

微生物染料脱色研究进展*

杨清香¹ 贾振杰¹ 杨 敏²

(河南师范大学生命科学学院 河南省环境污染控制重点实验室 新乡 453007)¹

(中国科学院生态环境研究中心环境水质学国家重点实验室 北京 100085)²

摘要:近年来,利用微生物对各种染料及染料废水脱色的研究报道很多,包括细菌、真菌等,脱色机制包括吸附脱色和降解脱色。综述了国内外有关这两大类微生物脱色研究的最新进展,对各种脱色机制在实际染料废水处理中的应用现状和研究方向进行了讨论。

关键词:脱色,细菌,真菌,吸附,降解

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 04-0144-05

Microbial Decolorization of Dye Containing Wastewater*

YANG Qing-Xiang¹ JIA Zhen-Jie¹ YANG Min²

(College of Life Sciences, Henan Normal University, Key Laboratory of Environmental Pollution Control Technology of Henan Province, Xinxiang, 453007)¹

(State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Beijing 100085)²

Abstract: In recent years, there has been an intensive research on microbial decolorization of dye wastewater. The decolorization mechanisms involved include adsorption of dye molecules on cells and biodegradation through enzyme catalysis. This paper reviews the newest development on the decolorization study using bacteria and fungi, discusses the various mechanisms and the future research direction when applying in wastewater treatment.

Key words: Decolorization, Bacteria, Fungi, Adsorption, Biodegradation

随着染料和印染工业的迅猛发展,染料的种类和数量不断增加。在染料生产和使用过程中,大约有 10% ~ 20% 的染料随废水排放出去。这些染料具有结构稳定、抗酸、抗碱、抗光、抗微生物等特性,在环境中较长的滞留期,因而具有潜在的健康危害^[1]。此外,含染料废水排放量大、污染面广,不经处理会给整个水生生态系统带来破坏性后果。

各种物化-生化组合技术,如化学氧化-生化技术、微电解-生化技术等对于染料脱色比较有效,但处理成本通常都较高。近几年大量报道了一些微生物,例如,细菌、酵母菌、丝状真菌、放线菌和藻类等,可以通过吸附或降解的方式去除染料^[2]。

1 细菌脱色

1.1 染料脱色细菌 很多细菌能够对染料进行有效降解和脱色,这些细菌主要分布在气单胞菌属、假单胞菌属、芽孢杆菌属、红球菌属、志贺菌属和克雷伯氏菌属中,多

* 国家自然科学基金资助 (No. 50278095)

河南省自然科学基金资助 (No. 0411032400)

通讯作者 Tel: 0373-3326703, E-mail: yangqx66@163.com

收稿日期: 2005-09-20, 修稿日期: 2005-11-16

为好氧生长,但在厌氧条件下可以产生偶氮还原酶,表现出最大的脱色活性^[2]。细菌在厌氧条件下产生的偶氮还原酶具有较低的底物专一性,能够还原染料分子中高亲电子的偶氮键,产生无色的芳香胺。产生的芳香胺会阻止厌氧矿化的进一步发生,并且在环境中滞留会对动物产生毒性和致突变性^[1]。一些好氧细菌能以这些芳香胺作为食物,将其彻底矿化。据此设计的序列厌氧-好氧系统处理含染料废水获得一定成功,并得到一定应用^[3]。

在好氧条件下能够对染料进行降解脱色的细菌很少,Wong 等人报道的 *Klebsiella pneumoniae* RS-13 能够在好氧条件下产生偶氮还原酶,使偶氮键断裂脱色^[4]。Zissi 等人分离到的 *Bacillus subtilis* 和 *Stenotrophomonas maltophilia* 的混合菌可以降解 p-氨基偶氮苯^[5]。但是细菌对染料的好氧脱色往往对染料分子结构具有高度专一性,是微生物对某种染料长期适应的结果。然而,最近,Kodam 等人报道了一株未鉴定细菌 KMK48 在严格好氧的条件下可以对多种染料完全降解脱色^[6]。许玫英等人从活性污泥中分离到一株对偶氮染料具有广谱降解性能的新种——脱色希瓦氏菌 (*Shewanella decolorationis*) S12T,并被证明胞内含有组成型酶^[7]。

混合微生物群落中由于微生物之间的代谢互补或共代谢作用可以对染料分子高度降解和矿化。很多生物脱色反应器都是利用混合菌群共同作用的结果^[8]。许玫英等人利用分子生物学手段分析了印染废水脱色处理系统中的菌群关系,发现具有广谱脱色性能的细菌在系统进化树上聚为一群,分属于希瓦氏菌属和气单胞菌属^[9]。

1.2 细菌脱色机制 细菌对染料降解主要是偶氮还原酶的还原脱色过程。细菌对染料氧化降解的报道还没有见到。细菌也可以通过吸附作用使染料废水脱色,这种吸附作用类似于物理吸附过程,而且由于吸附后的废菌体需要再处理,这方面研究和应用较少。

细菌在厌氧条件下对染料的还原过程是针对偶氮化合物的非专一性过程,该过程存在两种可能的机制:一是以偶氮染料为最终电子受体,依赖于细菌代谢过程中产生的 ATP,通过酶的作用直接将电子转移给染料分子;另一种是不依赖 ATP 的产生,通过细菌代谢过程中的末端产物将偶氮染料还原。一般认为,大多数偶氮染料由于有磺酸取代基团并且分子量较高,不能穿过细胞膜进入细胞,因此染料的还原不依赖于细胞对染料分子的吸收。

那么细胞内的电子传递系统如何同高分子量的偶氮染料分子联系起来呢?Myers 认为,电子传递组分一定是位于细菌细胞的外膜上,它们可以直接与细胞膜外的偶氮染料分子或其他氧化还原中间体相联系^[10]。小分子的氧化还原中间体可以在偶氮染料和 NADH-偶氮还原酶之间起到电子传递的作用。这些小分子中间体可以由细胞代谢产生,也可以从外部加入。例如,加入很低浓度的人工合成氧化还原中间体磺酸蒽醌就可以促进偶氮染料在细胞外的非酶催还原,但如果胞外环境是好氧的,那么氧分子就会抑制偶氮染料的还原^[11]。膜结合的偶氮还原酶是由氧化还原中间体介导的,可对不能穿透细胞膜的磺化染料进行脱色;另一类是细胞质内的可溶性偶氮还原酶,主要负责可以穿透细胞膜的非磺化染料的还原,不需要氧化还原中间体的参与。研究结果表明,硫醇特异抑制剂几乎完全抑制 *Sphingomonas* sp. 的膜结合偶氮还原酶的活性,但对细胞

质偶氮还原酶没有作用。由此可见,膜结合的偶氮还原酶和细胞内偶氮还原酶是两套不同的酶系统。染料的还原速度决定于染料和氧化还原介质的氧化还原电位,而不是还原性氧化还原介质的产生速度^[11],因此染料在厌氧条件下的还原脱色与环境的氧浓度、pH、染料浓度、染料结构、电子供体、氧化还原电位以及氧化还原介质存在等因素有关。

另外, Van 等人的研究结果也表明,某些偶氮染料还原过程中产生的胺醌化合物可以还原染料^[11]。一些细菌在厌氧条件下产生的还原性无机化合物例如, Fe^{2+} 或 H_2S 可以自动使偶氮键还原^[12]。这些例子支持了上述的细菌厌氧脱色的第 2 种机制。

2 真菌的染料脱色

近年来,真菌在染料脱色中的作用受到广泛的关注,目前报道的脱色真菌多达几十种,能够脱色的染料种类也很多,包括偶氮染料、蒽醌染料以及二苯乙烯染料等^[13]。从脱色机制来看,真菌脱色可分吸附脱色和降解脱色。除了白腐真菌外,大多数真菌都是通过生物吸附机制对染料脱色的。

2.1 真菌对染料的吸附脱色 真菌由于菌体呈丝状,用于染料吸附时容易与染料溶液分离,吸附后的真菌菌体可以考虑回收染料和再生吸附材料,而且很多工业发酵的废菌体可以直接用来作为吸附材料,因而相对于细菌染料吸附来说更受关注。相对于生物降解脱色机制,真菌的生物吸附作用对染料结构的选择性较小,一种真菌可对多种染料进行吸附脱色,而且吸附发生得很快,既可以用死细胞也可以用活细胞,另外吸附脱色过程不涉及到酶的产生和活性,因而不依赖于废水环境、底物浓度、营养供给等方面因素。

多数真菌既具有吸附染料功能同时又具有降解染料的功能,染料分子先吸附在菌体上,然后通过细胞酶的作用逐渐降解。然而 *Rhizopus oryzae* 对活性艳红的吸附以及我们报道的 *Penicillium oxalicum* 对活性艳兰等多种染料的吸附均符合 Freundlich 或 Langmuir 模型,属于完全吸附过程^[14]。

真菌死菌体的吸附机制比较简单,主要是物化作用,例如吸附、沉积、离子交换等。活细胞的吸附作用比较复杂,可以利用培养好的活菌体,也可以边生长边进行吸附脱色。真菌死菌体和活菌体对染料的吸附性能有较大差别。研究发现, *Phanerochaete chrysosporium* 灭活的菌体对刚果红的吸附脱色能力(脱色率 90%)比活菌体(脱色率 70%)高。Polman 和 Breckenridge 研究了细菌、真菌和酵母菌对活性染料的吸附性能,在对活性黑 5 脱色的 28 种菌种中,64% 的菌种死菌体具有较高的吸附性能;在对活性兰 19 脱色的 21 种菌种中,71% 的菌种死菌体具有较高的吸附性能。他们认为死细胞吸附能力的提高是由于细胞结构的破坏导致表面积增大的结果^[15]。真菌对不同染料的吸附效果存在很大差异,这应该主要决定于真菌的特性以及染料结构之间的相互作用关系。有关真菌和染料构效关系的研究有不少报道,但目前还没有得出明确的结论。

2.2 真菌对染料的降解脱色 以白腐真菌为主的一组丝状真菌对染料的降解脱色在近 20 年来成为染料生物脱色研究的热点和主流。1988 年 Tien 和 Kirk 首次发现了白腐真菌 *P. chrysosporium* 可以产生木质素过氧化物酶(LiP),认为该酶是负责染料降解的关键

酶^[16]。此后在该菌中又发现另一种过氧化物酶——锰依赖过氧化物酶 (MnP)，并在 *Trametes versicolor* 中发现第 3 种过氧化物酶——漆酶 (Laccase)。目前认为这 3 种酶组成了木质素过氧化物酶系，主要由白腐真菌产生并分泌到细胞外，为非底物专一性酶，对多种有机物和染料具有广谱的氧化降解作用，在好氧的条件下可将多种类似于木质素的苯环类物质彻底矿化，在天然大分子的降解中起到重要作用。这些酶的最大优点是其作用底物的结构非专一性，且能将染料彻底矿化，能够适应于染料、染色行业废水中染料品种多、杂、易变化的特点。目前被广泛研究的白腐真菌主要集中在 *P. chrysosporium*, *T. versicolor* 和 *Coriolus versicolor*。关于白腐真菌和它们产生的这 3 种酶在工业染料废水处理中的研究综述国内外已有很多^[17,18]。木质素降解酶系不仅可以降解染料，而且可以降解含芳香环的多种污染物。其降解机制包括一个相当复杂的氧化、还原、甲基化、羟基化的复合过程，目前还不是很清楚。

对于每一种真菌来说，这 3 种木质素降解酶对脱色的作用不同。对于 *P. chrysosporium*，LiP 对脱色起主要作用。*T. versicolor* 主要产生胞外漆酶，可对多种染料脱色。最具活性的木质素降解者——*Ceriporiopsis subversispora*，仅产生 MnP，而不产生 LiP。后来研究发现，MnP 是最普遍的木质素氧化酶，几乎所有的引起木头腐烂的担子菌类和土壤中树叶降解的各种真菌中都产生 MnP，MnP 在其中起重要作用^[17]。

漆酶与两种过氧化物酶相比，具有更大的实际应用价值。首先，LiP 和 MnP 是在既限碳、又限氮条件下产生的严格次级代谢产物，在工业废水中碳、氮源营养物的存在限制了细胞对酶的分泌；而且这两种酶在降解有机污染物时，需要大量的 H_2O_2 作为辅助剂，这在现实情况下很难实现，限制了其在实际生产中的应用；漆酶可在碳和/或氮存在条件下由菌体分泌，且具有 780 mV 氧化还原电位，能把分子氧直接还原为水，在没有 H_2O_2 和其它次级代谢产物存在下，可催化有机污染物的氧化。因此，漆酶在生物技术和环境保护方面有着巨大的应用潜力。目前，漆酶已尝试地用于造纸木质素的处理、含酚工业废水的处理、纺织染料废水的处理、环境中 PAHs 的降解、杀虫剂和农药的降解等。

过去一直认为漆酶仅存在于植物和真菌中，而近年来发现漆酶也广泛存在于原核生物中，并已经得到了细菌漆酶的晶体结构，纯化的细菌漆酶多达十几种。

目前有关这些真菌在染料废水处理应用方面的研究主要集中在各种适合于丝状真菌的生物反应器的研制和脱色酶提取两方面。研究的主要瓶颈是白腐真菌生长缓慢，处理周期长，在实际废水中易受细菌污染；菌丝经长时间使用后出现老龄化，重复效果差；白腐真菌产酶条件比较苛刻，需要在氮或碳限制的条件下，而实际染料废水成分复杂，很难满足这些条件；酶的提取成本过高，难以应用于废水处理中^[19]。

如果能在快速生长且对废水适应性强的微生物类群中发现能产生木质素降解酶类的菌种将有助于以上问题的解决。为此，我们从土壤和城市污水处理场的活性污泥中开展脱色真菌的分离。最终我们得到了 4 株能快速生长和脱色的丝状真菌和酵母菌，经鉴定属于 *Umbelopsis isabellina*, *Penicillium geastrivorus*, *Debaryomyces polymorphus* (酵母) 和 *Candida tropicalis* (酵母)，这些菌株都可以对活性黑 5 明显脱色，但 *P. geastrivorus* 中检测不到任何木质素降解酶，该菌株显示出吸附脱色的特性，而在

U. isabellina 和两株酵母菌中都可以检测到 MnP, 其中两株酵母菌中的 MnP 活性远高于 *U. isabellina*, 并且表现出对活性黑 5 以及其他多种染料高效降解脱色的性能^[20]。所分离的酵母菌脱色效率较高, 产酶条件并不苛刻, 有望克服白腐真菌在实际废水处理应用中的主要瓶颈^[21]。除此之外, 我们在研究中也发现, 有些酵母菌可以通过细胞色素 P450 氧化酶系统对染料进行降解脱色。

3 结论

细菌对染料的脱色主要表现在细菌在厌氧条件下利用偶氮还原酶对偶氮染料的还原脱色, 还原产物需要在好氧细菌的作用下进一步降解。厌氧-好氧组合技术是目前得到一定应用的脱色处理工艺, 然而, 由于对细菌还原染料的生化机制认识不足, 该工艺在实际应用中容易出现处理效果不稳定的问题。

微生物的好氧脱色研究主要集中在白腐真菌所产生的木质素降解酶系统方面的研究。目前的问题是真菌能同时降解的染料种类仍比较有限, 微生物本身的生长和产酶特性还无法实现工业化应用。今后的研究方向应该广泛地从自然界寻找生长快、脱色范围广的微生物类群, 利用共代谢或生理互补的混合微生物进行染料降解。进一步弄清各类酶的作用以及污染物的降解途径是确立染料生物脱色技术的关键问题。

真菌的吸附脱色作用由于可以不依赖于菌体培养、对染料结构的选择性小等特点引起许多研究者的兴趣, 利用死细胞作为吸附材料不仅脱色效率较高, 而且便于储藏和工艺控制, 但是如何解决染料的解吸附以及吸附材料重复利用次数的问题是该领域的重要研究方向。

参考文献

- [1] Yoo E S, Libra J, Adrian L. *Journal of Environmental Engineering*, 2001, **127**: 844 ~ 849.
- [2] Banat I M, Nigam P, Singh D, *et al.* *Bioresource Technology*, 1996, **58**: 217 ~ 227.
- [3] Lourenco N D, Novais J M, Pinheiro H M. *Water Science Technology*, 2000, **42**: 321 ~ 328.
- [4] Wong P K, Tuen P Y. *Water Research*, 1996, **30**: 1736 ~ 1744.
- [5] Zissi U, Lyberatos G. *Biotechnology Bioengineering*, 2001, **72**: 49 ~ 54.
- [6] Kodam K M, Soojhawon I, Lokhande P D, *et al.* *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2005, **21**: 367 ~ 370.
- [7] 许玫英, 钟小燕, 曹 渭, 等. *微生物学通报*, 2005, **32** (1): 9 ~ 13.
- [8] Coughlin M F, Kinkle B K, Bishop P L. *Chemosphere*, 2002, **46**: 11 ~ 19.
- [9] 许玫英, 李建军, 曹 渭, 等. *微生物学杂志*, 2004, **24** (6): 25 ~ 28.
- [10] Myers C R, Myers J M. *Journal of Bacteriology*, 1992, **174**: 3429 ~ 3438.
- [11] Van F P, Lettinga G, Field J A. *Water Science and Technology*, 2000, **42**: 301 ~ 308.
- [12] Stolz A. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, **56**: 69 ~ 80.
- [13] Fu Y, Viraraghavan T. *Bioresource Technology*, 2001, **79**: 251 ~ 262.
- [14] Zhang S J, Yang M, Yang Q X. *Biotechnology Letters*, 2003, **25**: 709 ~ 713.
- [15] Polman J K, Breckenridge C R. *Textile Chemist and Colorist*, 1996, **28**: 31 ~ 35.
- [16] Tien M, Kiek T K. *Science*, 1988, **221**: 661 ~ 663.
- [17] Hofrichter M. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, **30**: 454 ~ 466.
- [18] Wesenberg D, Kyriakides I, Agathos S N. *Biotechnology Advances*, 2003, **22**: 161 ~ 187.
- [19] Borchert M, Judy A L. *Biotechnol and Bioengineering*, 2001, **75** (3): 313 ~ 321.
- [20] Yang Q, Yang M, Pritsch K, *et al.* *Biotechnology letters*, 2003, **25**: 709 ~ 713.
- [21] Yang Q, Yediler A, Yang M, *et al.* *Biochemical Engineering Journal*, 2005, **24**: 249 ~ 253.