

一株高效广谱染料降解细菌的分离鉴定及其 脱色特性初探

李慧 曲媛媛* 时胜男 周集体

(大连理工大学环境学院 环境微生物实验室 辽宁 大连 116023)

摘要: 从土壤样品中分离到一株高效染料脱色菌株 N-4, 根据形态学特征及 16S rDNA 基因序列分析, 该菌株初步鉴定为 *Leucobacter* sp.。利用表面响应法(RSM)对菌株 N-4 脱色活性深蓝 K-R 的主要因素进行优化, 实验结果表明, 菌株 N-4 脱色 K-R 的最优条件为: 湿菌量 10 g/L, 染料浓度 222 mg/L, 硫酸铵 1.5 g/L, 果糖 3.5 g/L, 最佳脱色率为 100%。此外, 实验证明其对多种染料均具有较高的脱色效率。同时, 考察了金属离子对染料脱色效率的影响, 其中 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Mn^{2+} 等对脱色具有促进作用, 而 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 对脱色具有明显的抑制作用。

关键词: 活性深蓝 K-R, 脱色, 表面响应法

Isolation and characterization of a dye-colorizing bacterial strain

LI Hui QU Yuan-Yuan* SHI Sheng-Nan ZHOU Ji-Ti

(School of Environmental Science and Technology, Dalian University of Technology, Laboratory of Environmental Microbiology, Dalian, Liaoning 116023, China)

Abstract: A new dyes-decolorizing bacterial strain N-4 was isolated from soil sample. It was identified as *Leucobacter* sp. by 16S rDNA gene sequence analysis. The optimal conditions for the decolorization of the reactive dark blue K-R determined by response surface methodology (RSM) were as follows: 10 g/L of strains N-4, 222 mg/L of initial dye concentration, 1.5 g/L of $(NH_3)_2SO_4$ and 3.5 g/L of fructose. It was shown that about 100% of 222 mg/L dye could be decolorized within 10 h under these conditions. Besides, strain N-4 could decolorize 9 kinds of dyes effectively. And K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} could improve the decolorization, while Ni^{2+} , Cu^{2+} and Hg^{2+} inhibited the decolorization obviously.

Keywords: Reactive dark blue K-R, Decolorization, Response surface methodology

金属络合染料应用广泛并且其所含的金属大部分为铬,其次是铜,还有镍、钴、铁等,这些金属均具有很高的生物毒性和生物富集性,难于生物降解,长期滞留于环境中^[1-2],因此对该类废水的处理成为亟待解决的一大难题。传统的物理和化学方法对于染料的处理存在一些缺点如形成副产物、费用高,引起二次污染等。生物法能耗小,处理效率高,二次污染少,是处理这类废水的首选方法^[3-4]。活性深蓝 K-R 是重要的金属络合染料。然而,关于活性深蓝 K-R 生物脱色的研究报道甚少,2010 年本研究室首次利用真菌-协同脱色活性深蓝 K-R^[5]。目前,关于 *Leucobacter* sp. 菌属菌株脱色染料的研究报道很少,该菌属主要应用于金属离子的吸附研究^[6]。表面响应法是一种普遍的过程优化方法,它不仅能在有限的实验次数下,描述出各个因子的影响,而且还能评估各个因子之间的相互作用^[7]。本研究首次考察 *Leucobacter* sp. N-4 脱色金属络合染料活性深蓝 K-R 性能,利用表面响应法研究脱色过程各因素之间的相互作用,确定最佳脱色条件,考察金属离子对脱色效果的影响,旨在为该菌株的工业化应用提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器: JASCO V-560 型紫外-可见分光光度计(日本), PB-20 型 pH 计(德国塞多利斯), ZHWY-2102C 型恒温摇床(上海智城分析仪器), 920-II 型洁净工作台(上海净化厂), AvantiTM J-30 I 型高速低温冷冻离心机(美国贝克曼公司)。

1.1.2 试剂: 本实验中所用到的染料(活性红、离子红、酸性大红 GR、酸性金黄 G、活性红 X-3B、酸性红 B、直接耐晒蓝、活性艳蓝和活性深蓝 K-R)均来自大连理工大学染料合成实验室的(分析纯),其余实验药品均为国产分析纯。

1.1.3 菌株来源: 菌株 N-4 是通过浓度梯度筛选法从土壤样品中分离、纯化得到的。

1.1.4 培养基: (1) LB 培养基(筛选,培养用, g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 10。调节 pH 到 7.0 (配制

固体培养基时另加入 2% 的琼脂)。

(2) 厌氧无机盐培养基(染料厌氧脱色用, g/L): NaHCO₃ 1, K₂HPO₄ 0.2, MgSO₄·7H₂O 0.2。

1.2 方法

1.2.1 菌株的 16S rDNA 鉴定: 挑取 LB 培养基平板上生长的单菌落溶于 10 μL 灭菌水中, 99 °C 变性后离心取上清液作为 PCR 扩增反应的模板。使用 TaKaRa 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit, 以 Forward primer/Reverse primer 1 为引物, 扩增目的片段。PCR 反应体系总体积为 50 μL: PCR premix 25 μL, Forward primer 0.5 μL, Reverse primer 2 0.5 μL, 模板 DNA 5 μL, 超纯水 19 μL。PCR 反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 30 个循环; 72 °C 5 min, 取 5 μL PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后紫外检测。使用 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 (大连宝生物公司 TaKaRa) 切胶回收 PCR 产物。16S rDNA 的测序工作由大连宝生物公司完成, 将测得的序列用 BLAST 软件与已知的 16S rDNA 基因序列进行同源性比较, RDP II 数据库的 Classifier 程序归类, 并用 Clustal X1.8 软件进行系统发育树的构建。

1.2.2 菌体的制备: 首先从固体培养基上刮取少量菌体, 转接于装有 25 mL LB 培养基的 50 mL 锥形瓶中, 于 30 °C、150 r/min 振荡培养 12 h。然后从中取出 2 mL 菌液, 转接于装有 100 mL LB 培养基的 250 mL 锥形瓶中, 于 30 °C、150 r/min 振荡培养 12 h, 离心(10 000 r/min, 5 min), 并用 0.1 mmol/L 的磷酸缓冲溶液(pH 7.0)洗涤 2 次, 弃去上清, 将沉淀悬浮于相同缓冲溶液中, 4 °C 冰箱备用。

1.2.3 脱色试验及脱色率的测定: 根据实验要求称取一定量的菌体于 16 mL 厌氧无机盐培养基中, 加入一定浓度的染料, 并添加一定量的碳、氮源, 于 30 °C 恒温箱中, 静置厌氧培养。一定时间后, 取出一定量的培养物 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 用紫外分光光度计测出在最大吸收波长下的吸光度值, 并与不接种菌体的染料溶液进行对比计算脱色率。

脱色率=(A-B)/A×100%。

A: 不接种菌液的最大吸光度值;

B: 接种菌液脱色一定时间后的吸光度值。

2 结果与讨论

2.1 菌株的分离

经过分离纯化和浓度梯度筛选得到一株细菌, 命名为 N-4。如图 1A 所示, 菌株 N-4 在固体培养基上菌落为金黄色, 约 1 mm-3 mm, 圆形, 表面光滑湿润, 边缘整齐, 易挑取。

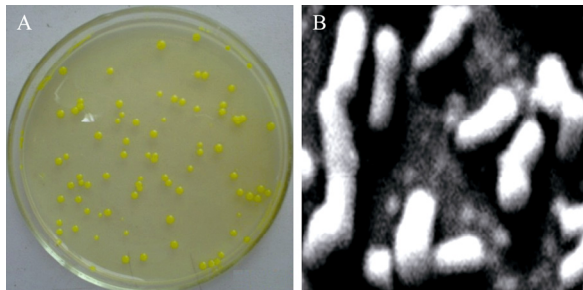


图 1 菌株 N-4 的菌落形态(A)和细胞形态(B)
Fig. 1 The colonial morphology of strain N-4 (A) and the electron microscopical micrograph (B)

2.2 菌株的 16S rDNA 序列分析

本研究以菌株 N-4 的单菌落 99 °C 煮 10 min 释放的总 DNA 为模板, 利用 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增, 得到长度约 1 500 bp 的 PCR 产物, 将 PCR 产物进行切胶回收后直接测序, 测得序列长为 1 465 bp。将菌株 N-4 的 16S rDNA 序列用 RDP II 数据库的 Classifier 程序进行归类, 结果表明菌株 N-4 为 Actinobacteria 门, *Leucobacter* 属。应用 NCBI 数据库中的 BLAST 进行相似性分析, 说明菌株 N-4 的 16S rDNA 序列与 GenBank 数据库中已知序列中的 *Leucobacter chromiireducens* subsp. *solipictus* nov 序列相似性高达 99%, 故将其命名为 *Leucobacter* sp. N-4, 构建的系统进化树如图 2 所示。

2.3 不同碳、氮源对脱色效率的影响

碳源和氮源是影响菌株生长的主要因素^[8], 在染料脱色过程中也间接地影响对染料的脱色效果, 故本实验中分别选取了几种常用的碳源和氮源, 考察了其对染料脱色效率的影响。

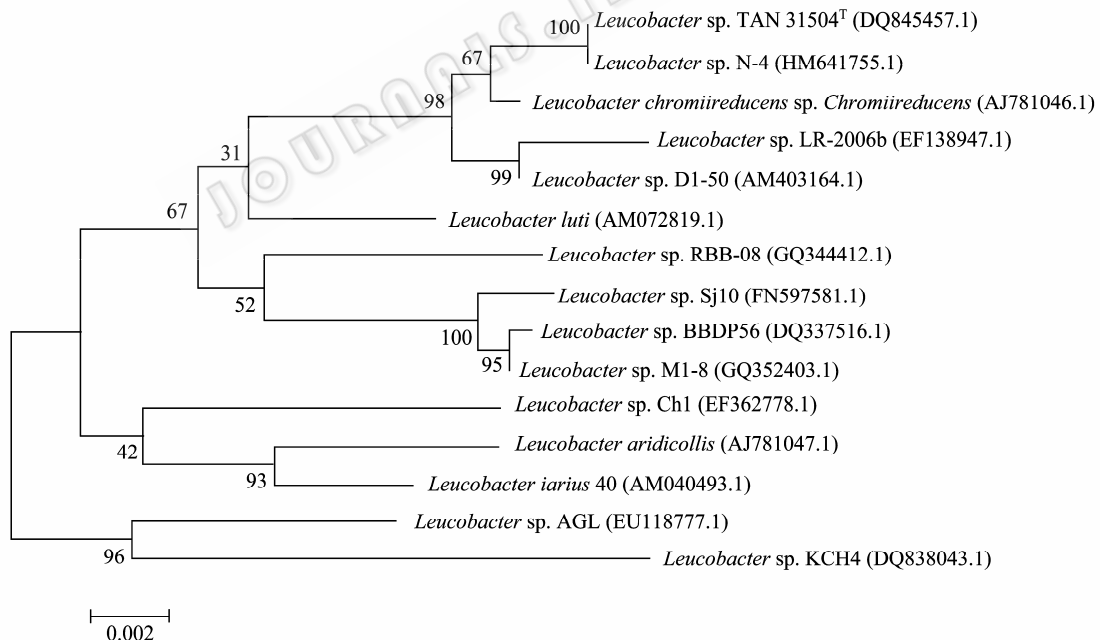


图 2 菌株 N-4 的 16S rDNA 基因序列系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree derived from 16S rDNA gene sequence of strain N-4

注: 线段 0.01 代表分支的序列差异; 括号内序号为 GenBank 中的登录号; 数字为菌株的相似性。

Note: The tree was constructed and bootstrapped (1 000 samples) from a sequence alignment of 16S rDNA genes using the neighbor-joining (NJ) method. Bar 0.01 represents sequence divergence. The GenBank accession number are showed in parentheses after each strain name, numeral represents comparability.

从图 3 可以看出碳源对脱色的影响不大, 其脱色效果均在 85%以上, 其中脱色效果最好的是果糖, 其脱色率可达到 95%以上。而氮源对脱色的影响比较大, 其中硝酸盐明显的抑制脱色的进行, 其中脱色效果最好的是硫酸铵和酵母粉, 其脱色速率均达到了 95%以上。所以在以后的实验中我们将选取果糖和硫酸铵分别作为染料脱色过程中的碳源和氮源。

2.4 表面响应法优化菌株 N-4 对染料 K-R 的脱色效率

利用表面响应法优化菌株 N-4 对染料 K-R 的脱色条件, 以菌株 N-4 的接种量(5–10 g/L)、染料浓度(200–400 mg/L)、硫酸铵浓度(1.5–3.5 g/L)和果糖浓度(1.5–3.5 g/L) 作为优化因子, 采用中心组合法, 利用软件 Design-Expert 007 进行实验设计以及数据分析(表 1)。

脱色条件优化的实测值及 RSM 法预测值如表 2 所示, 由 Design-expert 的 Analysis 模块对结果进行相应曲面拟合, 拟合出的方程为:

$$\text{脱色率(\%)}=87.95+16.57A-13.30B+3.51C-3.30D+9.7AB-2.55AC+4.90AD+0.98BC-6.38BD-1.45CD-8.28A^2-7.61B^2+0.036C^2+0.85D^2。$$

由上式我们可以看出这 4 个因素对染料脱色的影响不是简单的线性关系, 而是存在交互作用, 因此采用单变量考察会产生误差。

利用 ANOVA 方差对结果进行了分析, 其结果如表 2 所示, F 值为 13.44, $P < 0.0001$ 证明该模型具有显著性^[9] (F 值越大越好^[10], $P < 0.05$ 证明考察的因子具有统计学意义)。模型的复相关系数 $R^2=0.9262$, 说明该模型拟合效果较好, 最多只有约 7.38% 的变化不能用此模型来解释^[12]。校正相关系数 $\text{Adj } R^2=0.8573$ 说明模型的预测值与实验值拟合的程度较好。由表 2 可知, 因子 A 、 B 、 AB 、 A^2 和 B^2 的 P 值都小于 0.05, 说明染料浓度和接种量是影响染料脱色的显著影响因素。

利用 Design-Expert 007 软件得出 4 种因子间相互作用的 3D 图(图 4)。图 4A 和 4B 更加直观的显示出染料浓度和接种量是影响脱色效率的主要因素, 且随着染料浓度的增加, 菌株 N-4 对活性深蓝 K-R 的脱色率明显下降, 脱色率由染料浓度为 200 mg/L 时的 75%, 下降到了浓度为 400 mg/L 时的 31% (图 4A)。而果糖和硫酸铵的添加量对脱色的影响不明显(4C, 4D), 通过表 2 可知因素 C 和 D 的 P -value 分别为 0.0947 和 0.1139, 说明这两个因素为非显著性因素, 从而可知两者所得的结果具有一致性。经软件预测得出菌株 N-4 脱色染料活性深蓝 K-R 的最优条件为: 菌量为 10 g/L, 染料浓度为 222 mg/L, 硫酸铵 1.5 g/L, 果糖 3.5 g/L 时的脱色效果较好, 在 10 h 内, 222 mg/L 的染料能够完全脱色。

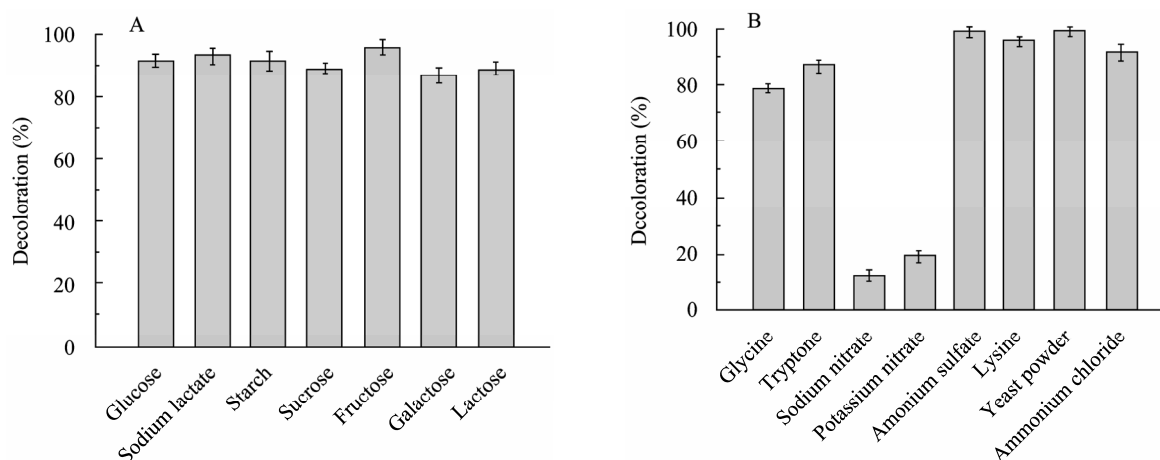


图 3 不同碳源(A)、氮源(B)对染料脱色的影响

Fig. 3 Effects of different carbon source (A) and nitrogen source (B) on decolorization of dye

表1 表面响应模型对菌株 N-4 脱色染料 K-R 效率的拟合结果
Table 1 The design with experimental and predicted values of the decolorization strain N-4 to K-R

序号 No.	因子 A Factor A	因子 B Factor B	因子 C Factor C	因子 D Factor D	实际值 Observed values (%)	预测值 Predicted values (%)
	湿菌体量 Inoculums (g/L)	染料浓度 Dye (mg/L)	硫酸铵的浓度 (NH ₃)SO ₄ (g/L)	果糖浓度 Fructose (g/L)		
1	7.5	500	2.5	2.5	17.39	30.88
2	10.0	200	1.5	3.5	90.56	102.53
3	10.0	400	3.5	1.5	91.03	94.12
4	7.5	300	2.5	4.5	88.31	84.75
5	7.5	300	2.5	2.5	88.66	87.95
6	7.5	100	2.5	2.5	89.73	84.10
7	10.0	200	3.5	3.5	93.04	99.57
8	5.0	400	1.5	3.5	16.15	13.16
9	12.5	300	2.5	2.5	91.62	87.95
10	7.5	300	0.5	2.5	79.71	81.08
11	5.0	200	1.5	3.5	77.21	73.98
12	5.0	200	3.5	3.5	87.30	81.22
13	7.5	300	2.5	2.5	88.00	87.95
14	7.5	300	4.5	2.5	88.61	95.10
15	10.0	200	3.5	1.5	91.23	86.51
16	10.0	400	3.5	3.5	89.37	81.65
17	5.0	200	3.5	1.5	84.34	87.76
18	10.0	200	1.5	1.5	88.14	83.66
19	5.0	200	1.5	1.5	74.71	74.71
20	7.5	300	2.5	2.5	89.22	87.95
21	7.5	300	2.5	2.5	88.04	87.95
22	7.5	300	2.5	2.5	84.97	87.95
23	2.5	300	2.5	2.5	10.17	21.69
24	5.0	400	3.5	1.5	76.09	56.40
25	5.0	400	1.5	1.5	46.09	39.42
26	10.0	400	1.5	3.5	84.22	80.66
27	7.5	300	2.5	2.5	88.79	87.95
28	7.5	300	2.5	0.5	86.53	97.95
29	5.0	400	3.5	3.5	19.99	24.33
30	10.0	400	1.5	1.5	88.95	87.32

表2 响应模型的 ANOVA 分析
Table 2 ANOVA analysis for the decolorization of dye

因素 Source	平方和 SS	平方和 Mean square	F 值 F-value	P 值 P-value (Prob>F)	因素 Source	平方和 SS	平方和 Mean square	F 值 F-value	P 值 P-value (Prob>F)
Model	1 246.42	1 246.42	13.44	<0.000 1	BC	15.52	15.52	0.17	0.688 2
A	6 585.89	6 585.89	71.02	<0.000 1	BD	651.85	651.85	7.03	0.018 1
B	4 248.43	4 248.43	45.82	<0.000 1	CD	33.76	33.76	0.36	0.555 3
C	295.09	295.09	3.18	0.094 7	A ²	1 880.77	1 880.77	20.28	0.000 4
D	261.32	261.32	2.82	0.113 9	B ²	1 590.39	1 590.39	17.15	0.000 9
AB	1 517.99	1 517.99	16.37	0.001 1	C ²	0.04	0.04	0.000 4	0.984 7
AC	103.84	103.84	1.12	0.306 7	D ²	19.81	19.81	0.21	0.650 5
AD	384.30	384.30	4.14	0.059 8					

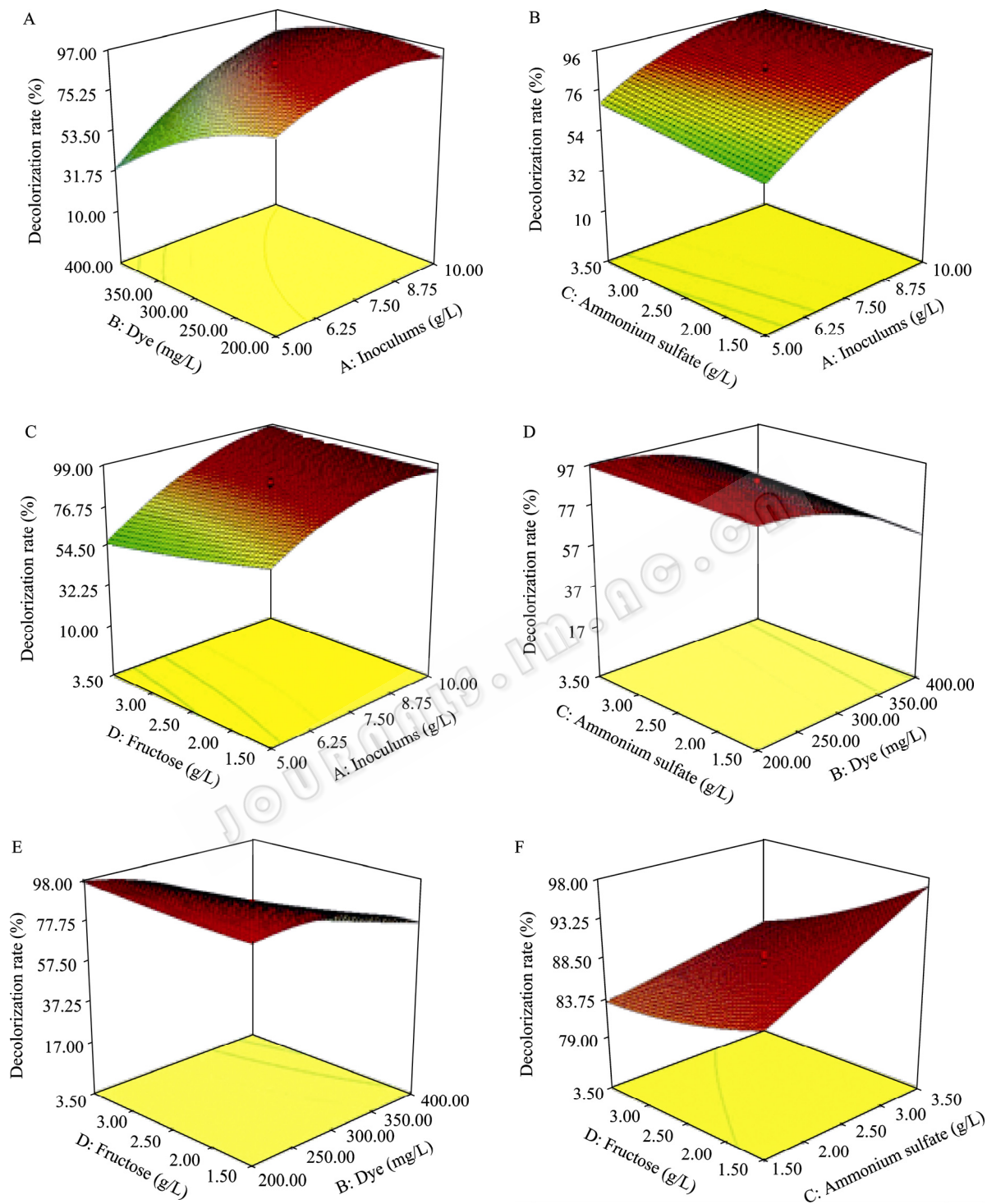


图 4 接种量、染料浓度、硫酸铵浓度和果糖浓度两两相互作用的 3D 响应图

Fig. 4 Response surface plot of decolorization: optimization of medium conditions was strain N-4 inoculums (A), dye concentration (B), $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$ concentration and fructose concentration

2.5 菌株 N-4 对染料脱色的广谱性

为了考察菌株 N-4 对染料脱色的广谱性, 选取了活性染料、阳离子染料、酸性染料和直接染料中几种常用的染料进行了考察。在湿菌体浓度为 5 g/L

的情况下, 向溶液中分别加入不同种类的染料, 使其终浓度为 100 mg/L, 30 °C 厌氧脱色, 菌株 N-4 对不同染料的脱色情况如表 3 所示。

结果表明, 菌株 N-4 对不同染料均具有较好的

表 3 菌株 N-4 对不同染料的脱色效率
Table 3 Decolorization of different dyes by strain N-4

染料名称 Dye	结构式 Structural formula	最大吸光度 λ_{\max} (nm)	Decoloration (%)		染料类型 Types
			10 h	20 h	
Reactive red		543	59.2	90.0	Reactive dye
Cationic red		531	98.1	98.2	Cationic dye
Acid scarlet GR		510	98.1	98.4	Acid dye
Methanil yellow G		442	57.5	92.6	Acid dye
Reactive red X-3B		538	70.6	87.1	Reactive dye
Acid red B		515	90.1	90.4	Acid dye
Direct fast blue		582	80.2	96.0	Direct dye
Reactive brilliant blue		594	92.5	95.9	Reactive dye
Reactive dark blue K-R		562	72.1	90.6	Reactive dye

脱色效果, 20 h后其脱色率均大于87%, 其中对活性红 X-3B 的脱色率仅有 87%; 而对阳离子红和酸性大红 GR 的脱色率可达到 98%, 说明菌株 N-4 具有脱色的广谱性。

2.6 金属离子的存在对脱色的影响

在染料废水中一般都含有大量的金属离子^[11], 因此, 本实验中考察了不同的金属离子对脱色的影响。当溶液中金属离子的终浓度为 1 mmol/L 时, 其脱色效果分别为: 毒性较小的金属对染料的脱色有不同程度的促进作用, 其中: $\text{Ba}^{2+} > \text{K}^+ > \text{Fe}^{3+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ 。而 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Hg^{2+} 和 Cu^{2+} 对脱色具有抑制作用, 其中 Cu^{2+} 的抑制效果最明显, 当接种量为 5 g/L 时, 100 mg/L 的染料 10 h 的脱色率不到 20%。

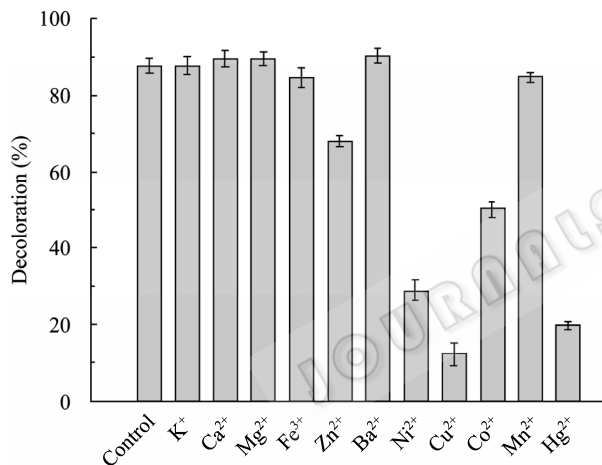


图 5 金属离子对脱色的影响

Fig. 5 Effects of different metal ions on decolorization of dye

3 结论

本文通过浓度梯度筛选法从土壤样品中筛选获得一株具有广谱染料降解能力的菌株, 通过 16S rDNA 序列分析, 初步确定其属于 *Leucobacter* 属, 在固体培养基上菌落呈金黄色, 约 1 mm–3 mm, 圆形, 表面光滑湿润, 边缘整齐, 易挑取。利用表面响应法对脱色因素进行优化, 结果表明, 接种量为 10 g/L, 染料浓度为 222 mg/L, 硫酸铵 1.5 g/L, 果糖 3.5 g/L 的条件下脱色效果最好, 在 10 h 内, 222 mg/L

的染料能够完全脱色。钡、钾、铁、钙、镁、锰和锌等离子的存在, 能促进脱色的进行; 钴、镍、汞和铜离子对脱色过程有抑制作用。

参考文献

- [1] 曹振宇. 金属络合染料的研究进展[J]. 河南工程学院学报: 自然科学版, 2009, 21(2): 14–19.
- [2] 赵春芳, 胡道伟, 周蓬蓬, 等. 白腐菌降解偶氮金属络合染料的研究[J]. 华中科技大学学报: 自然科学版, 2001, 29(8): 108–110.
- [3] van der Zee FP, Villaverde S. Combined anaerobic-aerobic treatment of azo dyes—a short review of bio-reactor studies[J]. Water Research, 2005, 39(8): 1425–1440.
- [4] 陈刚, 陈亮, 黄满红. 偶氮染料的微生物脱色研究进展[J]. 微生物学通报, 2009, 36(7): 1046–1051.
- [5] Qu YY, Shi SN, Ma F, et al. Decolorization of reactive dark blue K-R by the synergism of fungus and bacterium using response surface methodology[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(21): 8016–8023.
- [6] Sarangi A, Krishnan C. Comparison of *in vitro* Cr(VI) reduction by CFEs of chromate resistant bacteria isolated from chromate contaminated soil[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(10): 4130–4137.
- [7] Mohana S, Shrivastava S, Divecha J, et al. Response surface methodology for optimization of medium for decolorization of textile dye direct black 22 by a novel bacterial consortium[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(3): 562–569.
- [8] Carliell CM, Barclay SJ, Nidoo N, et al. Microbial decolorization of a reactive azo dye under anaerobic conditions[J]. Water SA, 1995, 21: 61–69.
- [9] Karvela E, Makris DP, Kalogeropoulos N, et al. Deployment of response surface methodology to optimise recovery of grape (*Vitis vinifera*) stem polyphenols[J]. Talanta, 2009, 79(5): 1311–1321.
- [10] Pan HF, Xie ZP, Bao WN, et al. Optimization of culture conditions to enhance cis-epoxysuccinate hydrolase production in *Escherichia coli* by response surface methodology[J]. Biochemical Engineering Journal, 2008, 42(2): 133–138.
- [11] Wan Ngah WS, Hanafiah MAKM. Removal of heavy metal ions from wastewater by chemically modified plant wastes as adsorbents: a review[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(10): 3935–3948.