

微生物对三苯基甲烷类染料脱色的研究进展

张培培^{1,2,3,4,5} 任随周^{2,3,4*} 许玫英^{2,3,4} 孙国萍^{2,3,4}

- (1. 中国科学院南海海洋研究所 广东 广州 510301)
- (2. 广东省微生物研究所 广东 广州 510070)
- (3. 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广东 广州 510070)
- (4. 广东省微生物应用新技术公共实验室 广东 广州 510070)
- (5. 中国科学院研究生院 北京 100049)

摘要: 三苯基甲烷染料广泛应用于纺织印染、医药、生物染色、造纸、皮革、食品及化妆品等领域,常见的有作为抗菌剂的孔雀石绿和结晶紫等。由于其特殊的化学结构,在环境中较稳定且难以降解脱色,因此其生物脱色降解的研究可为印染废水处理和染料污染环境的生物修复提供理论依据。本文从细菌、放线菌、真菌及藻类等微生物对三苯基甲烷类染料降解脱色研究新进展做综述。通过分析不同微生物脱色三苯基甲烷类染料的中间产物来探讨其降解机理和降解途径,同时论及功能酶的分离纯化、酶学特性及其编码基因的克隆表达新进展,并分别从基础理论和应用两方面对微生物降解三苯基甲烷类染料未来的研究方向进行了展望。

关键词: 三苯基甲烷类染料, 微生物, 脱色, 降解

Recent Advances in Microbial Decolorization of Triphenylmethane Dyes

ZHANG Pei-Pei^{1,2,3,4,5} REN Sui-Zhou^{2,3,4*} XU Mei-Ying^{2,3,4} SUN Guo-Ping^{2,3,4}

- (1. South China Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510301, China)
- (2. Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510070, China)
- (3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou, Guangdong 510070, China)
- (4. Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510070, China)
- (5. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Triphenylmethane dyes are widely used in textile dyeing, medicine, biological staining, paper, leather, food and cosmetic industries. Their special stable chemical structures make them difficult to be degraded and decolorized. The biodecolorization research of triphenylmethane dyes will provide the fundamental knowledge for the treatment of dye-containing wastewater and bioremediation of dye-contaminated environment. In this paper, the recent research progress in biodegradation and decolorization of triphenylmethane dyes by microorganisms, such as bacteria, actinomycetes, fungi and alga, as well as the functioning enzymes and their coding genes, were reviewed. The decolorization mechanisms and degradation pathways of triphenylmethane dyes were discussed based on the decolorizing intermediate products of different microbes. The development and application of triphenylmethane dyes biodecolorization and biodegradation

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 30800031); 国家 863 计划项目(No. 2006AA06Z322); 广东省科技计划项目(No. 2007A020903001); 广东省自然科学基金项目(No. 9351007002000001, 9251007002000003); 广东省科学院人才基金项目(No. 200601)

* 通讯作者: ✉ rensz@163.com

收稿日期: 2009-01-01; 接受日期: 2009-02-27

were also prospected.

Keywords: Triphenylmethane dyes, Microorganism, Decolorization, Biodegradation

近年来,大量人工合成的色度高、难降解染料的过量使用及排放已造成严重的环境污染,由于其生物毒性及致癌、致畸、致突变的三致性对人类健康构成威胁,引起了广泛的关注。三苯基甲烷类染料就是其中应用广泛的一大类,因此有关三苯基甲烷类染料的脱色及降解研究也越来越受到人们的重视^[1]。

尽管目前已发现多种微生物具有三苯基甲烷类染料脱色能力,并对其脱色机制及降解产物展开了研究,但与偶氮染料相比,有关三苯基甲烷类染料的生物降解研究仍然相当少。本文从三苯基甲烷类染料特征、三苯基甲烷类染料脱色微生物的多样性、三苯基甲烷类染料降解产物、脱色酶及其相关基因等几方面进行评述。

1 三苯基甲烷类染料概述

三苯基甲烷染料包括碱性、酸性、溶剂染料等,广泛应用于纺织印染、医药、生物染色、造纸、皮革、食品及化妆品等领域^[1]。其分子结构共同特征为一个中心碳原子连有3个苯环,而不同染料的苯环上还带有不同的侧链基团。结晶紫和孔雀石绿是三苯基甲烷类染料中的两种代表(结构式见图1)。结晶紫具有抗菌作用,它与甲基紫组成的混合物龙胆紫是一种常用的皮肤、粘膜消毒防腐剂。此外,龙胆紫还经常被添加到家禽、家畜饲料中控制真菌的生长霉变。孔雀石绿既是工业染料,又是一种杀真菌剂,对鱼类水霉病、原虫病等的控制非常有效,因此,长期以来孔雀石绿在水产养殖业中的使用极为普遍。

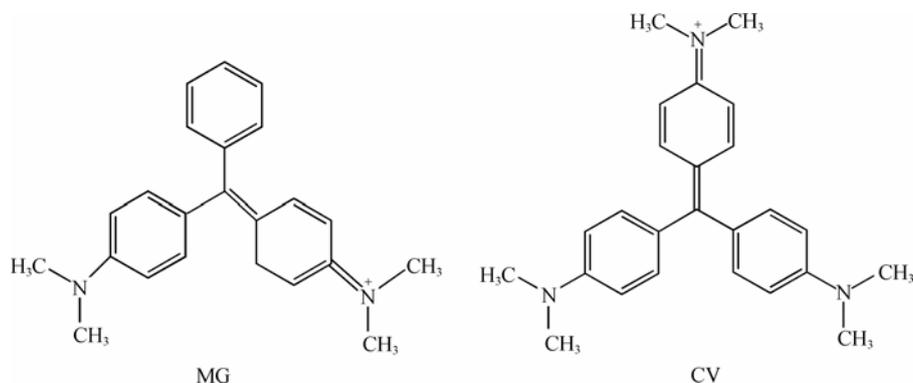


图1 孔雀石绿(MG)和结晶紫(CV)结构式

Fig. 1 Structural formula of malachite green (MG) and cristal violet (CV)

上世纪70年代末,就已证实三苯基甲烷类染料对哺乳动物细胞具有毒害及致癌、致畸和致突变的作用,是对人类健康具有潜在危害的环境污染物^[2]。还有一些三苯基甲烷类染料对水生生物具有很大的毒性,在水环境中的微量残留会对水产养殖业造成长期的不利影响。含有龙胆紫的饲料饲养畜禽后,染料残留物能够在畜禽体内长期存在,有关龙胆紫和结晶紫的细胞毒性已经在中国大颊鼠类的CHO细胞和其它五种不同的哺乳动物细胞中进行了研究,结果表明这些化合物对细胞的有丝分裂具有很强的生物毒性^[1]。孔雀石绿同样具有高毒性、高残留和“三致”等副作用,并能在鱼体内长时间残留,人类过量食用这些鱼类会危害身体健康^[3]。碱性红9和碱性蓝7也具有致癌性和致突变性^[4]。因此,进行三苯基甲烷类染料生物脱色降解研究对于染料污染治理及人类健康都具有重要意义。

2 三苯基甲烷类染料脱色微生物的多样性

能够对三苯基甲烷类染料进行表观脱色的微生物种类多样,涉及细菌、放线菌、真菌以及藻类中不同的属种。

2.1 细菌和放线菌

上世纪80年代,Yatome等^[5]发现假单胞菌属菌株 *Pseudomonas pseudomallei* 13NA 能够对三苯基甲烷类染料中的甲基紫和结晶紫脱色。此后,国内外研究者已分离到多种不同种属的三苯基甲烷类染料脱色细菌,并对其脱色谱及脱色能力等进行了分析,表1列举了部分该类微生物。

表 1 三苯基甲烷类染料的脱色细菌
Table 1 Bacteria for Triphenylmethane Dyes Decolorization

菌种 Bacteria	染料 Dyes	染料浓度 Concentration of dyes	脱色时间 Decolorizing time	脱色率(%) Decolorizing efficiency (%)
<i>B. subtilis</i> IFO 13719 ^[6]	结晶紫	≤7 μmol/L	24 h	100
	碱性品红			
<i>Kurthia</i> sp. ^[7]	维多利亚蓝	10 μmol/L	30 min	92
	碱性品红			
<i>Citrobacter</i> sp. KCTC18061P ^[8]	结晶紫、孔雀绿	100 μmol/L	1 h	96
	副品红、灿烂绿			
<i>Bacillus Alcaligenes Aeromonas</i> ^[9]	结晶紫	—	—	>90
	灿烂绿、孔雀石绿、龙胆紫			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^[10]	碱性品红	—	—	66
	酸性紫 17			
<i>Aeromonas hydrophila</i> DN322 ^[11]	孔雀石绿	≤50 mg/L	28 h	98
	结晶紫、碱性品红、灿烂绿、孔雀石绿	50 mg/L	10 h	>90
<i>Kurthia</i> B1 <i>Pseudomonas</i> B2 <i>Arthobacter</i> B5 ^[12]	孔雀石绿	50 mg/L	24 h	93.30
				99.19
<i>Bacillus cereus</i> DC11 ^[13]	孔雀石绿	55 μmol/L	3 h	91.30
	灿烂绿	25 μmol/L	24 h	96±4
	结晶紫	20 μmol/L	24 h	90±6
	碱性品红	20 μmol/L	24 h	90±8
<i>Shewanella</i> sp. NTOU1 ^[14] <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> F7 ^[15]	结晶紫	1500 mg/L	298 mg/(L·h)(厌氧)	65±4
	结晶紫	60 mg/L	8 h	---
				95.7

研究发现,一些放线菌包括分枝杆菌也能够对三苯基甲烷类染料进行脱色。1991年, Yatome 等^[16]首先报道了放线菌对三苯基甲烷染料的生物降解,发现两株放线菌 *Nocardia corallina* 和 *N. globerula* 对结晶紫具有脱色活性。Jones 和 Falkinham^[17]也发现了 5 种分枝杆菌(*Mycobacterium avium*、*M. intracellulare*、*M. scrofulaceum*、*M. marinum* 和 *M. chelonae*)均能对孔雀绿和结晶紫进行脱色。

上述研究证明,虽然三苯基甲烷类染料结构稳定且难降解,但多种细菌和放线菌仍对其具有广谱高效的表观脱色活性,如芽孢杆菌属、库特氏菌属、假单胞菌属、柠檬酸杆菌属、气单胞菌属、诺卡氏菌属及希瓦氏菌属等。如表 1 中所示枯草芽孢杆菌 IFO 13719 和库特氏菌属对低浓度染料的脱色率可达 100%,嗜水气单胞菌 DN322 对高达 50 mg/L 的染料仍具有高于 90% 的脱色率,而脱色希瓦氏菌 NTOU1 在厌氧条件下可耐受 1500 mg/L 的结晶紫并对其进行脱色。丰富的细菌资源为三苯基甲烷类染料的生物脱色降解及污染环境的生物修复提供了大

量的种质资源,但更多具有高效脱色能力的菌种还有待于进一步发掘和研究。

2.2 真菌

近年来,染料的真菌脱色越来越受到人们的关注,已发现多种白腐真菌、霉菌、酵母菌等具有三苯基甲烷类染料脱色活性。

白腐真菌是指一类具有引起木质白色腐烂功能的丝状真菌的总称^[18]。自上世纪 80 年代, Glenn 等^[19]发现白腐真菌黄孢原毛平革菌 *Phanerochaete chrysosporium* 对一些聚合染料具有脱色降解作用以来,白腐真菌对染料的脱色降解已逐渐成为研究热点。Bumpus^[20]、Yesilada^[21]、Knapp^[22]、Vasdev^[23]和 Ivana Eichlerova^[24]等先后发现了白腐真菌的不同菌株(*P. chrysosporium*、*Coriolus versicolor*、*Funalia trogii*、*Laetiporus sulphureus*、*Cyathus bulleri*、*Cyathus stercoreus*、*Cyathus striatus* 和 *Dichomitus squalens*)对包括结晶紫、孔雀石绿、灿烂绿、乙基紫等在内的多种三苯基甲烷类染料均具有较强的脱色能力。国内学者对白腐真菌的三苯基甲烷类染料脱色也

展开了广泛的研究。张晓昱^[25]等研究发现侧耳属白腐真菌(*Pleurotus ostreatus*)菌株 BP 在稻草固体基质发酵 3 d 后对孔雀绿、溴酚蓝和结晶紫的脱色降解率分别可达到 96.05%、91.20%和 92.56%。黎小军^[26]等也分离到一株可高产木质素过氧化物酶的白腐真菌 ZJ-6, 该菌株对结晶紫的脱色率可达 70% 左右。

综合以上研究可以发现, 白腐真菌是一类广谱染料降解菌, 对包括三苯基甲烷类染料在内的多种染料均具有较好的脱色效果, 可以应用于印染废水的生物处理及染料污染环境的生物修复中。

霉菌对三苯基甲烷类染料的表现脱色多是通过吸附脱色来实现的, 因此利用霉菌处理染料废水时一般将细胞进行固定化, 以提高细胞的利用率和脱色效果。董新姣等^[27]利用玉米芯对青霉 X5 进行固定化, 并进一步研究了固定化青霉 X5 对孔雀石绿的脱色条件, 最佳脱色率达 96.1%, 且重复实验表明固定化青霉 X5 经过 4 次重复利用后, 固定化细胞的结构仍然良好, 脱色率仍在 90% 以上。研究结果还表明, 对染料进行吸附脱色的霉菌其脱色活性与固定化的材料及霉菌细胞的生长活性相关。

对酵母脱色三苯基甲烷类染料的研究开始也较早。1985 年, Kwasniewska 等^[28]就已报道酵母中的氧化型红酵母能够降解结晶紫使其脱色。研究结果显示氧化型红酵母 *Rhodotorula* sp. 和 *R. rubra* 能够在含有葡萄糖、蛋白胨和胆汁的液体培养基中可降解结晶紫。余志晟等^[29,30]分离到一株酵母菌株 *Pseudozyma rugulosa* 48, 除对偶氮染料具有较高脱色效率外, 对三苯基甲烷类染料酸性媒介漂蓝 B 也有较好的脱色效果。此后又分离到一株对酸性媒介漂蓝 B 的脱色率达到 93% 的克鲁斯假丝酵母 (*Candida krusei*)。

2.3 藻类

Daneshvar 等^[31]发现微藻中的 *Cosmarium* sp. 可以对三苯基甲烷类染料如孔雀石绿进行脱色。在进一步的研究中, Daneshva 等^[32]还利用田口法 (Taguchi method) 对 4 种藻类细胞 (*Cosmarium*、*Chlorella*、*Chlamydomonas* 和 *Euglena*) 降解孔雀石绿的最优条件进行了研究, 结果表明, 温度、pH、染料初始浓度以及藻体种类是影响脱色的关键因素。其中, 初始 pH 值对脱色率影响最大, pH 值为 10 时脱色效果最佳, 并且藻细胞 *Chlorella* sp. 在连

续批式培养实验中能够保持 43.5 h 稳定的降解活性。国内关于藻类对三苯基甲烷类染料脱色的研究报道很少。由于藻类细胞具有稳定性好及可对染料进行生物吸附、生物转化和生物絮凝^[32]等优点, 因此研究藻类对三苯基甲烷类染料的脱色降解前景诱人。

3 三苯基甲烷类染料脱色降解机理的研究

3.1 三苯基甲烷类染料的细菌和放线菌降解产物分析

有关细菌及放线菌对三苯基甲烷类染料脱色降解产物的分析研究始于上世纪 80 年代, Yatome 等^[5]采用薄层层析(TLC)分析 *Pseudomonas pseudomallei* 13NA 对甲基紫和结晶紫降解产物时发现某些未知产物。直到 90 年代初, Yatome 等^[6,16]才又通过薄层层析(TLC)和气质联用(GC-MS)确定了枯草杆菌 *B. subtilis* IF0 13719 和放线菌 *N. corallina* 降解结晶紫的主要代谢产物均为米氏酮(4,4'-bis dimethylamino benzophenone, Michler's Ketone)和二甲氨基苯酚(α -dimethylaminophenol), 但并未对相关的脱色酶和脱色机理进行研究。任随周等^[33]在分析从 *Aeromonas hydrophila* DN322 分离得到的氧化脱色酶 TpmD 降解结晶紫的产物时同样检测到米氏酮的存在, 但未检测到另一产物二甲氨基苯酚的存在, 推测其有可能已被进一步降解。另外, Chih-Hung Chen 等^[14]在分析 *Shewanella* sp. NTOU1 在厌氧条件下降解结晶紫的产物时, 也同时检测到米氏酮和二甲氨基苯这两种产物。以上研究表明, 不同种类的细菌及放线菌对于三苯基甲烷类染料的脱色降解机理可能是相似的, 至少其初步降解产物相同, 但降解反应的具体过程、机理、其产物能否被继续降解以及参与脱色降解的酶系还需要更深入的研究。

3.2 三苯基甲烷类染料的真菌降解产物分析

由于真菌中的非特异性降解酶系对各种染料都具有脱色降解作用, 研究和应用已较为成熟和广泛, 因此到目前为止有关三苯基甲烷类染料生物脱色降解产物分析的研究大多是在真菌中开展的。Bumpus 和 Brock^[20]首次在研究白腐真菌 *P. chrysosporium* 在限氮条件下的木质素培养液能够降解结晶紫时, 在反应产物中检测到了 3 个无色的依次去甲基化的降解产物, 分别为 N,N,N',N',N''-五甲基副品红, N,N,N',N''-四甲基副品红和 N,N',N''-三甲基副品红。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

研究发现纯化的木质素过氧化物酶也能够催化结晶紫的去甲基化反应,证明白腐真菌对结晶紫的脱色降解是木质素降解系统在发挥作用。除结晶紫外,其他的三苯基甲烷类染料也能够被白腐真菌降解。Cha^[34]等利用 HPLC 和 HPLC-MS 技术在丝状真菌 *Cunninghamella elegans* ATCC36112 漆酶降解孔雀绿的反应物中检测到了孔雀绿及无色孔雀绿依次去甲基化后的脱色反应产物。由此可见真菌中的木质素酶系对三苯基甲烷类染料的脱色均是通过去甲基化过程实现的。

4 三苯基甲烷类染料脱色酶及相关基因的研究

目前,国内外研究者已发现多种可降解三苯基甲烷类染料的脱色酶及并对相关基因进行了研究。真菌中的木质素酶系、真菌和分枝杆菌中的细胞色素 P450 单加氧酶、柠檬酸杆菌中的三苯基甲烷类染料还原酶 TMR、嗜水气单胞菌中的三苯基甲烷类染料脱色酶 TpmD 等脱色酶及各种脱色基因已成为研究热点。

4.1 木质素酶系

目前国内外研究发现大多数真菌对染料的降解均与木质素降解酶系有关。木质素降解酶系主要包括木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶和漆酶。该降解酶系是真菌在限营养条件下次生代谢产生的一类非特异性酶类,可降解木质素并能够对多种染料进行降解脱色。

木质素过氧化物酶(Lip)和锰过氧化物酶(Mnp)均是含血红素辅基的过氧化物酶,依赖 H_2O_2 为电子受体,在有氧条件下被 H_2O_2 激活,经过单电子氧化等一系列非酶促反应,生成两个有活性的酶反应中间体以攻击染料分子,并将其氧化成自由基,染料本身被氧化脱色,形成一个以自由基为基础的链式反应过程,这些反应包括 C-C 键断裂、开环反应、侧链裂解等^[35,36]。前面提到的木质素酶系对三苯基甲烷类染料的去甲基化降解即为自由基催化的反应。吕聪等^[37]在研究茯苓 *Poria cocos* 发酵产生的锰过氧化物酶对结晶紫脱色时发现影响脱色效率的首要因素为 H_2O_2 ,也证实锰过氧化物酶对三苯基甲烷类染料的降解是自由基催化反应。

漆酶(Laccase)是一种含铜的酶蛋白,以 O_2 作为

电子受体催化多酚化物经四次单电子传递形成醌及自由基,然后同样以链式反应的形式传递自由基使底物被氧化而降解除色^[38]。虽然漆酶的底物为蒽醌类染料,但已证实仅产生漆酶的真菌 *Coriolus versicolor* f. *antarcticus*^[39]可对 6 mg/L 的孔雀石绿达到 88%的脱色率。朱海潇等^[40]也发现凤尾菇 *Pleurotus eryngii* 发酵得到的漆酶对三苯基甲烷类染料孔雀石绿和结晶紫均有降解脱色能力,脱色率分别达到 72.3%和 50%。研究还发现,漆酶在一些小分子氧化还原介体的协助下具有更强的催化氧化能力。刘友勋等^[41]通过研究漆酶及其介体系统对孔雀绿的脱色效果和产物,证明漆酶介体系统有更高的脱色效率,而且漆酶和漆酶介体系统对孔雀绿的脱色机制不同,前者的作用机制为脱甲基,而后的脱色机制为自由基介导的聚合反应。

木质素降解酶系的基因研究起始较早,早在上世纪八、九十年代,研究者就已对木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶和漆酶的基因进行了克隆,3种酶都各得到了十几种基因,其中某些基因已成功进行了同源及异源表达^[42,43],并已广泛应用于木质素降解及染料生物脱色中。

4.2 细胞色素 P450 单加氧酶

有关细胞色素 P450 与三苯基甲烷类染料的脱色降解之间的关系早有报道。早在 1982 年,Harrelson 和 Mason^[44]就发现小鼠肝脏微粒体能够通过细胞色素 P450 单加氧酶系催化的单电子还原反应将结晶紫脱色,生成一个以碳原子为中心的自由基。这一反应能够被一氧化碳和甲吡酮抑制,NADPH 和 NADH 均可成为产生这种自由基的电子供体。

在微生物降解三苯基甲烷类染料的过程中也发现了细胞色素 P450 单加氧酶的作用。Cha 等^[34]在利用真菌 *Cunninghamella elegans* ATCC36112 降解孔雀绿时发现甲吡酮可抑制脱色反应,表明该脱色反应中有细胞色素 P450 单加氧酶的参与。在研究病原分枝杆菌 *M. chelonae* 和 *M. avium* 对孔雀石绿进行脱色的过程中,Jone 和 Falkinham^[17]也发现了甲吡酮对该反应的抑制作用,说明分枝杆菌的脱色过程也需要细胞色素 P450 单加氧酶的参与。但以上有关细胞色素 P450 单加氧酶参与三苯基甲烷类染料的微生物脱色反应仅是根据甲吡酮抑制实验得出的结论,而具体的反应机理还有待于进一步的研究。

4.3 三苯基甲烷类染料还原酶 TMR

虽然已发现多种细菌可对三苯基甲烷类染料进行脱色,但一直没有从细菌中找到三苯基甲烷类染料相关脱色酶及其基因。2004年,韩国的 Moon-Sun Jang 等^[45]通过 Tn5 随机突变从柠檬酸杆菌 *Citrobacter* sp. KCTC 18061P 筛选到孔雀石绿脱色功能缺失突变株,得到几个孔雀石绿脱色相关基因。后来又从中分离纯化得到一种三苯基甲烷类染料还原酶 TMR,并对其催化特性及反应产物进行了研究,并将该酶的基因进行了克隆及大肠杆菌异源表达^[46,47]。研究表明,该酶是由 2 个 31 kD 的亚基组成的同型二聚体,其催化过程依赖 NADH 提供电子且具有底物特异性,在 60°C、pH 9.0 时具有最大酶活。TMR 催化的反应是通过去甲基的方式将结晶紫和孔雀石绿转化为无色产物,其反应过程类似于真菌中木质素酶系对三苯基甲烷类染料的脱色,且对于侧链基团为二乙基的灿烂绿及无烷基侧链的溴酚蓝都不能够催化脱色。

经后续定点突变研究表明辅酶 NADH 结合位点“GXXGXXG”中 3 个甘氨酸分别突变为丙氨酸后,其脱色效率会有不同程度降低,表明催化过程中不同位点的甘氨酸在酶与底物及辅酶结合上起到不同的作用,但都与酶的催化活性有关,而其它的功能信息则仍然没有得到。

Myung Hee Kim 等^[48]进一步得到 TMR/NADP⁺ 晶体在 2.0 Å 分辨率下的结构,经分析可知该酶属短链脱氢酶/还原酶(Short-chain dehydrogenase/reductase, SDR)家族。进一步通过以孔雀石绿作为底物进行模拟分子嵌入并结合一系列的定点突变实验,说明了 TMR 对三苯基甲烷类染料还原的分子机制。对 TMR 的一系列研究不仅为三苯基甲烷类染料生物脱色提供了一种高效、特异性的脱色酶,其分子机制的阐明更对三苯基甲烷类染料的微生物降解机理研究具有重要意义。

4.4 三苯基甲烷类染料氧化酶 TpmD

任随周等^[49]从嗜水气单胞菌 DN322 中分离到高效降解三苯基甲烷类染料脱色酶 TpmD,并对该酶的酶学特性进行了研究,结果显示该脱色酶的亚基分子量(M_r)为 29.4 kD,等电点(pI)为 5.6,适宜作用温度是 40°C~60°C,适宜 pH 值为 5.5~9.0,该酶也是 NADH/NADPH 依赖型酶,其最适底物为结晶紫。与还原酶 TMR 不同的是 TpmD 依赖分子氧,是一种

氧化酶,且其能够对侧链基团为二乙基的灿烂绿进行脱色。

进一步研究结果表明^[50], TpmD 对甲吡酮抑制作用敏感,为细胞色素 P450 单加氧酶家族的特别成员;但其在还原条件下通入 CO 气体后在 450 nm 处并无细胞色素 P450 氧化酶特征吸收峰出现,表明该酶可能是一种与典型细胞色素 P450 氧化酶不同的新型氧化酶。这是国内外首次在细菌中发现以氧化方式对三苯基甲烷类染料进行降解脱色的酶,其降解机理的深入研究可能为三苯基甲烷类染料脱色提供新的途径。

4.5 其它相关脱色基因的研究

除上述已分离纯化的脱色酶之外,德国的 Andreas Schlüter^[51]等还从废水处理反应器的细菌种群中分离得到一个 60 kb 大小的质粒,属于 IncP-1 代谢质粒,命名为 pGNB1。该质粒中的 *tmr* 基因与三苯基甲烷类染料还原酶 TMR 的基因序列具有 99.7% 的同源性,且将该基因克隆后发现能够抗结晶紫并能够对三苯基甲烷类染料进行脱色。研究还发现该质粒可自主转移且可转化入 α -与 γ -型细菌中,并赋予宿主菌三苯基甲烷类染料脱色活性,显示该质粒具有高水平迁移能力,宿主菌的广谱性使其能够更好的应用于染料废水的生物处理中。Denise Guerra-Lopez 等^[52]在研究证明分支杆菌属 (*Mycobacterium* sp.) 对三苯基甲烷类染料有脱色作用后,对菌株 *M. smegmatis* mc²155 建立了突变库,筛选出一批功能缺失突变株后发现基因 *fbiC* 及 MSMEG_2392 与三苯基甲烷类染料脱色相关;并通过 HPLC 对突变株及回补突变株进行降解产物分析后证实 MSMEG_2392 基因与辅酶 F₄₂₀ 的合成相关。而有关辅酶 F₄₂₀ 在三苯基甲烷类染料脱色中的具体作用还在进一步研究中。

虽然对三苯基甲烷类染料脱色酶及脱色基因的研究已取得了上述研究成果,但某些酶的催化机理仍不清楚。而且对于脱色酶催化的脱色反应中,染料分子的化学结构变化及其中间产物或无色终产物是否仍然具有毒性还有待于进一步深入研究。

5 展望

随着微生物分离和培养技术以及分子生物学技术的迅猛发展,大量对三苯基甲烷类染料具有高效脱色功能的微生物菌株将被分离和纯化,其相关的

脱色机理也得到了进一步的研究。但是,大多数菌株的分离和纯化是基于实验室条件的,排除了其它物理、化学以及生物因素的影响,而且研究的对象往往是单种染料。另外,国内外对于三苯基甲烷类染料脱色机制与机理的研究起步较晚,研究方向也仅限于对相关脱色酶及脱色基因的研究,而针对三苯基甲烷类染料降解途径及降解中间产物的研究报告很少。

针对以上所述的研究进展和不足,笔者认为未来研究重点可能集中在以下几个方面:1)在基础研究方面,进一步深入研究三苯基甲烷类染料的降解途径、分子机制及降解中间产物,并深入研究中间产物的性质,确定其有无更严重的毒性及可否进一步降解;2)在应用方面,首先是更广泛地发掘具有三苯基甲烷类染料脱色能力的微生物资源及其基因资源,尤其关注那些具有广谱高效降解能力且可应用于实际废水处理和污染环境生物修复过程中的脱色菌;其次在原位环境中调节各种理化参数,激发印染废水处理装置及污染环境中原位菌群的活性,克服外源菌株竞争性不强,容易退化的不足;还可以利用不同微生物之间的协同作用对三苯基甲烷类染料进行吸附与脱色降解,如倪建国等^[53]利用真菌中具有吸附作用的曲霉和具有染料脱色降解功能的细菌菌株协同作用可将废水中的染料集中在小环境中快速降解;另外是从已发现的三苯基甲烷类染料脱色菌中选出广谱高效的非致病性菌,如枯草杆菌,开发研制成高效脱色的微生物制剂或将分离到的各种脱色降解酶如 TpmD 制成酶制剂应用于印染废水处理及环境生物修复中。

参 考 文 献

- [1] Azmi W, Sani RK, Banerjee UC. Biodegradation of triphenylmethane dyes. *Enzyme Microb Technol*, 1998, **22**: 185-191.
- [2] Au W, Pathak S, Collie CI, et al. Cytogenic toxicity of gentianviolet (crystal violet) on mammalian cells *in vitro*. *Mutat Research*, 1978, **58**: 269-276.
- [3] Shivaji Srivastava, Ranjana Sinha, Roy D. Toxicological effects of malachite green. *Aquatic Toxicology*, 2004, **66**: 319-329.
- [4] 周 琪, 赵由才. 染料对人体健康和生态环境的危害. *环境与健康杂志*, 2005, **22**(3): 229-231.
- [5] Yatome C, Ogawa T, Koga D, et al. Biodegradability of azo and triphenylmethane dyes by *Pseudomonas pseudomullei* 13NA. *J Sot Dyers Cokmrists*, 1981, **97**: 166-168.
- [6] Yatome C, Ogawa T, Matsui M. Degradation of crystal violet by *Bacillus subtilis*. *J Environ Sci Health*, 1991, **26**: 75-87.
- [7] Sani RK, Banerjee UC. Decolorization of Triphenylmethane dyes and textile and dye-stuff effluent by *Kurthia* sp.. *Enzyme and Microbial Technology*, 1999, **24**: 433-437.
- [8] AN SY, Min SK, Cha IH, et al. Decolorization of triphenylmethane and azo dyes by *Citrobacter* sp.. *Biotechnol Lett*, 2002, **24**: 1037-1040.
- [9] Sharma DK, Saini HS, Singh M, et al. Isolation and characterization of microorganisms capable of decolorizing various triphenylmethane dyes. *Journal of Basic Microbiology*, 2004, **44**(1): 59-65.
- [10] 林少芳, 余 萍, 林玉满. 一株绿脓假单胞菌对碱性孔雀绿脱色的初步研究. *福建师范大学学报*, 2004, **20**(4): 72-75.
- [11] Suizhou Ren, Jun Guo, Guoqu Zeng, et al. Decolorization of triphenylmethane, azo, and anthraquinone dyes by a newly isolated *Aeromonas hydrophila* strain. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **72**: 1316-1321.
- [12] 林玉满, 余 萍, 林少芳, 等. 7 株处理印染废水细菌的分离及鉴定. *福建师范大学学报(自然科学版)*, 2008, **24**(2): 105-108.
- [13] Daiyong Deng, Jun Guo, Guoqu Zeng, et al. Decolorization of anthraquinone, triphenylmethane and azo dyes by a new isolated *Bacillus cereus* strain DC11. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2008, **62**: 263-269.
- [14] Chih-Hung Chen, Chin-Feng Chang, Chuan-Hsin Ho, et al. Biodegradation of crystal violet by a *Shewanella* sp. NTOU1. *Chemosphere*, 2008, **72**: 1712-1720.
- [15] 胡起靖, 林玉满, 甘 莉, 等. 一株嗜麦芽寡养单胞菌对结晶紫的脱色条件研究. *福建师范大学学报(自然科学版)*, 2008, **24**(2): 75-79.
- [16] Yatome C, Yamada S, Ogawa T, et al. Degradation of Crystal Violet by *Nocardia corullina*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1993, **38**: 565-569.
- [17] Jones JJ, Falkinham JO. Decolorization of malachite green and crystal violet by waterborne pathogenic mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, **47**: 2323-2326.
- [18] 李慧蓉. 白腐真菌生物学和生物技术. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [19] Glenn JK, Gold MH. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol*, 1983, **45** (6): 1741-1747.
- [20] Bumpus JA, Brock BJ. Biodegradation of Crystal Violet by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**: 1143-1150.
- [21] Yesilada O. Decolourization of Crystal Violet by fungi. *World J Microbial Biotechnol*, 1995, **11**: 601-602.
- [22] Knapp JS, Newby PS, Reece LP. Decolorization of

- wood-rotting basidiomycete fungi. *Enzyme Microb Technol*, 1995, **17**: 664–668.
- [23] Vasdev K, Kuhad RC, Saxena RK. Decolorization of triphenylmethane dyes by the bird's nest fungus, *Cyathus bulleri*. *Curr Microbiol*, 1995, **30**: 269–272.
- [24] Ivana Eichlerova, Ladislav Homolka, Frantisek Nerud. Synthetic dye decolorization capacity of white rot fungus *Dichomitus squalens*. *Bioresour Technol*, 2006, **97**: 2153–2159.
- [25] 张晓昱, 颜克亮, 王宏勋, 等. 稻草基质中白腐菌降解三苯基甲烷类染料机制探讨. *环境科学学报*, 2006, **26**(8): 1284–1289.
- [26] 黎小军, 林陈水, 许明, 等. 白腐菌 ZJ-6 的筛选及对合成染料的脱色研究. *江西师范大学学报*, 2006, **30**(6): 543–546.
- [27] 董新姣, 谢荣敏. 固定化青霉 X5 对孔雀石绿的脱色研究. *环境污染治理技术与设备*, 2006, **7**(1): 45–49.
- [28] Kwasniewska K. Biodegradation of Crystal Violet (hexamethyl-prosaniline chloride) by oxidative red yeasts. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1985, **34**: 323–330.
- [29] 余志晟, 文湘华. 酵母菌株 *Pseudozyma rugulosa* 对合成染料脱色的初步研究. *环境化学*, 2005, **24**(2): 186–188.
- [30] 余志晟, 文湘华. 酵母 *Candida krusei* 对合成染料的脱色. *环境科学*, 2005, **26**(5): 137–142.
- [31] Daneshvar N, Ayazloo M, Khataee AR, et al. Biological decolorization of dye solution containing Malachite Green by microalgae *Cosmarium* sp.. *Bioresour Technol*, 2007, **98**: 1176–1182.
- [32] Daneshvar N, Khataee AR, Rasoulifard MH, et al. Biodegradation of dye solution containing Malachite Green: Optimization of effective parameters using Taguchi method. *Journal of Hazardous Materials*, 2007, **143**: 214–219.
- [33] 任随周. 处理印染废水的 ABR 反应器中微生物生态与脱色菌 DN322 的研究. 中国科学院研究生院博士学位论文, 2005.
- [34] Cha CJ, Doerge DR, Cerniglia CE. Biotransformation of malachite green by the fungus *Cunninghamella elegans*. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(9): 4358–4360.
- [35] 金敏, 李君文. 白腐菌处理染料废水的研究进展. *环境污染治理技术与设备*, 2003, **4**(3): 54–57.
- [36] 李蒙英, 孟祥勋. 真菌对染料废水脱色降解的研究进展. *环境污染治理技术与设备*, 2002, **3**(10): 19–22.
- [37] 吕聪, 曹福祥, 董旭杰. 锰过氧化物酶对结晶紫脱色的研究. *中南林业科技大学学报*, 2008, **28**(3): 172–174.
- [38] 梁利华, 杨东虎, 阚振荣. 白腐真菌对染料废水脱色及降解的研究. *生物学杂志*, 2003, **20**(3): 5–8.
- [39] Levin L, Papinutti L, Forchiassin F. Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin modifying enzymes and decolorize industrial dyes. *Bioresour Technol*, 2004, **94**: 169–176.
- [40] 朱海潇, 黄桂英, 王霖, 等. 凤尾菇漆酶性质及应用的研究. *福建农业学报*, 2008, **23**(1): 48–52.
- [41] 刘友勋, 颜克亮, 熊征, 等. 漆酶介体系统对孔雀绿的脱色研究. *环境科学与技术*, 2008, **31**(7): 37–39.
- [42] 刘尚旭, 赖寒. 木质素降解酶的分子生物学研究进展. *重庆教育学院学报*, 2001, **14**(3): 64–67.
- [43] 钞亚鹏, 钱世钧. 真菌漆酶及其应用. *生物工程进展*, 2001, **21**(5): 23–27.
- [44] Henderson AL, Schmitt TC, Heinze TM, et al. Reduction of malachite green to leucomalachite green by intestinal bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 4099–4101.
- [45] Moon-Sun Jang, Young-Mi Lee, Yong-Lark Choi, et al. Isolation of *Citrobacter* sp. mutants defective in decolorizing malachite green. *J Basic Microbiol*, 2004, **44**(4): 320–324.
- [46] Moon-Sun Jang, Young-Mi Lee, Cheorl-Ho Kim, et al. Triphenylmethane reductase from *Citrobacter* sp. strain KCTC 18061P: purification, characterization, gene cloning, and overexpression of a functional protein in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(12): 7955–7960.
- [47] Moon-Sun Jang, Nam-Young Kang, Kyoung-Sook Kim, et al. Mutational analysis of NADH-binding residues in triphenylmethane reductase from *Citrobacter* sp. strain KCTC 18061P. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, **271**(1): 78–82.
- [48] Myung Hee Kim, Yoon Jeong Kim, Hyo-Jung Park, et al. Structural insight into bioremediation of triphenylmethane dyes by *Citrobacter* sp. triphenylmethane reductase. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, **283**: 31981–31990.
- [49] 任随周, 郭俊, 王亚丽, 等. 细菌脱色酶 TpmD 对三苯基甲烷类染料脱色的酶学特性研究. *微生物学报*, 2006, **46**(3): 385–389.
- [50] 任随周, 郭俊, 王亚丽, 等. 细菌脱色酶 TpmD 的酶学特性研究. *微生物学报*, 2006, **46**(5): 823–826.
- [51] Andreas Schlüter, Irene Krahn, Florian Kollin, et al. IncP-1 β plasmid pGNB1 isolated from a bacterial community from a wastewater treatment plant mediates decolorization of triphenylmethane dyes. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73**(20): 6345–6350.
- [52] Denise Guerra-Lopez, Lacy Daniels, Mamta Rawat. *Mycobacterium smegmatis* mc² 155 fbiC and MSMEG_2392 are involved in triphenylmethane dye decolorization and coenzyme F420 biosynthesis. *Microbiology*, 2007, **153**: 2724–2732.
- [53] 倪建国, 李蒙英, 孟祥勋, 等. 真菌和细菌协同作用对染料的吸附与脱色降解. *环境工程学报*, 2007, **1**(4): 48–52.