

假单胞菌S-59对多种染料的脱色和降解

贾省芬 杨惠芳

(中国科学院微生物研究所,北京)

摘要 从受染料长期污染的污泥样品中分离到 28 株对多种染料具有脱色能力的细菌,其中一株假单胞菌 S-59 号菌对 79 种染料均有脱色作用。该菌对酸性红 B 2GL (简称酸性红 B) 和活性桔 K, GV 的脱色活力高达 $4.48-4.43 \text{ mg (染料)} \cdot \text{g}^{-1} \text{ (细胞湿重)} \cdot \text{h}^{-1}$ 。对阳离子红 2GL 和酸性红 B 在浓度为 $1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 时其半脱色时间只有 0.5 小时。染料浓度在 100 mg/L 以上时会抑制菌的脱色率,而对菌生长的抑制作用则取决于不同的染料品种。S-59 号菌降解酸性红 B 的中间产物类似于芳香胺,部分最终产物为氨。

关键词 染料;细菌的脱色和降解

染料是印染、纺织和食品工业废水中的重要污染物之一。自 70 年代末 80 年代初,日本 Idaka^[1]、Yatome^[2] 和 Ogawa^[3] 等报道了偶氮和三氯甲苯染料的细菌脱色和降解,瑞士的 Zimmermann 等^[4,5]和 Kulla^[6] 等人研究了细菌降解偶氮染料的代谢途径和偶氮还原酶的特性。近年来,我国着手研究多种染料的微生物脱色^[7]和偶氮染料的降解代谢^[8]。研究的染料品种已扩大到 30 多种,尚不能满足净化染色废水中多变和复杂的染料品种。

为了适应净化染色废水的需要,收集化学结构不同的偶氮、三苯甲烷、蒽醌、吡啶等 100 种染料,分离、筛选脱色细菌,获得一株脱色能力强,脱色染料品种多的假单胞菌 S-59,并对其降解酸性红 B 的产物作了初步分析。

材料和方法

(一) 菌种的分离和鉴定

从北京、天津、上海、石家庄等地的印染和染料化工等厂采集长期受染料污染的污泥和废水处理场的活性污泥及生物膜样品共 45 个,进行富集培养。合成培养基成分 (g/L): $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.5, KH_2PO_4 0.5, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 1.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0, 三氯化铁 0.01, 酵母膏 0.1, 葡萄糖 5, 染料 0.05, 蒸馏水 1000 ml, pH7.5—8.0。富集培养过程中用肉眼观察脱色效果,富集培养 2—3 次后在牛肉汁琼脂平板上分离单菌落,用比色测定分离菌株的脱色效果。分离出的优良脱色细菌,按文献 [9] 的方法进行鉴

定。

(二) 染料来源

试验所用染料为商品染料共 100 种，其中包括直接染料 5 种；活性染料 18 种；酸性染料 15 种；阳离子染料 13 种；硫化染料 4 种；中性染料 7 种；分散染料 10 种；媒介染料 11 种；其他染料 17 种。按其化学结构分别属于偶氮，三苯甲烷，蒽醌，吡啶染料^[10,11]。

(三) 脱色能力的测定

细菌的富集培养用目测法确定脱色效果，单菌株的脱色能力用比色法测定；反应液经 $10000 \times g$ 离心 20 min，取上清液，在各种染料的最大吸收峰的波长上，测定反应前后的吸光度，并以百分数表示其脱色率；以每小时每克细胞脱除的染料毫克数表示细胞脱色活力 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)；以脱除起始染料浓度的一半的时间为半脱色时间 (h)。

(四) 完整细胞和无细胞提取液的制备

离心收集 24 小时的细菌培养物，用 pH 7 的磷酸缓冲液 ($1/15 \text{ mol/L}$) 洗涤两次，细胞悬浮于上述缓冲液中备用。洗净的细胞在 0°C 用超声波破碎器 (Labsonic 2000 型) 破碎 (19 kHz , 200 W) 10 分钟， $10000 \times g$, 30 min, 4°C 离心，取上清液，获得无细胞提取液。

(五) 化学分析

1. 抽提物的吸收光谱，按照 Yatome 等人的^[2]方法，无细胞提取液与染料反应后的混合物用正丁醇抽提，离心取上层正丁醇相，在 DU-7 型分光光度计 (Beckman) 上进行吸收光谱扫描。

2. 氨的测定：取无细胞提取液与染料反应液，测定反应不同时间的氨量。

结果和讨论

(一) 细菌的分离和鉴定

从 45 个样品中分离到 578 株脱色细菌，并

试验了它们对 100 种染料的脱色率。进一步筛选到脱色染料数多、脱色率高的 23 株菌。S-59 号菌能脱色的染料数多到 79 种，脱色率在 90% 以上者 36 种，70—89% 为 11 种，30—69% 32 种。T-44 号菌的脱色染料数仅次于 S-59 号菌；脱色率 90% 以上者 13 种，70—89% 有 29 种，30—69% 有 34 种，脱色染料共有 76 种。S-98 号菌能脱色的染料为 70 种，其他 20 株菌脱色染料均在 10 余种以上 (表 1)。从表

表 1 分离细菌对 100 种染料的脱色数和脱色率*

菌 株	脱色的染料数和脱色率			不能脱色的染料数
	90%以上	70—89%	30—69%	
S-93	8	18	28	46
S-42	15	19	32	34
S-59	36	11	32	21
S-61	11	5	22	62
S-62	10	5	26	59
S-98	13	18	39	30
T-40	24	8	31	37
T-34	13	8	26	53
T-36	33	9	18	40
T-44	13	29	34	24
S-13	5	6	9	80
S-23	4	3	16	77
S-30	8	4	13	75
S-40	4	5	10	81
S-43	3	4	7	86
S-53	3	5	8	84
S-58	4	7	10	79
S-96	6	10	13	71
S-27	5	7	8	80
S-25	3	4	5	88
P-2	2	3	6	89
P-4	3	5	5	87
P-5	2	6	7	85

* 培养时间 48 小时，染料浓度 50 mg/L

2 列出的 10 株优良脱色菌脱色染料的名称及数量可见，大部分细菌可脱去所试验的活性染料和阳离子染料等水溶性染料均在半数以上，而对水不溶性或微溶性的分散染料脱色数量较少。

经鉴定，10 株优良脱色细菌分属于 8 个属：欧文氏菌属 (*Erwinia* S-93)，腊状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus* S-61)，葡萄球菌属

表2 10株细菌脱色染料名称和数量

菌株编号	活性染料(18种)		阳离子染料(13种)		偶氮染料(4种)		直接染料(5种)		中性染料(7种)		酸性染料(15种)		媒介染料(11种)		分散染料(10种)		其他染料(17种)	
	脱色	不脱色	脱色	不脱色	脱色	不脱色	脱色	不脱色	脱色	不脱色	脱色	不脱色	脱色	不脱色	脱色	不脱色	脱色	不脱色
	色	色	色	色	色	色	色	色	色	色	色	色	色	色	色	色	色	色
S-93	8	10	6	7	4	0	4	1	5	2	10	5	5	6	3	7	12	5
S-42	15	3	8	5	1	3	4	1	5	2	9	6	5	6	3	7	13	1
S-59	16	2	11	2	4	0	5	0	6	1	11	4	11	0	4	6	17	0
S-61	10	8	6	7	2	2	3	2	3	4	7	8	2	9	1	4	8	9
S-62	13	5	7	6	2	2	4	1	3	4	8	7	1	10	1	9	11	6
S-98	16	2	7	6	2	2	4	1	6	1	10	5	4	7	2	8	17	0
T-34	13	5	6	7	2	2	3	2	4	3	7	8	5	6	0	10	13	4
T-36	15	3	6	7	4	0	5	0	4	3	6	9	8	3	3	7	14	3
T-40	16	2	8	5	2	2	1	4	4	3	9	6	7	4	1	9	12	5
T-44	16	2	9	4	4	0	5	0	6	1	11	4	10	1	4	6	16	1

(*Staphylococcus* S-62),假单胞菌属(*Pseudomonas* S-59, S-42),副球菌属(*Paracoccus* S-98),邻单胞菌属(*Plesiomonas* T-34, T-36),柠檬细菌属(*Citrobacter* T-40),肠细菌属(*Enterobacter* T-44)。

(二) 细菌的脱色活力和速度

4株细菌的完整细胞对酸性染料和活性染料的脱色活力表明,测定菌株对酸性红B的脱色活力都较高,每克湿重细胞在1小时内可脱除4.5mg左右酸性红B。对三种不同色泽的活性染料来说,假单胞菌S-59的脱色活力比其他三株菌高(表3)。

表3 完整细胞对酸性染料和活性染料的脱色活力*
(mg·g⁻¹·h⁻¹)

细菌名称	酸性红 B2GL	活性红 KR	活性桔 K ₂ GV	活性黑 KBG
<i>Pseudomonas</i> S-59	4.48	2.44	4.43	1.69
<i>Paracoccus</i> S-98	4.47	2.18	4.40	0.42
<i>Pseudomonas</i> S-42	4.45	2.18	4.40	0
<i>Enterobacter</i> T-44	4.51	1.68	2.01	1.52

* 反应温度 37℃, pH 7

细菌对多种染料的脱色速度是净化染色废水的重要参数,本试验测定了假单胞菌S-59对14种染料的半脱色时间,当染料浓度在1×10⁻³mol/L时,菌对阳离子红2GL和酸性红B

表4 S-59号菌完整细胞对染料的半脱色时间(h)

染料名称	分子量	1×10 ⁻³ mol/L	5×10 ⁻³ mol/L
酸性红 B	506	0.5	1.0
酸性大红 G	510	1.48	4.8
酸性媒介棕 RH	376	3.2	6.6
媒介黄 GG	366	2.3	4.0
活性艳红 X-3B	498	4.0	3.2
活性艳橙 KN-4R	604	1.8	3.0
活性紫 K-3L	738	1.3	2.6
活性红棕 KB ₁ R	863	1.7	2.3
直接深棕 M	612	0.7	1.46
直接茜蓝 5B	775	3.0	4.99
直接枣红 GB	725	1.2	1.21
直接耐晒黑 G	840	2.7	4.25
直接耐晒蓝 B ₁ R	1028	1.3	3.2
阳离子红 2GL	745	0.5	1.1

的半脱色时间仅为0.5小时。其次为直接深棕M,大部分染料的半脱色时间在1—2小时,活性艳红X-3B的脱色速度较慢,其半脱色时间为4小时。当染料浓度在5×10⁻³mol/L时通常半脱色时间延长一倍或不到一倍(表4)。试验结果还表明,菌对染料的脱色与染料的分子量大小关系不大,这一结果与Yatome等^[2]的报道相似,但是否与染料的化学结构有关有待进一步研究。

(三) 染料浓度对S-59号菌的生长和脱色的影响

染料浓度是净化染色废水中的限制因子之一。S-59号菌脱色的最适pH,温度和对氧

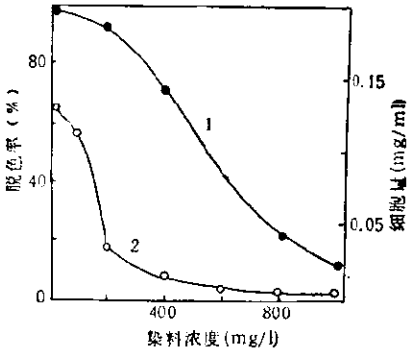


图1a 不同浓度酸性红B对S-59号菌生长和脱色的影响
1. 脱色率(%) 2. 细胞量(干重 mg/ml)

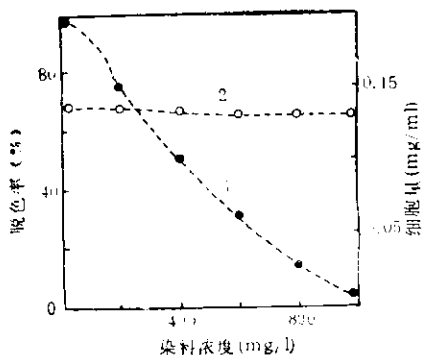


图 1b 不同浓度活性艳橙 KN-4R 对 S-59 号菌生长和脱色的影响

1. 脱色率(%) 2. 细胞量(干重 mg/ml)

的需求同其他报道^[7,8]相似,本试验在最适条件下进行了染料浓度(10 mg/l 到 1000 mg/l)对菌的生长和脱色率的影响,图 1a 和图 1b 的结果表明,随着染料浓度的不断提高,菌的脱色率降低,当染料浓度在 100 mg/l 以上脱色率的降低更为明显。然而,在试验浓度范围内酸性红 B 的浓度愈高,菌的生长受到抑制越大,在此浓度下活性艳橙 KN-4R 对菌的生长则无任何影响。

(四) S-59 号菌对酸性红 B2GL 的降解作用

细菌对染料的脱色仅表明染料在细菌的作用下,显色基团消失。已有报道证明^[4,8],偶氮染料的生物降解是在偶氮还原酶的作用下,偶氮双键断裂,色泽消失,形成相应的芳香胺化合物。这种降解并不完善,还需要在其他微生物的协同作用下,染料才能完全矿物化。我们用 S-59 号菌的无细胞提取液在 37°C, pH7, 并加有 NADH 的厌氧条件下进行脱色反应。图 2 结果表明,酸性红 B 和无细胞提取液反应物正丁醇相的吸收光谱,随着反应的进行,在可见光部分(519 nm)的吸收峰不断下降,而在紫外部分(250 nm)的吸收峰不断增加,该吸收峰与前报道的芳香胺类相似。继续延长反应时间,当酸性红 B 2GL 的 OD 值下降到较低时氨量逐渐上升,反应 80 分钟氨量达到最高(图 3)。由此推测, S-59 号菌降解酸性红 B 过程

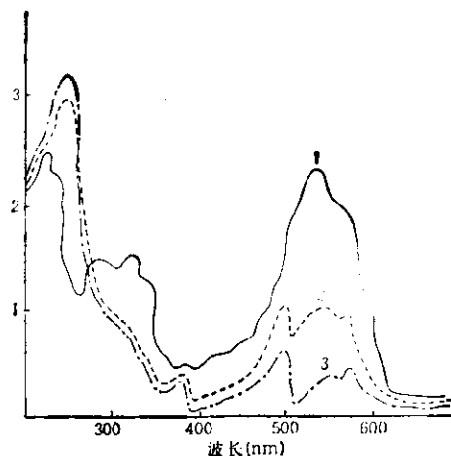


图 2 酸性红 B 的反应产物在正丁醇中的吸收光谱
反应条件: 酸性红 B 50mg/L, 酶液 0.19 mg 蛋白/ml, pH = 7

反应时间: 1.0 min 2. 10min 3. 20min

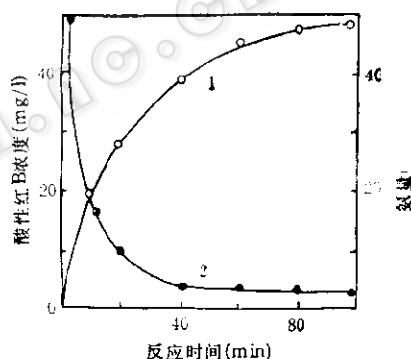


图 3 酸性红 B 反应混合液中氨的形成
1. 氨量(μmol/L) 2. 酸性红 B (mg/l)

中,不仅可使偶氮键裂解形成芳香胺类化合物,随着反应时间的延长部分芳香胺可进一步降解形成氨,达到矿物化作用的目的。

参 考 文 献

1. Idaka H et al.: *J. Soc. Dyers and Col.*, **94**: 91-94, 1978.
2. Yatome C C et al.: *J. Soc. Dyers and Col.*, **97**: 165-169, 1981.
3. Ogawa T et al.: *J. Soc. Dyers and Col.*, **97**: 435-438, 1981.
4. Zimmermann T et al.: *Eur. J. Biochem.*, **129**: 197-203, 1982.
5. Zimmermann T et al.: *Arch. Microbiol.*, **133**: 37-43, 1984.
6. Kullia H G et al.: *Arch. Microbiol.*, **135**: 1-7, 1983.
7. 鲜海罕, 杨惠芳: 环境科学学报, **8**(3): 266-274, 1988.

8. 刘志培,杨惠芳: 微生物学报,29(6): 418—426,1989。
9. 中国科学院微生物所细菌分类组编著: 一般细菌常用鉴定方法,科学出版社,1978。

10. 余肇铭,张守中编著: 纺织有机化学,上海交大出版社,1985。
11. 沈阳化工研究所染料情报组编著: 染料品种手册,1982。