、培养温度 4 个主要因素, 每个因素选择 3 个水平, 见表 1, 采用 Box-Benhkn 组合设计法进行优化.

表 1 响应面分析因素水平表

Table 1 Factors and levels of RSM

水平	代码	A AR30 浓度/ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	B 培养时间/h	C 初始 pH	D 培养温度/ $^\circ\text{C}$
1	-1	75	30	6.5	30
2	0	100	36	7.0	32
3	1	125	42	7.5	34

2 结果与讨论

2.1 菌株鉴定

对照伯杰氏细菌鉴定手册,根据菌株生理生化特点,以及 16s rDNA 分析,共测定 800 碱基对(bp),其中的 30—650 bp 与 *Streptomyces variabilis* (AB184884) 同源性 100%,是新种的可能性很小,暂定名为 *Streptomyces* sp. FX649.

2.2 脱色效果单因素实验

染料浓度、培养温度、培养液初始 pH 和培养时间对脱色率的影响结果见图 1. 由图 1(a)可知,当染料浓度低于 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,脱色效果较好,脱色率高达 94%. $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,脱色率最高,为 96.1%. $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,脱色率仅为 20.1%,说明此时染料浓度可能已经超过该菌株的耐受能力,破坏了菌株正常生长代谢. 由图 1(b)可知,在开始的 18 h,脱色率均低于 20%,而 36 h 时则达到 93.1%;而当 66 h 时,脱色率达到最大值 95.4%,之后继续培养脱色率基本不变,可能由于代谢产物的抑制作用所致. 细菌生长与酶活性均受 pH 值影响,由图 1(c)可知,当培养液初始 pH 值由 5 增至 7 时,细菌脱色率持续增大,在 pH 7.0 时脱色率达到最大值 94.6%. 然后随着 pH 值的继续增大,脱色率反而下降. 这说明该菌对碱性环境耐受力不强. 由图 1(d)可知,当温度由 $26 \text{ }^\circ\text{C}$ 升至 $32 \text{ }^\circ\text{C}$ 时,脱色率快速增大, $32 \text{ }^\circ\text{C}$ 时为最大值 94.6%. 然后随温度升高,脱色率急剧下降,这是由于温度过高破坏了脱色酶活性,从而使脱色率降低. 综上所述,通过单因素实验获得的最佳处理条件为染料浓度 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,培养时间 36 h,初始 pH 值为 7,培养温度为 $32 \text{ }^\circ\text{C}$,但一般认为单因素实验结果比较粗糙,拟采用响应面法进一步优化.

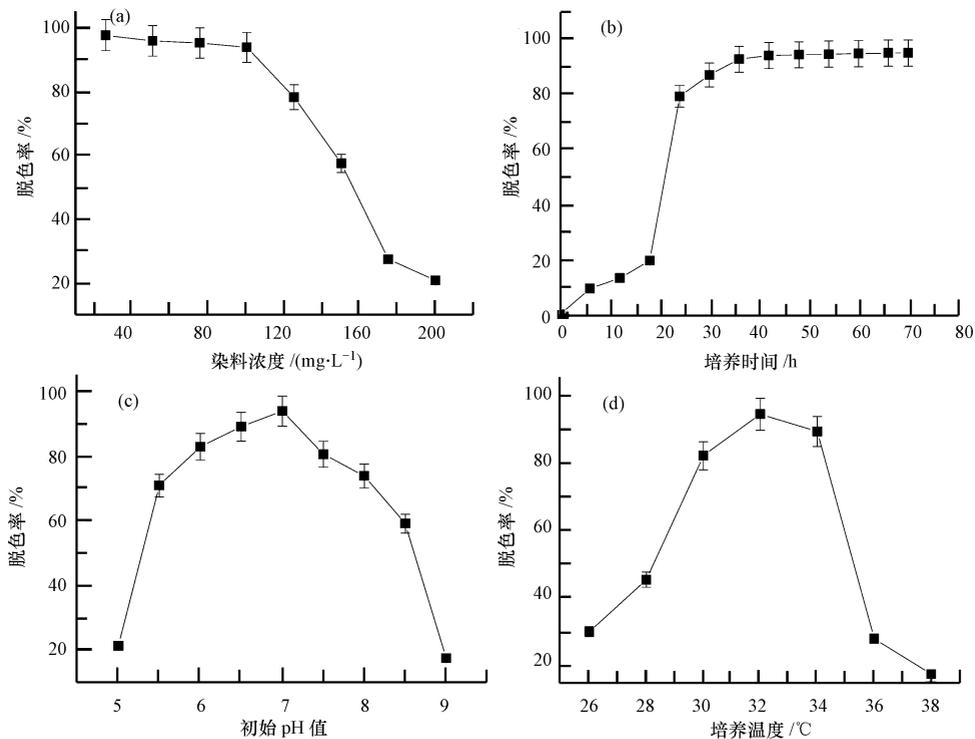


图 1 4 种因素影响染料脱色率的单因素实验

Fig. 1 Effects of four experimental factors on the decolorization of AR30 through single factor experiment

2.3 响应面法优化

2.3.1 响应面分析方案

参照文献[13]进行 Box-Behnken 组合实验设计,利用 Design Expert 8.0 软件进行数据拟合,建立数学模型,获得了该菌株降解 AR30 的最优条件. 其中响应面实验设计及结果见表 2. 在 29 组实验数据中,脱色率均在 73.9% 以上,当 AR30 浓度为 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,初始 pH 值为 7.0,在 $32 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 36 h 后脱色率

为最大值 95.0%。表 2 数据主要用于后续的多项拟合、方差分析、响应曲面与等高线分析以及最优脱色条件求解。

表 2 响应面实验设计及结果
Table 2 The design and results of RSM

实验号	因素				脱色率/%
	A	B	C	D	
1	-1	-1	0	0	80.3
2	1	-1	0	0	83.6
3	-1	1	0	0	83.5
4	1	1	0	0	90.7
5	0	0	-1	-1	73.9
6	0	0	1	-1	80.5
7	0	0	-1	1	87.5
8	0	0	1	1	88.2
9	-1	0	0	-1	80.9
10	1	0	0	-1	77.7
11	-1	0	0	1	78.9
12	1	0	0	1	94.2
13	0	-1	-1	0	79.8
14	0	1	-1	0	87.5
15	0	-1	1	0	91.6
16	0	1	1	0	90.7
17	-1	0	-1	0	75.0
18	1	0	-1	0	86.4
19	-1	0	1	0	84.2
20	1	0	1	0	91.1
21	0	-1	0	-1	79.9
22	0	1	0	-1	82.0
23	0	-1	0	1	84.2
24	0	1	0	1	90.7
25	0	0	0	0	94.6
26	0	0	0	0	93.4
27	0	0	0	0	93.0
28	0	0	0	0	92.5
29	0	0	0	0	95.0

2.3.2 模型建立与显著性分析

对表 2 实验数据进行多项拟合,得到脱色率(ω)对 AR30 浓度、培养时间、pH 和培养温度的二次多项回归方程为:

$$\omega = 93.70 + 3.41A + 2.14B + 3.02C + 4.07D + 0.97AB - 1.13AC + 4.63AD - 2.15BC + 1.10BD - 1.47CD - 5.33A^2 - 3.08B^2 - 4.09C^2 - 6.32D^2$$

对该回归模型进行方差分析,结果见表 3 与表 4。根据统计学知识对方差表进行分析,回归方程模型的 P 值 < 0.0001 ,说明回归方程描述各因子与响应值之间的关系时,其因变量与全体自变量之间的线性关系是极其显著的,即这种实验方法是可靠的;本实验测得的信噪比为 15.259,它的值通常应大于 4,这说明这个模型有足够分辨力,能合适地反映实验结果;变异系数低于 10%,说明实验有良好的稳定性;模型的相关系数 $R^2 = 0.9597$,响应值的变化 95.9% 来源于所选因素,说明该模型能较好地描述实验结果,仅有约 4% 的响应值变异不能由此模型进行解释。综合以上分析可以说明该模型可以用来分析和预测该细菌降解染料 AR30 的最佳实验条件。

从回归方程模型因变量的方差分析可知,模型一次项 A、B、C、D 差异极其显著;交互项 AD、BC 差异

极显著,其它交互项差异不显著;二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 差异极其显著,说明所选因素与响应值之间不是简单的线性关系. 依据回归方程的系数值和方差分析表可知,在响应面的实验范围内各因素的主效应关系为:培养温度 > 染料浓度 > 发酵培养液初始pH 值 > 培养时间.

表 3 响应面结果的方差分析

Table 3 The analysis of variance for the RSM results

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	1042.89	14	74.49	23.78	<0.0001	显著
A	139.40	1	139.40	44.51	<0.0001	
B	55.04	1	55.04	17.57	0.0009	
C	109.20	1	109.20	34.87	<0.0001	
D	198.45	1	198.45	63.36	<0.0001	
AB	3.80	1	3.80	1.21	0.2891	
AC	5.06	1	5.06	1.62	0.2243	
AD	85.56	1	85.56	27.32	0.0001	
BC	18.49	1	18.49	5.9	0.0292	
BD	4.84	1	4.84	1.55	0.2342	
CD	8.70	1	8.70	2.78	0.1177	
A^2	184.22	1	184.22	58.82	<0.0001	
B^2	61.50	1	61.50	19.64	0.0006	
C^2	108.60	1	108.60	34.67	<0.0001	
D^2	258.81	1	258.61	82.64	<0.0001	
残差	43.85	14	3.13			
失拟项	39.33	10	3.93	3.48	0.1204	不显著
纯误差	4.52	4	1.13			
总和	1086.73	28				

表 4 二次回归方程的方差分析

Table 4 Analysis of variance of the quadratic model

项目	数值
标准差	1.77
均值	85.91
变异系数(C. V. %)	2.06
PRESS	233.59
复相关系数	0.9597
校正相关系数	0.9193
预测相关系数	0.7851
信噪比	15.259

2.3.3 响应曲面与等高线分析

多元回归方程可以得到不同因素影响脱色率的响应面及其等高线图. 等高线图表示在同一椭圆型的曲线上,脱色率是相同的. 在椭圆形区域中心脱色率最高,由中心向边缘逐渐降低. 本实验选定 4 个主要因素,优化可以得到每两个因素交互的 6 个响应面的等高线图,本论文选取其中有代表性的 3 个,如图 2—图 4 所示.

图 2 是染料浓度和培养时间对脱色率的响应面和等高线,等高线近似于圆形,说明染料浓度与培养时间的交互作用不是很明显. 图 3 是染料浓度和培养温度对脱色率的响应面和等高线,等高线呈椭圆形,且中心点的角度较大,说明染料浓度与培养温度的交互作用很强. 这也与实验中这两个因素对结果影响最大是相符的. 图 4 是培养时间和培养温度对脱色率的响应面和等高线,等高线呈椭圆形,说明培养时间与培养温度的交互作用较强. 综上分析,4 种因素的主效应关系为培养温度 > 染料浓度 > pH 值 > 培养时间.

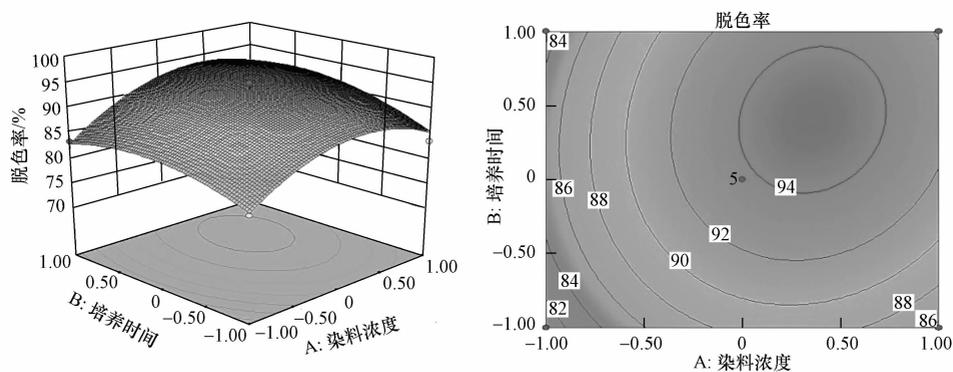


图 2 染料浓度和培养时间对脱色率的影响

Fig. 2 Effect of dye concentration and culture time on the decolorization of AR30

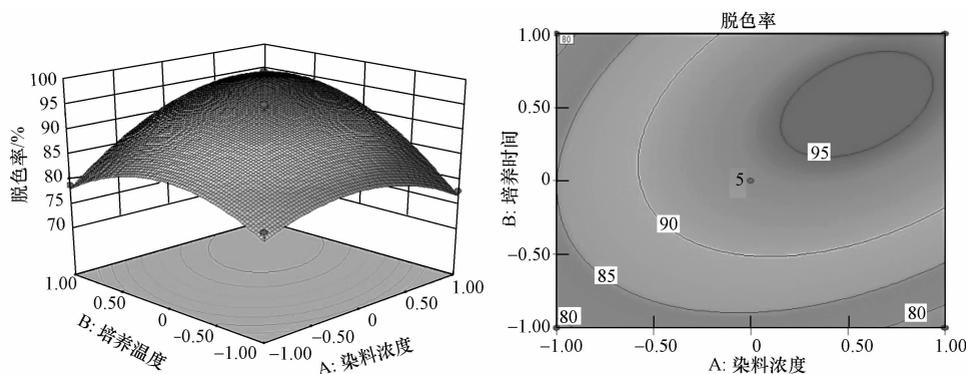


图 3 染料浓度和培养温度对脱色率的影响

Fig. 3 Effect of dye concentration and culture temperature on the decolorization of AR 30

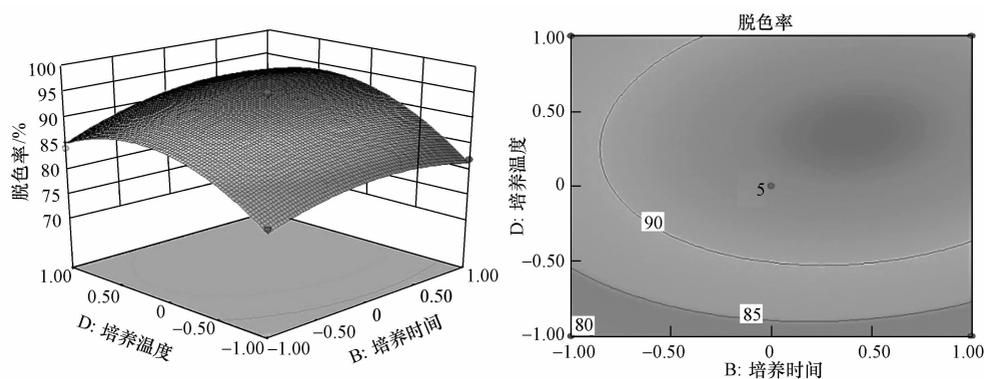


图 4 培养时间和培养温度对脱色率的影响

Fig. 4 Effect of cultural time and temperature on the decolorization of AR30

2.3.4 最优脱色条件求解与验证

通过 Design Expert 8.0 软件求出细菌脱色最佳条件:染料浓度为 $109.92 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 培养时间为 36.24 h, 发酵培养液初始 pH 值为 7.34, 培养温度为 $31.3 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 细菌对染料的脱色率达到 95.8%.

为了检验响应面法所得结果的可靠性,同时考虑到实际操作和实验仪器的局限性,修正后的最佳工艺条件为:染料质量浓度 $110 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 培养时间 36 h, pH 值 7.3, 培养温度 $31.3 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 在此条件下进行了 3 次重复验证实验,脱色率的平均值为 95.1%, 与理论值基本吻合,说明实验设计和响应面法优化得到的降解脱色工艺参数准确可靠,具有实用价值.

3 结论

从株洲棉纺厂污泥样品中分离筛选到了一株对偶氮染料 AR30 具有较强降解脱色能力的菌株 *Streptomyces* sp. FX649. 在单因素实验结果的基础上,以染料浓度、培养时间、发酵培养液初始 pH、培养温度为主要因素,进行 Box-Benhnken 组合实验设计,使用软件进行数据拟合并建立模型. 回归分析得到 4 种因素的主效应关系为培养温度 > 染料质量浓度 > pH 值 > 培养时间. 并得到了最优脱色条件,经修正为:染料质量浓度 $110 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,培养时间 36 h,pH 值 7.3,培养温度 $31.3 \text{ } ^\circ\text{C}$. 最优条件下,脱色率达到 95.1%.

参 考 文 献

- [1] 章杰. 我国染料工业发展新特点和面临的新形势[J]. 染料与染色, 2007, 6(6): 1-5
- [2] 马红娟,王敏,蒲长永,等. 偶氮类染料刚果红水溶液的辐射降解[J]. 环境化学, 2009,28(5): 691-696
- [3] Amjad Ali K, Qayyum H. Potential of plant polyphenol oxidases in the decolorization and removal of textile and non-textile dyes[J]. Journal of Environmental Sciences, 2007, 19(4): 396-402
- [4] Chen B, Wang M, Lu W, et al. Use of active consortia of constructed ternary bacterial cultures via mixture design for azo-dye decolorization enhancement[J]. Journal of Hazardous Materials, 2007, 145(3): 404-409
- [5] 郭建博,张立辉,杨景亮,等. 耐盐偶氮染料脱色菌株 GYW 的筛选及特性[J]. 微生物学通报, 2009, 36(5): 644-651
- [6] Chen C, Kuo J, Cheng C, et al. Biological decolorization of dye solution containing malachite green by *Pandoraea pulmonicola* YC32 using a batch and continuous system[J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 172(2/3): 1439-1445
- [7] Tony Bella D, Goyal D, Khanna S. Decolorization of textile azo dyes by aerobic bacterial consortium[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2009, 63(4): 462-469
- [8] 司美茹,苏涛,杨革. 一株高效广谱染料降解细菌的分离鉴定及脱色特性研究[J]. 中国生物工程杂志, 2010(6): 70-76
- [9] Pandey A, Singh P, Iyengar L. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2007, 59(2): 73-84
- [10] 赵阳国,任南琪,程玉鹏. 一株芽孢杆菌的分类鉴定及其抑菌产物特性. 微生物学杂志, 2006(6): 1-6
- [11] 陈欣,梁慧星. 染料脱色细菌的筛选及脱色条件的研究[J]. 毛纺科技, 2009, 37(2): 28-31
- [12] Chang J, Chou C, Chen S. Decolorization of azo dyes with immobilized *Pseudomonas luteola*[J]. Process Biochemistry, 2001, 36(8/9): 757-763
- [13] Dean A, Voss D. Design and analysis of experiments[M]. New York: Springer, 1999

Optimization of microbial degradation and decolorization of disperse dye by *Streptomyces* sp. FX649 using Response Surface Methodology

FANG Jiqian GUO Yaping* XIE Lianwu WU Xiaofu

(School of Science, Central South University of Forestry and Technology, Changsha, 410004, China)

ABSTRACT

It is difficult to obtain the optimal conditions on treating disperse azo dye wastewater, although biodegradation is very effective. Optimization of microbial degradation and decolorization was conducted using the Response Surface Methodology. One strain, identified as *Streptomyces* sp. FX649, had high potency in the degradation and decolorization of azo dye Red 30 (AR30). After obtaining the single-factor experiment results, AR30 concentration, culture time, pH and culture temperature were selected for Box-Benhnken composite designing. Response Surface Methodology (RSM) was employed to study the effect of these factors on the yield of decolorization. Combined with the actual tests, the results showed that the yield of decolorization of AR30 reached 95.1% under the optimal parameters with $110 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ AR30 cultivating for 36 h under pH 7.3 at $31.3 \text{ } ^\circ\text{C}$.

Keywords: disperse dye, biodegradation, Response Surface Methodology.