



## 研究报告

## 氧气对混合菌群脱色降解偶氮染料效果的影响

刘娜<sup>Δ1</sup> 郑秀林<sup>Δ2</sup> 谢学辉<sup>\*2,3</sup> 孙朋<sup>1</sup> 王丽<sup>1</sup> 苏海民<sup>1</sup>

1 宿州学院环境与测绘工程学院 安徽 宿州 234000

2 东华大学环境科学与工程学院 上海 201620

3 上海污染控制与生态安全研究院 上海 200092

**摘要:**【背景】偶氮染料及其中间产物具有一定的环境毒性,利用混合菌群降解偶氮染料是一种环境友好型方法,但降解过程中氧气的存在起到至关重要的作用,可以促进或抑制偶氮染料的微生物降解作用。【目的】探讨氧气对偶氮染料微生物脱色液的影响,分析氧气对混合菌群脱色降解偶氮染料效果的影响。【方法】利用混合菌群DDMY1在3种培养条件(好氧、厌氧、兼氧)下,对7种偶氮染料进行脱色降解,探讨偶氮染料脱色液对氧气的响应情况,利用紫外可见分光光度法(ultraviolet visible spectrophotometry, UV-vis)和傅里叶变换红外光谱法(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)对脱色产物进行分析。【结果】在兼氧和厌氧条件下反应48 h后的染料脱色液,与氧气充分接触后,部分偶氮染料微生物脱色液发生较为明显的复色现象,如活性黑5、直接黑38;UV-vis分析结果表明,这种复色现象是由于脱色液与氧气接触之后产生新物质所致;FTIR分析结果表明,混合菌群对发生复色反应的偶氮染料仍然具有一定脱色降解效果,但是脱色尚不够完全。【结论】兼氧和厌氧条件下,氧气对部分偶氮染料微生物脱色液具有较为明显的影响,从而影响混合菌群对偶氮染料的整体脱色效果,这可为今后研究偶氮染料彻底生物降解提供理论基础。

**关键词:** 氧气, 脱色, 复色, 混合菌群, 偶氮染料

**Foundation items:** Anhui Provincial Natural Science Foundation (1808085QE176); Scientific Research Program of Anhui Provincial Education Department (KJ2018A0444, KJ2019A0670); Fundamental Research Funds for the Central Universities (2232018G-11); National Natural Science Foundation of China (51508083); National Key Research and Development Program of China (2016YFC0400501); Suzhou University Startup Foundation for Doctor (2016jb04, 2017jb04); Key Scientific Research Projects of Suzhou University (2016yzd01); Resource And Environment Teaching Team of Suzhou University (szxy2018jxtd01)

ΔThese authors equally contributed to this work

\*Corresponding author: E-mail: xiexuehui@dhu.edu.cn

Received: 12-02-2020; Accepted: 14-05-2020; Published online: 04-06-2020

基金项目: 安徽省自然科学基金(1808085QE176); 安徽省教育厅科学研究项目(KJ2018A0444, KJ2019A0670); 中央高校基本科研业务费专项资金(2232018G-11); 国家自然科学基金(51508083); 国家重点研发计划(2016YFC0400501); 宿州学院教授(博士)科研启动基金(2016jb04, 2017jb04); 宿州学院重点科研项目(2016yzd01); 宿州学院资源与环境教学团队(szxy2018jxtd01)

Δ对本文贡献相同

\*通信作者: E-mail: xiexuehui@dhu.edu.cn

收稿日期: 2020-02-12; 接受日期: 2020-05-14; 网络首发日期: 2020-06-04

## Effect of oxygen on decolorization and degradation of azo dyes by mixed flora

LIU Na<sup>△1</sup> ZHENG Xiu-Lin<sup>△2</sup> XIE Xue-Hui<sup>\*2,3</sup> SUN Peng<sup>1</sup> WANG Li<sup>1</sup> SU Hai-Min<sup>1</sup>

1 School of Environment and Surveying Engineering, Suzhou University, Suzhou, Anhui 234000, China

2 College of Environmental Science and Engineering, Donghua University, Shanghai 201620, China

3 Shanghai Institute of Pollution Control and Ecological Security, Shanghai 200092, China

**Abstract:** [Background] Azo dyes and their degradation intermediates have certain environmental toxicity. The application of mixed flora to degrade azo dyes is environmentally friendly, whereas the presence of oxygen plays a vital role in the degradation process, which can promote or suppress the biodegradation of azo dyes. [Objective] The effect of oxygen on the azo dye decolorizing solutions were explored, and the influence of oxygen on the decolorization and degradation of azo dyes by mixed flora were investigated. [Methods] Through the decolorization and degradation of seven azo dyes by mixed flora DDMY1 under three culture conditions (aerobic, anaerobic and facultative), the response of their decolorizing solutions to oxygen were discussed. Meanwhile, the degradation products were detected by ultraviolet visible spectrophotometry (UV-vis) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). [Results] After 48 h reaction under facultative and anaerobic conditions, several azo dye decolorizing solutions were captured to have the remarkable color restoration after exposure to oxygen, such as Reactive Black 5 and Direct Black 38. The results of UV-Vis analysis showed that the phenomenon of color restoration was derived from the generation of the new substances produced after decolorizing solutions contact with oxygen. In addition, the outcome of FTIR analysis indicated that the mixed flora DDMY1 still had the decolorization and degradation effect on azo dyes despite of color restoration, but the decolorization was not complete. [Conclusion] Under facultative and anaerobic conditions, oxygen had obvious influence on partial azo dye decolorizing solutions, affecting the overall decolorization performance of mixed flora DDMY1 on azo dyes. The study provides a theoretical basis for further research on the complete biodegradation of azo dyes.

**Keywords:** Oxygen, Decolorization, Color restoration, Mixed flora, Azo dye

偶氮染料是含有偶氮键(-N=N-)且数量最多的一种染料,具有数量大、色彩种类多样、易染色、稳定等特点,因此广泛应用于纺织印染行业<sup>[1-2]</sup>。偶氮染料在使用过程中一般不会被完全利用,残留的偶氮染料会溶于水体进入环境,这些偶氮染料及其中间产物具有一定的环境毒性,对生态环境和人体健康造成威胁<sup>[3-4]</sup>。近年来,研究者们通过筛选细菌单一菌株和菌群对偶氮染料进行降解,取得了良好的效果,而且与单一菌株相比,混合菌群的脱色效果更佳<sup>[5]</sup>。范凤霞<sup>[6]</sup>筛选驯化出对偶氮染料活性黑5具有高效脱色效果的混合菌群FF,并分离出21个单一菌株,研究发现混合菌群对活性黑5的脱色效果优于单一菌株。

利用细菌降解偶氮染料的过程中,氧气的存在起到非常重要的作用,氧气可以促进或抑制偶氮染料的微生物降解作用。一般来说,偶氮染料最关键的一步微生物降解作用——偶氮键的断裂是在厌氧条件下由偶氮还原酶完成的,厌氧条件下偶氮染料的脱色被认为是一个相对简单的过程<sup>[7]</sup>。但是,如果脱色机制是好氧的,那么氧气量的增加能够促进降解酶的活性,从而促进偶氮染料的降解<sup>[8]</sup>。然而,有研究<sup>[9-10]</sup>表明,在微氧条件下细菌对偶氮染料具有显著的脱色效果。研究者们研究氧气对细菌降解偶氮染料脱色效果的影响时,一般是预先设定好氧、厌氧或兼氧条件,而针对染料脱色液对氧气响应方面的研究较少。本研究在好氧、厌氧和兼氧

3 种条件下, 利用已筛选出的混合菌群 DDMY1 对偶氮染料进行脱色降解, 然后将脱色降解后的染料脱色液与氧气充分接触, 探讨接触前后染料脱色液是否发生复色反应; 同时, 利用紫外可见分光光度法(ultraviolet visible spectrophotometry, UV-vis)和傅里叶红外光谱法(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)对复色前后的溶液进行分析, 探讨氧气对染料脱色液的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 染料

实验所用偶氮染料有刚果红、丽春红 S、酸性

橙 7、橙黄 I、酸性黑 1、活性黑 5、直接黑 38 均购自上海安谱实验科技股份有限公司。7 种偶氮染料的化学式、结构式、相对分子质量和最大吸收波长信息见表 1。

### 1.2 主要试剂和仪器及培养基

氯化铵、硫酸钠和磷酸二氢钾, 国药集团化学试剂有限公司; 酵母提取物, 生工生物工程(上海)股份有限公司。傅里叶变换红外光谱仪, Thermo 公司; 旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; 氮吹仪, 天津恒奥科技发展有限公司; 微量紫外分光光度计, Implen 公司。

表 1 7 种偶氮染料化学式、结构式、相对分子质量和最大吸收波长

Table 1 Chemical formula, structural formula, relative molecular weight and maximum absorption wavelength of seven azo dyes

染料 Dyes	化学式 Chemical formula	结构式 Structural formula	相对分子质量 Relative molecular weight	最大吸收波长 Maximum absorption wavelength (nm)
刚果红 Congo Red	$C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$		696.68	487
丽春红 S Ponceau S	$C_{22}H_{12}N_4Na_4O_{13}S_4$		760.57	530
酸性橙 7 Acid Orange 7	$C_{16}H_{11}N_2NaO_4S$		350.32	486
橙黄 I Orange I	$C_{16}H_{11}N_2NaO_4S$		350.32	486
酸性黑 1 Acid Black 1	$C_{22}H_{14}N_6Na_2O_9S_2$		616.49	605
活性黑 5 Reactive Black 5	$C_{26}H_{21}N_5Na_4O_{19}S_6$		991.82	597
直接黑 38 Direct Black 38	$C_{34}H_{25}N_9Na_2O_7S_2$		781.73	596

基础培养基(g/L): 氯化铵 0.20, 硫酸钠 0.50, 磷酸二氢钾 2.66, 酵母提取物 3.00。

### 1.3 混合菌群 DDMY1 和单一菌种 *Klebsiella* sp. KL-1

混合菌群 DDMY1 筛选自实验室运行良好的水解酸化反应器(用于处理染料废水)<sup>[11]</sup>, 具体筛选驯化过程为: 从反应器中取新鲜污泥 10 mL, 加入含 90 mL 基础培养基的 250 mL 锥形瓶中, 35 °C 恒温富集静置培养 24 h; 接着以 10% (体积比)的接种量转入驯化培养基静置培养, 使初始染料(活性黑 5)浓度为 50 mg/L, 35 °C 恒温静置培养 24 h 后测定脱色率; 脱色率大于 80%以后, 逐步提高染料浓度(50–400 mg/L), 继续传代驯化, 获得对偶氮染料活性黑 5 具有高效脱色效果的混合菌群 DDMY1。10 000 r/min 离心 10 min 收集脱色 24 h 的菌体, 进行 MiSeq 高通量测序(上海美吉生物医药科技有限公司), 对测序结果进行生物信息学分析, 得到属分类学水平上混合菌群 DDMY1 的群落结构, 具体分析方法见 Xie 等<sup>[12]</sup>的报道。另外, 本研究所用单一菌种 *Klebsiella* sp. KL-1 是从混合菌群 DDMY1 中分离出的一株单菌<sup>[13]</sup>。

### 1.4 脱色率测定

由于 7 种偶氮染料刚果红、丽春红 S、酸性橙 7、橙黄 I、酸性黑 1、活性黑 5、直接黑 38 都有明显的特征波长, 因此根据特征波长处特征峰的变化计算脱色率。脱色率测定时, 以基础培养基作为空白, 取反应 t 时刻的染料溶液, 经 8 000 r/min 离心 10 min 后取上清液, 置于紫外可见分光光度计中测定特征波长处特征峰值。计算公式为:

$$\text{脱色率(\%)} = \frac{(A_0 - A_t)}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

式中:  $A_0$ : 反应 0 时刻染料溶液的特征峰值;  $A_t$ : 反应 t 时刻染料溶液的特征峰值。

### 1.5 不同培养方式对混合菌群脱色效果的影响

选取 7 种偶氮染料作为研究对象, 分别在 250 mL 锥形瓶中加入 90 mL 灭菌后的基础培养基, 然后以 10% (体积比)接种量加入培养了 48 h 的 DDMY1,

并分别添加 7 种染料使其终浓度为 200 mg/L, 将锥形瓶分别放置在 3 种培养条件下, 即好氧(摇床转速: 120 r/min)、兼氧(恒温培养箱中静置)和厌氧(离心管中无氧密封培养), 在 37 °C 下恒温培养, 测定混合菌群 DDMY1 对 7 种偶氮染料反应 48 h 后的脱色率。

### 1.6 氧气对脱色液的影响

为探讨在 3 种培养方式下氧气对偶氮染料生物脱色后的脱色液是否有影响, 在兼氧、厌氧培养条件下, 将经混合菌群脱色 48 h 后的染料脱色液与氧气充分接触, 摇晃混匀, 观察是否会发生复色反应。同时, 以基础培养基为空白, 利用紫外-可见分光光度计分别测定脱色液的紫外可见光谱图。由于好氧培养方式下的脱色液一直与氧气充分接触, 所以反应 48 h 后的染料脱色液即是已经与氧气充分接触后的脱色液。

### 1.7 混合菌群和单一菌种对偶氮染料生物脱色效果的影响

为了探讨混合菌群与单一菌种对偶氮染料脱色作用的差异性, 选取 7 种偶氮染料作为研究对象, 在兼氧条件下, 分别将单一菌种、混合菌种添加到脱色体系, 将脱色 48 h 后的脱色液与氧气充分接触, 测定脱色液的 UV-vis 谱图, 计算脱色率。

### 1.8 傅里叶变换红外光谱(FTIR)分析

取 0 h 染料溶液和与氧气充分接触后的 48 h 脱色液各 100 mL, 分别 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 用二氯甲烷(HPLC 级)萃取上清液中的物质, 萃取 3 次, 每次二氯甲烷用量分别为 30、30、40 mL, 萃取完将萃取液移入茄型烧瓶中, 于 30 °C 水浴下旋转蒸发二氯甲烷。使用 2 mL 二氯甲烷润洗茄型烧瓶, 将润洗液移入 2 mL 离心管内, 置于氮吹仪上吹干。最后将吹干后的物质取出, 置于傅里叶变换红外光谱仪上测定红外光谱图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 混合菌群 DDMY1 的群落结构分析

筛选出的混合菌群 DDMY1 不仅能够适应较宽的 pH 值、染料浓度范围, 而且能在较适宜的温度

(40 °C)和 NaCl 浓度(1.5%, 质量体积比)下对偶氮染料活性黑 5 完成高效脱色<sup>[11]</sup>。利用 MiSeq 高通量测序方法对混合菌群 DDMY1 的群落结构进行分析, 在属分类学水平上混合菌群 DDMY1 的群落结构组成如图 1 所示。可以看出, 混合菌群 DDMY1 由多个不同菌种组成, 最优势菌种为假单胞菌(*unclassified\_o\_Pseudomonadales*), 相对丰度为 78.41%, 其可能在染料脱色中起到重要作用。产碱杆菌(*unclassified\_f\_Alcaligenaceae*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas*)、克雷伯氏菌(*Klebsiella*)相对丰度次之, 分别为 4.39%、3.89%、3.55%, 研究表明铜绿假单胞菌(*Pseudomonas*)、克雷伯氏菌(*Klebsiella*)

具有降解染料的潜力<sup>[14-15]</sup>。在之前的研究中, 从混合菌群 DDMY1 中筛选出的单一菌种 *Klebsiella* sp. KL-1 对活性黑 5 具有约 87%的脱色率<sup>[13]</sup>。因此, 混合菌群 DDMY1 的高效脱色效果归因于各菌种之间的协同作用以及功能菌种的脱色降解潜力。

2.2 不同培养方式对混合菌群脱色效果的影响

采用好氧、厌氧、兼氧不同培养方式, 利用混合菌群 DDMY1 分别对 7 种偶氮染料进行脱色降解, 分别测定 0、24、48 h 的脱色率, 好氧、厌氧、兼氧条件下混合菌群的脱色效果如图 2 所示。从总体上看, 3 种培养方式下, 混合菌群 DDMY1 对不同偶氮染料的脱色效果都呈现出较大差异性; 另

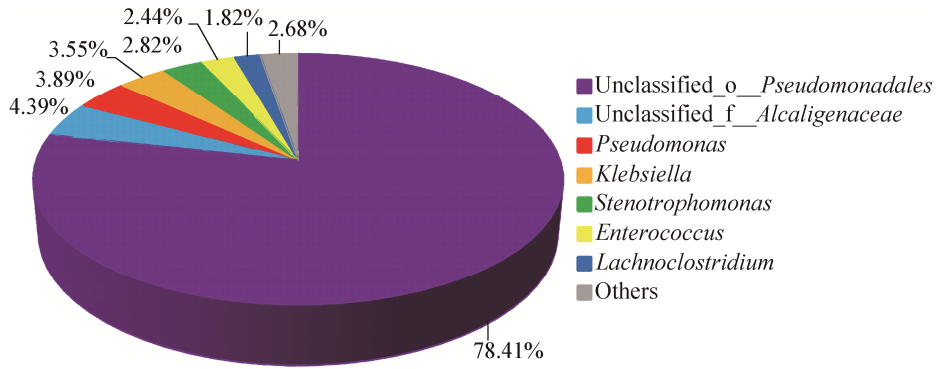


图 1 属分类学水平上混合菌群 DDMY1 的群落结构组成  
Figure 1 Community structure of DDMY1 at the level of genus taxonomy

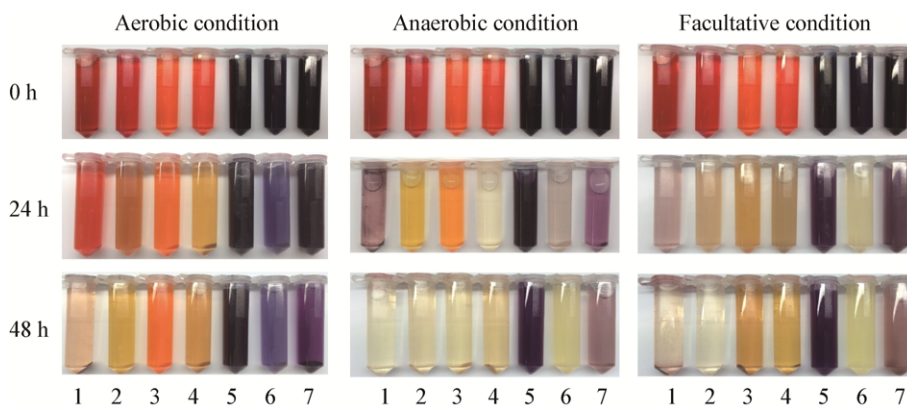


图 2 好氧、厌氧、兼氧培养方式下混合菌群对偶氮染料脱色 48 h 的脱色效果图  
Figure 2 Decolorization effect picture of azo dyes decolorized by mixed flora under aerobic, anaerobic and facultative conditions for 48 h

注: 1-7: 刚果红、丽春红 S、酸性橙 7、橙黄 I、酸性黑 1、活性黑 5、直接黑 38。  
Note: 1-7: Congo Red, Ponceau S, Acid Orange 7, Orange I, Acid Black 1, Reactive Black 5, Direct Black 38.

外,混合菌群对刚果红、丽春红 S、橙黄 I、活性黑 5 和直接黑 38 的脱色效果较为显著。厌氧和兼氧条件下混合菌群对偶氮染料的脱色效果较为相似,而且优于好氧条件,可能的原因是,细菌降解偶氮染料是一个还原反应过程,氧气的存在能够抑制偶氮还原酶的活性,因为氧气的氧化还原电位高于染料分子,所以会优先与释放的电子结合,导致染料分子无法与释放的电子充分结合,从而降低染料降解脱色效率<sup>[9,16]</sup>。Panswad 等<sup>[17]</sup>的研究表明,厌氧系统比好氧过程更能有效降低色度。

为更清晰地了解 3 种培养方式下混合菌群的脱色差异,对混合菌群反应 48 h 后的脱色率进行检测,结果如图 3 所示。由于兼氧培养过程中取样测定时溶液与空气接触会发生反应,因此无法检测兼氧培养条件下与氧气接触前溶液的脱色率。从图 3 可以看出,在好氧条件下,除了酸性橙 7,混合菌群 DDMY1 对其他 6 种偶氮染料在反应 48 h 的脱色率都达到 50% 以上;在厌氧条件下,混合菌群 DDMY1 对 7 种偶氮染料的脱色率都达到 70% 以上,其中,对刚果红、丽春红 S、酸性橙 7、橙黄 I 这 4 种偶氮染料的脱色率都达到 90% 以上。混合菌群由多种单一菌种组成,它们通过彼此相互作用完成协

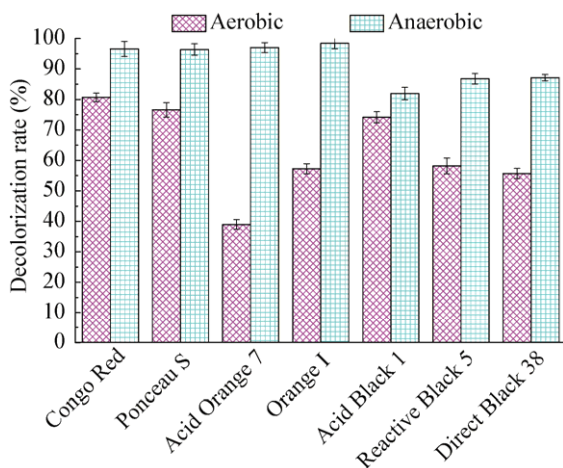


图 3 好氧和厌氧方式下混合菌群对偶氮染料脱色 48 h 的脱色率

Figure 3 Decolorization rate of azo dyes decolorized by mixed flora under aerobic and anaerobic conditions for 48 h

同脱色,因此混合菌群对偶氮染料具有较好的去除效果<sup>[18-19]</sup>。从图 2 可以看出,厌氧条件比好氧条件更有利于混合菌群的降解脱色,以酸性橙 7 为例,厌氧条件下反应 48 h 的脱色率是好氧条件下的 2.35 倍。Yurtsever 等<sup>[20]</sup>研究发现,厌氧阶段对染料可以达到近乎完全脱色的效果,而好氧阶段仅有 30%–50% 的脱色率。类似地,You 等<sup>[21]</sup>利用厌氧-好氧膜生物反应器降解偶氮染料活性黑 5,结果发现厌氧单元对活性黑 5 的化学需氧量(chemical oxygen demand, COD)去除率和色度除去率分别为 92.3% 和 72.6%,而好氧单元的 COD 去除率和色度除去率仅为 5.2% 和 9.1%。

### 2.3 氧气对脱色液的影响

好氧培养方式下的染料脱色液一直是与氧气充分接触,所以反应 48 h 后的染料脱色液即是已经与氧气充分接触后的脱色液,因此并不存在复色现象。这里主要讨论兼氧和厌氧条件下氧气对脱色液的影响,探讨接触前后是否会发生复色现象及其脱色率变化情况。

#### 2.3.1 厌氧培养方式

在厌氧培养条件下,将混合菌群对 7 种偶氮染料脱色 48 h 的脱色液与氧气充分接触,观察接触前后脱色液颜色变化,并检测脱色率,结果如图 4 所示。可以看出,酸性橙 7、橙黄 I、活性黑 5 和直接黑 38 发生较为显著的复色现象,酸性黑 1 发生了轻微的复色现象,而其他两种染料未发生明显的复色现象(图 4A)。从图 4B 可以看出,除了刚果红和丽春红 S 两种染料,其余 5 种染料脱色 48 h 后的脱色液与氧气接触后,脱色率都有所下降,特别是直接黑 38,脱色率下降了 16.78%。这可能是因为在染料降解过程中产生了一些还原性中间产物,当它们与空气中的氧气接触时发生氧化还原反应,从而产生复色现象<sup>[22]</sup>。在厌氧和兼氧培养条件下,氧气会对细菌降解后的脱色液产生影响,从而降低总脱色率。因此,如何消除或减小这种影响,对于提高偶氮染料生物脱色的总体效果尤为重要。

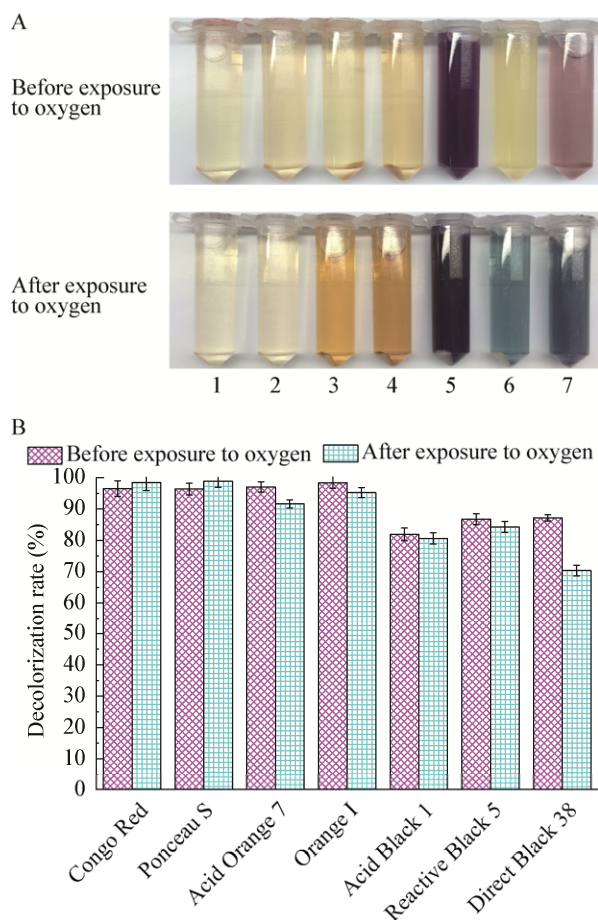


图4 厌氧培养条件下混合菌群48 h脱色液与氧气接触前后的脱色效果图(A)与脱色率(B)

Figure 4 Decolorization effect picture (A) and rate (B) of azo dyes decolorized by mixed flora before and after exposure to oxygen under anaerobic condition

注: 1-7: 刚果红、丽春红 S、酸性橙 7、橙黄 I、酸性黑 1、活性黑 5、直接黑 38.

Note: 1-7: Congo Red, Ponceau S, Acid Orange 7, Orange I, Acid Black 1, Reactive Black 5, Direct Black 38.

### 2.3.2 兼氧培养方式

兼氧培养条件下,混合菌群48 h脱色液与氧气接触前后的脱色效果如图5所示。可以看出,在兼氧条件下反应48 h后的脱色液接触氧气后,活性黑5和直接黑38发生了较为显著的复色反应,丽春红S和酸性黑1发生了轻微的复色反应,而其余偶氮染料未发生明显的复色现象。由于兼氧条件下无法检测与氧气接触前的脱色率,因此仅能通过测试与氧气接触后的脱色率来反应脱色情况,混合菌群

48 h脱色液与氧气接触后的脱色率如图6所示。可以看出,在兼氧条件下,混合菌群对发生显著复色反应的活性黑5和直接黑38的最终脱色率仅为60%,对发生轻微复色反应的丽春红S和酸性黑1的最终脱色率分别达到了96.79%和75.63%,而对未发生明显复色反应的刚果红、酸性橙7和橙黄I的脱色率都达到90%左右。因此,可以推测在兼氧条件下,与氧气接触所导致的复色反应会显著影响混合菌群脱色效果。在先前的研究中,我们以偶氮染料活性黑5为目标降解物,在兼氧条件下,利用混合菌群DDMY1对其进行反复脱色、复色研究,探讨其脱色、复色机理,结果发现活性黑5在兼氧条件下经混合菌群DDMY1作用,可以有效反复脱色、复色达17次之多,利用气相色谱质谱联用仪和傅里叶变换红外光谱仪对脱色、复色过程中的产物进行分析,推测出现这种脱色-复色现象的原因可能是降解中间产物芳香胺类物质被氧气氧化成含有醌型结构的新物质,这种醌型结构是能使物质呈深色的发色基团<sup>[22]</sup>。

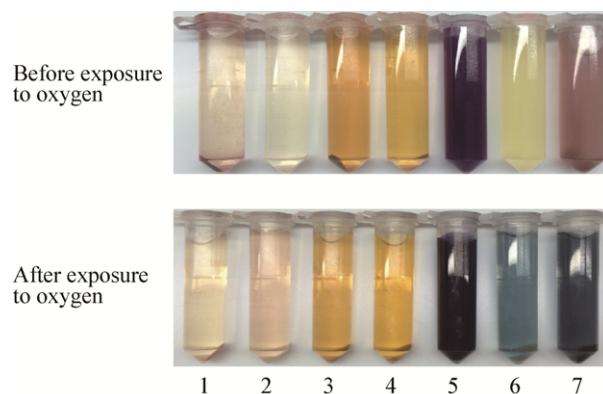


图5 兼氧培养条件下混合菌群48 h脱色液与氧气接触前后的脱色效果图

Figure 5 Decolorization effect picture of azo dyes decolorized by mixed flora before and after exposure to oxygen under facultative condition

注: 1-7: 刚果红、丽春红 S、酸性橙 7、橙黄 I、酸性黑 1、活性黑 5、直接黑 38.

Note: 1-7: Congo Red, Ponceau S, Acid Orange 7, Orange I, Acid Black 1, Reactive Black 5, Direct Black 38.

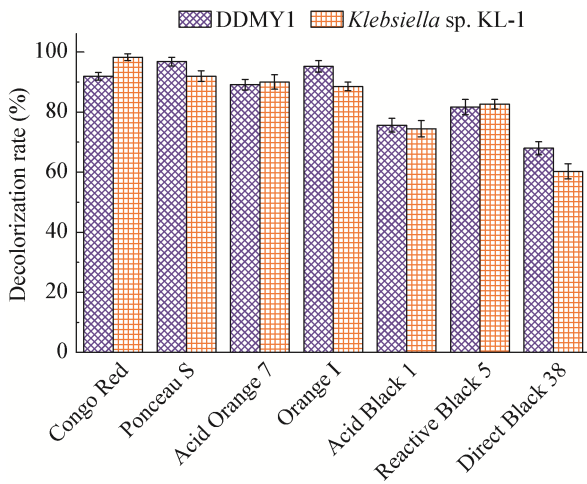


图 6 兼氧培养条件下混合菌群、单一菌种对 7 种偶氮染料的脱色率

Figure 6 Decolorization rate of seven azo dyes by mixed flora and single strain under facultative condition

混合菌群是由各种单菌组合而成, 利用混合菌群脱色偶氮染料时实际上是多个单一菌种的协同作用, 因此脱色效果显著<sup>[23-24]</sup>。功能菌种对偶氮染料的高效脱色能力也被频频报道<sup>[25-26]</sup>。在本研究中, 为比较混合菌群和单一菌种对脱色效果的差异性, 在兼氧条件下, 利用混合菌群 DDMY1 和单一菌种 *Klebsiella sp. KL-1* 对 7 种染料进行降解脱色, 而且将降解脱色后的脱色液与氧气充分接触, 测定脱色液的脱色率, 结果见图 5。从总体上看, 单一菌种与混合菌群在最终脱色效果上差异较小, 这是因为本实验所用单一菌种 *Klebsiella sp. KL-1* 是以活性黑 5 为目标污染物、从混合菌群 DDMY1 中筛选驯化而来的功能菌种。对于偶氮染料丽春红 S、橙黄 I、酸性黑 1 和直接黑 38, 混合菌群的脱色效果优于单一菌种; 而对于偶氮染料刚果红、酸性橙 7、活性黑 5, 单一菌种的脱色率略高于混合菌群。但在脱色过程中, 单一菌种是否会引起复色现象却是将来值得探讨的一个问题。

从以上结果可以看出, 在厌氧和兼氧条件下, 混合菌群 DDMY1 对 7 种偶氮染料脱色效果都呈现较为显著的差异, 导致这种脱色效果差异的原因可能有 2 个: (1) 染料结构, 结构简单、分子量小的

染料更容易被脱色, 含  $-N=N-$  个数越多的偶氮染料脱色效果越差<sup>[15,24,27]</sup>, 如本研究中的单偶氮染料酸性橙 7 和橙黄 I 的脱色效果较好, 双偶氮染料酸性黑 1 和活性黑 5 的脱色效果次之, 而三偶氮染料直接黑 38 的脱色效果最差。另外, 偶氮染料中芳香环上取代基的种类和位置都会影响细菌的脱色效果<sup>[28]</sup>, 含羟基或氨基的偶氮染料比含甲基、硝基、磺酸基或甲氧基的偶氮染料更容易被降解<sup>[7]</sup>。(2) 复色现象, 由于某些偶氮染料的脱色液与氧气接触后发生较为明显的复色现象, 使得脱色率有所降低, 导致最终脱色效果变差, 如本研究中的活性黑 5 和直接黑 38。

## 2.4 紫外-可见分光光度分析

氧气对脱色液影响的实验结果表明, 部分偶氮染料微生物反应 48 h 的脱色液与氧气充分接触后, 好氧培养方式下不存在复色现象, 兼氧和厌氧培养方式下发生较为显著的复色现象。为进一步比较 3 种不同培养方式下, 细菌菌群 DDMY1 对 7 种偶氮染料的脱色效果以及复色现象差异性, 利用紫外-可见分光光度计分别测定反应 0、48 h 的脱色液 UV-vis 图谱, 以及反应 48 h 后脱色液与氧气接触后的图谱, 结果如图 7 所示。由图 7 可以看出, 在 200–800 nm 全波长范围内, 3 种培养方式下细菌菌群 DDMY1 对 7 种偶氮染料都有一定的降解效果, 而且与好氧条件相比, 厌氧、兼氧条件下染料的降解程度更高。从总体上看, 在厌氧和兼氧条件下, 7 种偶氮染料反应 48 h 后的脱色液分别与氧气接触后的 UV-vis 图谱类似, 而它们的复色反应效果也类似(图 4、图 5)。由于兼氧反应 48 h 后的脱色液在制样过程中会与氧气接触, 因此无法测定与氧气接触前的数据, 所以本研究通过分析厌氧条件下与氧气接触前后的 UV-vis 图谱来反映复色前后产物的变化情况。

在厌氧条件下, 刚果红和丽春红 S 反应 48 h 的脱色液与氧气接触前后的 UV-vis 图谱未见明显变化(图 7A、B), 这与其没有发生复色现象结论一致(图 4); 直接黑 38 反应 48 h 的脱色液与氧气接触后



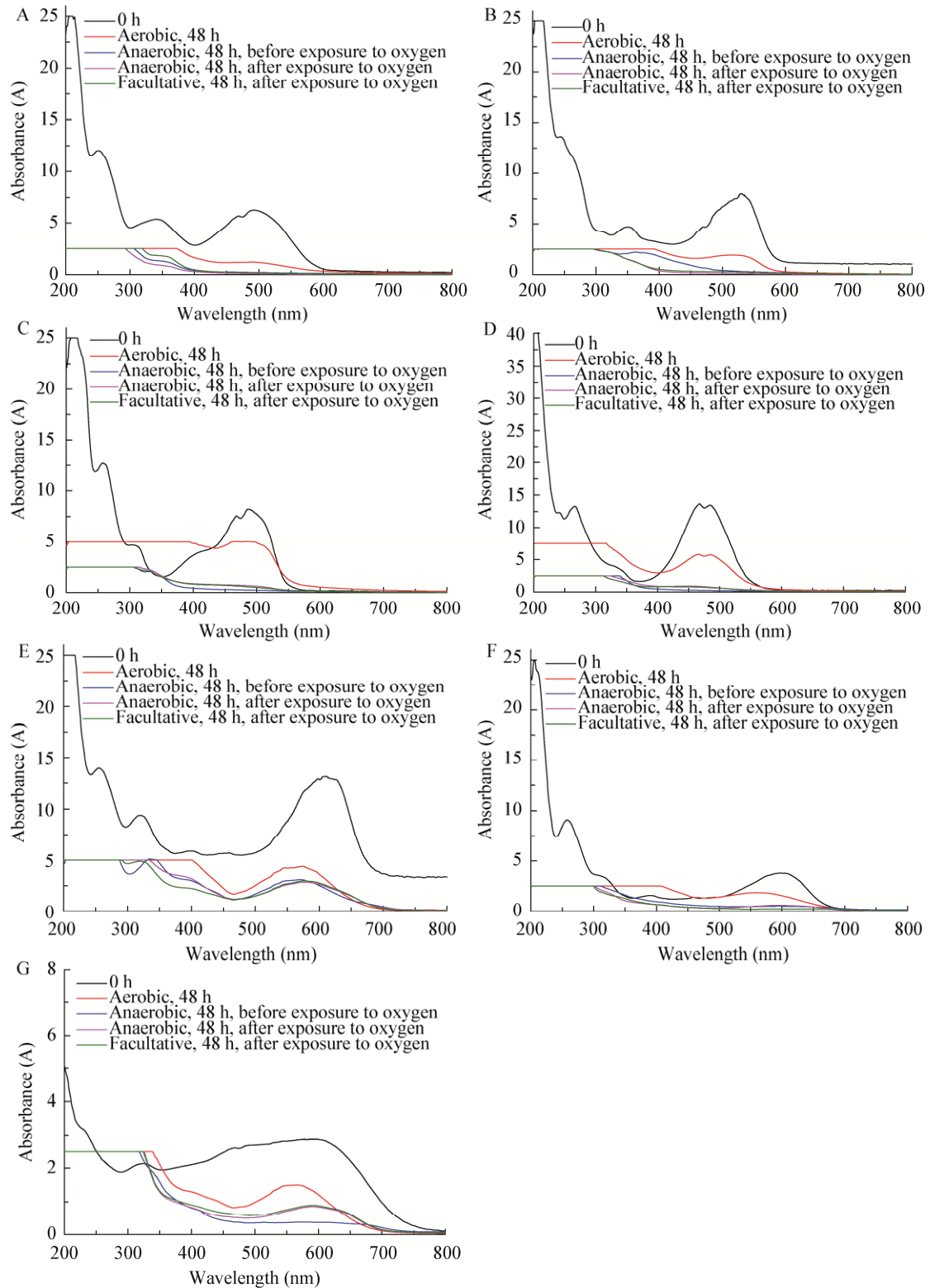


图7 好氧、厌氧、兼氧条件下, 混合菌群对7种偶氮染料降解的UV-vis谱图

Figure 7 UV-vis spectrum of seven azo dyes degraded by mixed flora under aerobic, anaerobic and facultative conditions

注: A: 刚果红; B: 丽春红 S; C: 酸性橙 7; D: 橙黄 I; E: 酸性黑 1; F: 活性黑 5; G: 直接黑 38.

Note: A: Congo Red; B: Ponceau S; C: Acid Orange 7; D: Orange I; E: Acid Black 1; F: Reactive Black 5; G: Direct Black 38.

的 UV-vis 图谱明显高于接触前,这与之前得到的与氧气接触后脱色率降低的结论一致(图 7G, 图 4B)。从图 7 可以看出,脱色液与氧气接触后发生复色现象的几种染料,其 UV-vis 光谱也发生了一定的变化,如酸性橙 7、橙黄 I 等,尤其是直接黑 38,这说明这种复色现象是由于脱色液与氧气接触之后产生的新物质所导致。

### 2.5 傅里叶变换红外光谱分析

为了进一步探讨偶氮染料降解过程中官能团的变化,测定反应前后脱色液的 FTIR 谱图。以 3 种偶氮染料酸性黑 1、活性黑 5 和直接黑 38 为例,测定兼氧培养方式下反应 0 h 和 48 h 接触氧气后脱色液的 FTIR 谱图,结果如图 8A-C 所示。细菌菌群 DDMY1 降解前后,3 种染料的 FTIR 图谱都有较为明显的改变,由图 8A 可知,3 393  $\text{cm}^{-1}$  和 1 673  $\text{cm}^{-1}$  附近的峰被认为可以表示染料结构中伯胺 N-H 和-N=N-的伸缩振动<sup>[29]</sup>,1 261  $\text{cm}^{-1}$  附近的峰代表芳香胺上 C-N 伸缩振动,1 455  $\text{cm}^{-1}$  和 650-850  $\text{cm}^{-1}$  附近的峰分别代表芳香环的 C=C 骨架振动和 CH 变形振动。经菌群 DDMY1 降解后的产物 FTIR 图谱中,1 673  $\text{cm}^{-1}$  峰的消失说明偶氮键的断裂,1 261  $\text{cm}^{-1}$  峰消失而 1 257  $\text{cm}^{-1}$  峰的产生被认为是胺类化合物的产生<sup>[30]</sup>,2 925  $\text{cm}^{-1}$  和 2 854  $\text{cm}^{-1}$  峰强度的增加和 650-850  $\text{cm}^{-1}$  附近峰强度的减弱都说明芳香环的降解和脂肪烃的生成,但 1 499  $\text{cm}^{-1}$  和 1 602  $\text{cm}^{-1}$  峰的存在说明芳香环依然存在,染料未被彻底降解。

由图 8C 可知,混合菌群 DDMY1 降解前,FTIR 谱图中 1 668  $\text{cm}^{-1}$  和 1 188  $\text{cm}^{-1}$  附近的峰被报道分别代表染料结构中-N=N- (偶氮键)和-S=O 伸缩振动<sup>[31]</sup>,1 287  $\text{cm}^{-1}$  附近的峰分别代表芳香胺上 C-N 伸缩振动,1 455  $\text{cm}^{-1}$  和 658-904  $\text{cm}^{-1}$  分别代表苯环 C=C 的骨架振动和芳香环上的-CH 变形振动。混合菌群在兼氧条件下降解 48 h 且与氧气接触反应后,1 668  $\text{cm}^{-1}$  附近峰的消失表示偶氮键的断裂,1 623  $\text{cm}^{-1}$  和 1 263  $\text{cm}^{-1}$  附近新峰的产生被

认为预示着胺类化合物的产生<sup>[30]</sup>,1 188  $\text{cm}^{-1}$  附近的峰消失而 1 179  $\text{cm}^{-1}$  附近的峰产生,被认为是磺酸基变成硫酸盐<sup>[32]</sup>。但 1 502、1 455 和 650-900  $\text{cm}^{-1}$  附近峰的存在表示芳香环上 C=C 伸缩振动和 C-H 变形振动,即染料并未得到彻底降解。类似地,从图 8B 可以看出,1 668  $\text{cm}^{-1}$  峰的消失说明偶氮键的断裂,但 1 595  $\text{cm}^{-1}$  和 1 457  $\text{cm}^{-1}$  附近峰的存在说明降解后芳香环依然存在,染料未得到彻底降解。

## 3 结论

本研究以 7 种偶氮染料为脱色降解对象,在 3 种培养条件下(好氧、厌氧、兼氧),利用混合菌群 DDMY1 对其进行脱色降解,将染料脱色 48 h 后的溶液与氧气充分接触,通过观察脱色液是否发生复色现象,结合紫外可见分光光度法和傅里叶变换红外光谱法,探讨和分析氧气对脱色液产生的影响,得到以下结论:

(1) 在好氧和厌氧培养方式下,混合菌群 DDMY1 对不同偶氮染料的脱色率呈现出较大的差异性,厌氧条件比好氧条件更有利于混合菌群的降解脱色,兼氧条件下与厌氧培养条件下的脱色效果类似。将 48 h 的染料降解脱色液与氧气充分接触,在好氧条件下,脱色液未发生复色现象;在兼氧条件下,活性黑 5 和直接黑 38 发生较为显著的复色反应。在厌氧条件下,酸性橙 7、橙黄 I、活性黑 5 和直接黑 38 发生较为显著的复色反应。

(2) UV-vis 分析结果发现,发生复色反应脱色液的 UV-vis 光谱也发生了相应变化,如直接黑 38,说明这种复色现象是由于脱色液与氧气接触之后产生的新物质导致的。FTIR 分析结果表明,发生复色反应后脱色液的 FTIR 图谱发生较为明显的变化,说明即使发生复色反应,混合菌群对染料也确实有一定脱色降解效果,但是并不能彻底脱色降解染料。

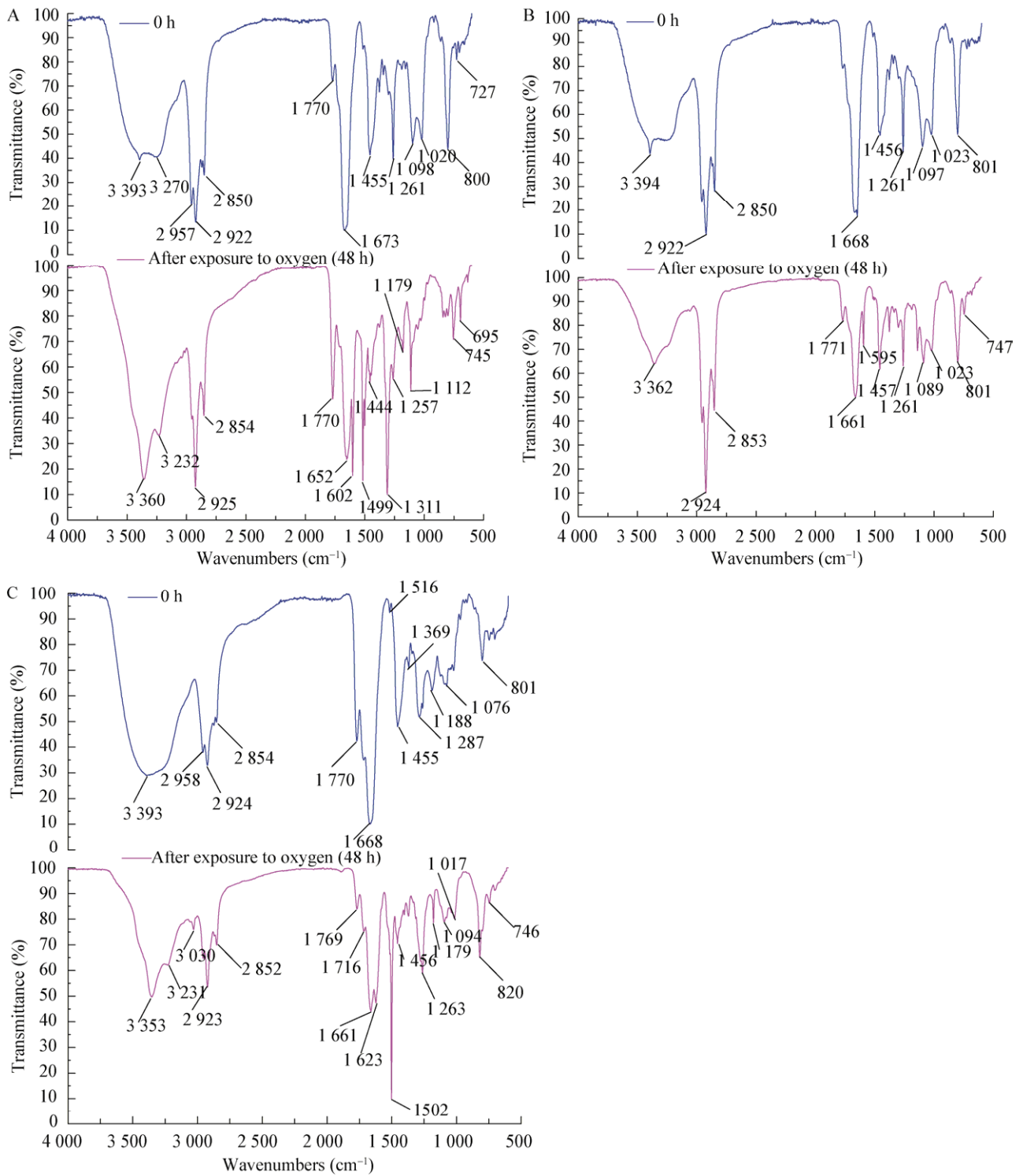


图 8 兼氧培养方式下 0 h、48 h 接触氧气后脱色液的 FTIR 图谱

Figure 8 FTIR spectrum of dye solution (0 h) and decolorizing solution (48 h) after exposure to oxygen under facultative condition

注: A: 酸性黑 1; B: 活性黑 5; C: 直接黑 38.

Note: A: Acid Black 1; B: Reactive Black 5; C: Direct Black 38.

(3) 本研究探讨了氧气对染料微生物脱色液的影响,发现在厌氧和兼氧培养条件下,部分偶氮染料经菌群脱色 48 h 后的脱色液与氧气充分接触后,发生较为明显的复色反应,使得总脱色率有所降低,从而影响菌群整体脱色效果。因此,对于能够发生复色反应的偶氮染料,可以从消除或减小这种影响的角度出发,为提高偶氮染料整体生物脱色效果提供新的思路。

## REFERENCES

- [1] Edison TNJI, Atchudan R, Sethuraman MG, et al. Reductive-degradation of carcinogenic azo dyes using *Anacardium occidentale* testa derived silver nanoparticles[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2016, 162: 604-610
- [2] Cui DZ, Li GF, Zhao D, et al. Effect of quinoid redox mediators on the aerobic decolorization of azo dyes by cells and cell extracts from *Escherichia coli*[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22(6): 4621-4630
- [3] Almeida EJR, Corso CR. Decolorization and removal of toxicity of textile azo dyes using fungal biomass pelletized[J]. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2019, 16(3): 1319-1328
- [4] Haq I, Raj A, Markandeya. Biodegradation of Azure-B dye by *Serratia liquefaciens* and its validation by phytotoxicity, genotoxicity and cytotoxicity studies[J]. *Chemosphere*, 2018, 196: 58-68
- [5] Liu N, Xie XH, Wang Y, et al. Carbon and nitrogen co-metabolism during bacterial degradation and decolorization of azo dyes[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(5): 1185-1195 (in Chinese)  
刘娜, 谢学辉, 王钰, 等. 细菌利用不同碳、氮源共代谢降解脱色偶氮染料研究进展[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(5): 1185-1195
- [6] Fan FX. Study on decolorization and degradation of reactive black 5 by the flora FF[D]. Shanghai: Master's Thesis of Donghua University, 2013 (in Chinese)  
范凤霞. 混合菌群 FF 对活性黑 5 的脱色降解研究[D]. 上海: 东华大学硕士学位论文, 2013
- [7] Saratale RG, Saratale GD, Chang JS, et al. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: a review[J]. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2011, 42(1): 138-157
- [8] Solís M, Solís A, Pérez HI, et al. Microbial decolouration of azo dyes: a review[J]. *Process Biochemistry*, 2012, 47(12): 1723-1748
- [9] Khan Z, Jain K, Soni A, et al. Microaerophilic degradation of sulphonated azo dye-Reactive Red 195 by bacterial consortium AR1 through co-metabolism[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2014, 94: 167-175
- [10] Franciscan E, Zille A, Fantinatti-Garboggini F, et al. Microaerophilic-aerobic sequential decolourization/biodegradation of textile azo dyes by a facultative *Klebsiella* sp. strain VN-31[J]. *Process Biochemistry*, 2009, 44(4): 446-452
- [11] Xie XH, Zheng XL, Yu CZ, et al. High-efficient biodegradation of refractory dye by a new bacterial flora DDMY1 under different conditions[J]. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2020, 17(3): 1491-1502
- [12] Xie XH, Liu N, Ping J, et al. Illumina MiSeq sequencing reveals microbial community in HA process for dyeing wastewater treatment fed with different co-substrates[J]. *Chemosphere*, 2018, 201: 578-585
- [13] Zheng XL, Xie XH, Liu YB, et al. Deciphering the mechanism of carbon sources inhibiting recolorization in the removal of refractory dye: based on an untargeted LC-MS metabolomics approach[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 307: 123248
- [14] Lin J, Zhang XW, Li ZJ, et al. Biodegradation of Reactive blue 13 in a two-stage anaerobic/aerobic fluidized beds system with a *Pseudomonas* sp. isolate[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(1): 34-40
- [15] Cui DZ, Li GF, Zhao M, et al. Decolourization of azo dyes by a newly isolated *Klebsiella* sp. strain Y3, and effects of various factors on biodegradation[J]. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2014, 28(3): 478-486
- [16] Chang JS, Kuo TS, Chao YP, et al. Azo dye decolorization with a mutant *Escherichia coli* strain[J]. *Biotechnology Letters*, 2000, 22(9): 807-812
- [17] Panswad T, Luangdilok W. Decolorization of reactive dyes with different molecular structures under different environmental conditions[J]. *Water Research*, 2000, 34(17): 4177-4184
- [18] Franciscan E, Mendonça D, Seber S, et al. Potential of a bacterial consortium to degrade azo dye Disperse Red 1 in a pilot scale anaerobic-aerobic reactor[J]. *Process Biochemistry*, 2015, 50(5): 816-825
- [19] Kardi SN, Rashid NAA, Ibrahim N, et al. Biodegradation of Remazol Black B in sequential microaerophilic-aerobic operations by NAR-2 bacterial consortium[J]. *Environmental Earth Sciences*, 2016, 75(16): 1172
- [20] Yurtsever A, Sahinkaya E, Aktaş Ö, et al. Performances of anaerobic and aerobic membrane bioreactors for the treatment of synthetic textile wastewater[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 192: 564-573
- [21] You SJ, Teng JY. Anaerobic decolorization bacteria for the treatment of azo dye in a sequential anaerobic and aerobic membrane bioreactor[J]. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2009, 40(5): 500-504
- [22] Yu CZ, Xie XH, Zheng XL, et al. Decolorization and

- repigmentation of reactive black 5 biodegradation and their mechanisms[J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2016, 35(9): 2987-2996 (in Chinese)
- 俞承志, 谢学辉, 郑秀林, 等. 活性黑 5 的生物脱色、复色现象及机理[J]. *化工进展*, 2016, 35(9): 2987-2996
- [23] Forss J, Pinhassi J, Lindh M, et al. Microbial diversity in a continuous system based on rice husks for biodegradation of the azo dyes Reactive Red 2 and Reactive Black 5[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 130: 681-688
- [24] Guo G, Li XH, Tian F, et al. Azo dye decolorization by a halotolerant consortium under microaerophilic conditions[J]. *Chemosphere*, 2020, 244: 125510
- [25] Mishra S, Maiti A. The efficacy of bacterial species to decolourise reactive azo, anthroquinone and triphenylmethane dyes from wastewater: a review[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2018, 25(9): 8286-8314
- [26] Franca RDG, Vieira A, Carvalho G, et al. *Oerskovia paurometabola* can efficiently decolorize azo dye Acid Red 14 and remove its recalcitrant metabolite[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020, 191: 110007
- [27] Hu TL. Kinetics of azoreductase and assessment of toxicity of metabolic products from azo dyes by *Pseudomonas luteola*[J]. *Water Science and Technology*, 2001, 43(2): 261-269
- [28] Hsueh CC, Chen BY, Yen CY. Understanding effects of chemical structure on azo dye decolorization characteristics by *Aeromonas hydrophila*[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 167(1/3): 995-1001
- [29] Jadhav JP, Kalyani DC, Telke AA, et al. Evaluation of the efficacy of a bacterial consortium for the removal of color, reduction of heavy metals, and toxicity from textile dye effluent[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(1): 165-173
- [30] Balapure K, Jain K, Bhatt N, et al. Exploring bioremediation strategies to enhance the mineralization of textile industrial wastewater through sequential anaerobic-microaerophilic process[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2016, 106: 97-105
- [31] Balapure KH, Jain K, Chattaraj S, et al. Co-metabolic degradation of diazo dye — reactive blue 160 by enriched mixed cultures BDN[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2014, 279: 85-95
- [32] Guo G, Tian F, Zhao YH, et al. Aerobic decolorization and detoxification of Acid Scarlet GR by a newly isolated salt-tolerant yeast strain *Galactomyces geotrichum* GG[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2019, 145: 104818