

## 研究报告

# 果糖共代谢强化功能菌群/菌株降解活性黑 5 效能差异及机制比较

张庆云<sup>1</sup>, 宋静茹<sup>1</sup>, 谢学辉<sup>2,3</sup>, 徐大勇<sup>1</sup>, 杨晓凡<sup>1</sup>, 吴佳佳<sup>1</sup>, 吴梦艳<sup>1</sup>,  
叶永康<sup>1</sup>, 祝峻豪<sup>1</sup>

1 安徽工程大学化学与环境工程学院, 安徽 芜湖 241000

2 东华大学环境科学与工程学院 纺织面料技术教育部重点实验室(东华大学) 国家环境保护纺织工业污染防治工程技术中心 中国纺织工业联合会纺织行业污染治理与减排技术重点实验室, 上海 201620

3 上海污染控制与生态安全研究院, 上海 200092

张庆云, 宋静茹, 谢学辉, 徐大勇, 杨晓凡, 吴佳佳, 吴梦艳, 叶永康, 祝峻豪. 果糖共代谢强化功能菌群/菌株降解活性黑 5 效能差异及机制比较[J]. 微生物学通报, 2023, 50(3): 938-953.

ZHANG Qingyun, SONG Jingru, XIE Xuehui, XU Dayong, YANG Xiaofan, WU Jiajia, WU Mengyan, YE Yongkang, ZHU Junhao. Comparison of efficiencies and mechanisms of functional flora/strain in degradation of reactive black 5 enhanced by fructose co-metabolism[J]. Microbiology China, 2023, 50(3): 938-953.

**摘要:** 【背景】偶氮染料及其降解产物对生物具有高毒性和“三致”效应, 利用共代谢强化纯培养细菌菌株或共培养混合菌群降解偶氮染料去除效能是一种环境友好型方法, 但针对共基质调控下菌群/菌株的效能差异机制比较研究有待深入。【目的】考察果糖作为共基质强化功能菌群 DDMZ1 和功能菌株 DDMZ1-1 (经鉴定属于 *Burkholderia* sp.) 降解脱色活性黑 5 (reactive black 5, RB5) 的效能差异机制。【方法】优化功能菌群/菌株培养条件, 对果糖共代谢强化功能菌群/菌株的脱色性能及偶氮还原酶活性进行测定, 通过液相色谱-飞行时间串联质谱联用仪(LC-TOF-MS)及植物毒性实验对 RB5 降解产物进行分析鉴定及毒性评估, 并考察比较功能菌群/菌株对不同结构染料的广谱脱色性能。【结果】功能菌群 DDMZ1 和功能菌株 *Burkholderia* sp. DDMZ1-1 在优化条件下(pH 5.5, 37 °C) 对 RB5 的去除效率分别为 79%和 73%, 而且功能菌群对高盐环境具有更强的适应优势。果糖的添加能够显著提升功能菌群/菌株对不同初始浓度 RB5 的脱色性能, 特别是针对 200 mg/L RB5 的去

资助项目: 国家重点研发计划(2019YFC0408304); 中央高校基本科研业务费专项资金(2232022G-01, 2232021G-11); 上海市自然科学基金面上项目(21ZR1402100); 安徽省教育厅科学研究项目(KJ2021A0496); 安徽省科技厅重点研发项目(201904a07020083); 安徽工程大学引进人才科研启动基金(2020YQQ059); 大学生创新创业训练计划(202110363068) This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFC0408304), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (2232022G-01, 2232021G-11), the General Project of Shanghai Natural Science Foundation (21ZR1402100), the Scientific Research Program of Anhui Provincial Education Department (KJ2021A0496), the Key Research and Development Program of Anhui Provincial Science Technology Department (201904a07020083), the Anhui Polytechnic University Startup Foundation for Introduced Talents (2020YQQ059), and the Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students (202110363068).

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

Received: 2022-06-13; Accepted: 2022-08-09; Published online: 2022-10-18

除效率相较于不添加果糖的样品分别提升了近 21%和 27%。样品 FRU200 (添加果糖)反应 24 h 后显著刺激功能菌群/菌株分泌胞外偶氮还原酶进而增强其活性。LC-TOF-MS 分析显示, RB5 在功能菌群 DDMZ1 果糖共代谢体系中被生物降解成更多分子量低、结构简单的代谢产物。功能菌群/菌株体系中 RB5 降解产物的植物毒性在果糖共代谢作用下均显著降低。功能菌群 DDMZ1 相较于功能菌株 *Burkholderia* sp. DDMZ1-1 对不同结构类型染料具有更强的广谱脱色性能。【结论】功能菌群 DDMZ1 利用果糖共代谢强化活性黑 5 的去除效能、功能酶活、产物脱毒作用均显著优于功能菌株 *Burkholderia* sp. DDMZ1-1, 为共基质生物强化技术在含偶氮染料废水领域的应用提供理论基础。

关键词: 果糖; 功能菌群/菌株; 活性黑 5; 降解产物; 毒性评估

## Comparison of efficiencies and mechanisms of functional flora/strain in degradation of reactive black 5 enhanced by fructose co-metabolism

ZHANG Qingyun<sup>1</sup>, SONG Jingru<sup>1</sup>, XIE Xuehui<sup>\*2,3</sup>, XU Dayong<sup>1</sup>, YANG Xiaofan<sup>1</sup>, WU Jiajia<sup>1</sup>, WU Mengyan<sup>1</sup>, YE Yongkang<sup>1</sup>, ZHU Junhao<sup>1</sup>

1 School of Chemical and Environmental Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu 241000, Anhui, China

2 Key Laboratory of Pollution Control and Emission Reduction Technology for Textile Industry, State Environmental Protection Engineering Center for Pollution Treatment and Control in Textile Industry, Key Laboratory of Textile Science & Technology (Donghua University), Ministry of Education, 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 products are highly toxic and have carcinogenic, teratogenic, and mutagenic effects on organisms. Using co-metabolism to enhance the degradation and removal efficiency of azo dyes by pure cultured bacterial strain or co-cultured flora is environmentally friendly, whereas the comparative study on different efficiencies and mechanisms of bacterial flora/strain under co-substrate regulation needs to be further studied. [Objective] To investigate the efficiencies and mechanisms of functional flora DDMZ1 and strain DDMZ1-1 (identified as *Burkholderia* sp.) in the degradation and decolorization of reactive black 5 (RB5) enhanced by fructose as a co-substrate. [Methods] The culture conditions of functional flora/strain were optimized, and the decolorization performances and azoreductase activities of functional flora/strain enhanced by fructose co-metabolism were determined. The identification and toxicological assessment of RB5 degradation products were performed by the liquid chromatography/time-of-flight/mass spectrometry (LC-TOF-MS) and phytotoxicity test. The broad-spectrum decolorization performances of functional flora/strain on decolorizing dyes with varied structures were compared and investigated. [Results] The removal efficiencies of RB5 by the functional flora DDMZ1 and *Burkholderia* sp. DDMZ1-1 under the optimal conditions (pH 5.5, 37 °C) were 79% and 73%, respectively, and the functional flora exhibited stronger adaptive advantages to the high-salinity environment. The

addition of fructose significantly stimulated the decolorization performance of functional flora/strain to RB5 with different initial concentrations. Compared with the flora/strain samples without fructose, those with fructose increased the removal efficiencies of 200 mg/L RB5 by nearly 21% and 27%, respectively. The sample FRU200 (with fructose) significantly stimulated functional flora/strain to secrete extracellular azoreductases after 24 h, thus enhancing the enzyme activity. LC-TOF-MS analysis indicated that RB5 was biodegraded into various metabolites with low molecular weights and simple structures in the fructose co-metabolic system of functional flora DDMZ1. The phytotoxicity of RB5 degradation products in the flora/strain system was significantly reduced via fructose co-metabolism. Compared with *Burkholderia* sp. DDMZ1-1, the functional flora DDMZ1 exhibited a stronger broad-spectrum degradation ability to dyes with varied structures. **[Conclusion]** Compared with *Burkholderia* sp. DDMZ1-1, the functional flora DDMZ1 has better removal efficiency, functional enzyme activity, and product detoxification of RB5 enhanced by fructose co-metabolism. This paper provides a theoretical basis for the application of co-substrate bioaugmentation technology in the treatment of wastewaters containing azo dyes.

**Keywords:** fructose; functional flora/strain; reactive black 5; degradation products; toxicity assessment

偶氮染料是目前应用最为广泛、品种最多的一类合成染料，而在染色过程中通常约有15%–50%的偶氮染料进入废水<sup>[1]</sup>。这些带有深色的偶氮染料及其芳香胺的还原代谢产物对多种生物具有高毒性、致突变性和致癌性<sup>[2]</sup>。因此，大量含有偶氮染料的有色废水若不经处理排放到自然水体，不仅降低洁净水的可用量，而且会对生态系统产生不利影响，最终危害人体健康<sup>[3]</sup>。因此，在偶氮染料及其残留的中间体进入环境之前进行有效处理是必不可少的步骤。

目前，生物法在偶氮染料废水处理过程中有着广阔的应用前景，这主要归因于其成本低廉、处理量大、环境友好等优点。许多国内外学者将从不同环境中分离筛选出的具有独特代谢特性的微生物作为生物资源广泛应用于对某些特定污染物的降解<sup>[4-5]</sup>，其中，细菌已经被证实印染废水处理过程中发挥了重要作用<sup>[6-7]</sup>。目前已有大量文献报道了一些对偶氮染料具有降解脱色能力的细菌菌株<sup>[8-9]</sup>。Mahmood 等<sup>[10]</sup>从

纺织废水灌溉的土壤中分离出一株 *Bacillus* sp. SR-2-1/1，该菌株能够耐受高浓度重金属并高效脱色活性黑 5、直接蓝 1 等偶氮染料，可作为菌剂对偶氮染料污染的土壤进行生物修复以提高农业生产力。但单一菌株处理偶氮染料的种类有限且对作用条件的适应范围较窄，不能更进一步降解产生的芳香胺类致癌性中间代谢产物<sup>[11]</sup>。然而由不同菌株组成、结构复杂的微生物菌群具有不同菌株分解代谢多样性的互补性及对外界环境的强适应性，进而使得微生物菌群具有对染料更高的脱色性能及更广泛的底物特异性，而且可以借助微生物之间的协同作用实现对偶氮染料的彻底降解与矿化<sup>[12-13]</sup>。据报道，一种从受污染土壤中分离出的嗜热菌群在偶氮染料直接黑 G 初始浓度为 200–600 mg/L 范围内生长良好，而且培养 48 h 后脱色率均高达 95%以上<sup>[13]</sup>。然而，针对上述纯培养细菌菌株与共培养混合菌群脱色性能的比较研究很少，而有关其潜在效能差异机制的报道则更

少。

共代谢作为一种发展前景广阔的技术,已被广泛应用于提高对难降解污染物的生物去除性能。目前,大多数偶氮染料在降解体系中无法作为微生物生长和代谢的唯一碳源或能源。因此,向微生物系统中投加最佳共基质,特别是糖源可显著促进微生物生长并激活特异性/非特异性酶,进而大大增强对偶氮染料的生物处理能力。例如,经常用作增强偶氮染料脱色性能的首选共基质葡萄糖, Eskandari 等<sup>[7]</sup>将其投加到由耐低温细菌组成的菌群 StSp 中以提升该菌群对 RB5 的脱色能力。一株新分离的假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)利用果糖作为共基质,在优化条件下(pH 7.0, 37 °C)培养 24 h 对 50 mg/L 初始浓度的偶氮染料 C.I.活性红 H-3B 的脱色率高达 96%<sup>[14]</sup>。因此,采用共基质强化技术提高纯培养细菌菌株或共培养混合菌群脱色效能是一个值得探索的研究方向,但目前对共基质强化技术的研究主要集中在强化细菌脱色效能方面,对其中的功能酶作用机制、微生物学作用机理研究尚不足。

前期功能菌群 DDMZ1 利用在代谢水平上互为关联的糖源(葡萄糖、果糖、蔗糖、葡萄糖+果糖)共代谢脱色降解偶氮染料的效能差异比较研究中,果糖在所选糖源中被证实是最佳共基质<sup>[15]</sup>。基于此,本研究旨在考察并比较最佳糖源——果糖作为共基质强化功能菌群 DDMZ1 和功能菌株 *Burkholderia* sp. DDMZ1-1 降解脱色高毒性双偶氮染料 RB5 的效能差异机制。实验对功能菌群/菌株的理化特性和培养条件(pH、温度和盐浓度)进行优化。通过对染料 RB5 初始浓度的耐受性评价果糖在功能菌群/菌株降解体系中的共代谢潜力,并考察比较功能菌群/菌株降解脱色 RB5 过程中分泌的偶氮还原酶活性。通过液相色谱-飞行时间串联质谱联用仪(liquid

chromatography/time-of-flight/mass spectrometry, LC-TOF-MS)鉴定 RB5 降解产物并提出果糖共代谢体系中的 RB5 降解路径。此外,通过绿豆毒性实验对 RB5 及其降解产物进行植物毒性评估,考察比较功能菌群/菌株对不同结构类型染料的广谱脱色性能。本研究以期揭示功能菌群/菌株利用果糖共代谢降解脱色活性黑 5 的效能差异情况及其微观生物学作用机制,为共基质生物强化技术在含偶氮染料废水领域的应用提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品

功能菌群/菌株来源于从上海松江污水处理厂二沉池中收集的新鲜活性污泥,将其作为接种微生物用无菌玻璃珠在无菌条件下打散制成污泥悬液。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

活性黑 5 (reactive black 5, RB5), Sigma-Aldrich 公司;活性艳蓝、孔雀石绿、刚果红、酸性橙 7、酸性红 112、酸性黑 1, 上海安谱实验科技股份有限公司;酵母提取物、果糖, 生工生物工程(上海)股份有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司;磷酸二氢钾、无水硫酸钠、氯化铵, 上海国药集团化学试剂有限公司。

压力蒸汽灭菌锅, 上海申安医疗器械厂;超净工作台, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂;微量紫外分光光度计, Implen 公司;高速冷冻离心机, Thermo 公司;PCR 扩增仪, 杭州朗基科学仪器有限公司;生化培养箱, 上海那艾精密仪器有限公司。

#### 1.1.3 培养基

基础培养基(g/L): 磷酸二氢钾 2.66, 无水

硫酸钠 0.50, 氯化铵 0.20, 酵母提取物 3.00。果糖培养基是在基础培养基成分的基础上添加 3.00 g/L 果糖制备而成。实验所用培养基均需用高压灭菌锅 0.10 MPa 灭菌 30 min。

## 1.2 功能菌群/菌株的筛选驯化与分离鉴定

将污泥悬液接种于基础培养基中, 通过浓度梯度压力驯化法筛选出对偶氮染料 RB5 具有高效脱色降解性能的天然功能菌群 DDMZ1, 具体过程见已发表的相关报道<sup>[16]</sup>。

利用固体平板分离纯化法从功能菌群 DDMZ1 中分离获得一株高效脱色降解 RB5 的单菌 DDMZ1-1。利用细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取该菌株的基因组, 采用 PCR 扩增单菌的 16S rRNA 基因, 所用引物为 27F (5'-AGAGT TTAGCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACC TTGTTACGACTT-3')<sup>[17]</sup>。PCR 反应体系(25  $\mu$ L): 10 $\times$ Taq buffer 2.5  $\mu$ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 1  $\mu$ L, 正、反向引物(10  $\mu$ mol/L)各 0.5  $\mu$ L, Taq DNA 聚合酶(5 U/ $\mu$ L) 0.2  $\mu$ L, DNA 模板 0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足 25  $\mu$ L。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 4 min; 94  $^{\circ}$ C 45 s, 55  $^{\circ}$ C 45 s, 72  $^{\circ}$ C 60 s, 30 次循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min; 4  $^{\circ}$ C 保存。扩增后的产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测质量后, 委托生工生物工程(上海)股份有限公司对 PCR 产物进行纯化与序列测定。最后利用 BLAST 工具将获得的序列与 NCBI 上 GenBank 数据库中保存的序列进行比对, 确定菌属, 并使用 MEGA 5 软件为该单菌构建系统发育树<sup>[18]</sup>。

## 1.3 不同理化条件对功能菌群/菌株脱色及生物量的影响

将基础培养基分别用醋酸盐、磷酸盐和硼酸盐缓冲液调节至不同 pH 值(3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0), 置于不同温度(25、30、35、37、40、45  $^{\circ}$ C)、盐浓度(0%、0.5%、

1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5% NaCl, 质量体积分数)条件下恒温静置培养 48 h, 以评估和比较不同理化条件对功能菌群/菌株脱色 RB5 效能及生物量的影响。每个实验条件做 3 组平行试验, 脱色率根据公式(1)计算, 细菌生物量通过衡量菌体密度的指标  $OD_{600}$  来表征<sup>[19]</sup>。

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

式中:  $A_0$  为染料溶液脱色前的初始吸光度值;

$A_t$  为染料溶液特定反应时间( $t$ )后的吸光度值。

## 1.4 果糖对功能菌群/菌株脱色不同初始浓度 RB5 的影响

在优化条件下向基础培养基和果糖培养基中分别添加不同初始浓度(100、200、300、400、500、600、800、1 000、1 500 mg/L) RB5, 于培养箱中 37  $^{\circ}$ C 静置培养 48 h 后测定脱色液脱色率, 以评价果糖作为共基质对功能菌群/菌株脱色 RB5 的影响。每个初始 RB5 浓度条件做 3 组平行试验。

## 1.5 偶氮还原酶活性测定

按 10% (体积分数)的接种量将功能菌群 DDMZ1 和功能菌株 DDMZ1-1 分别接种于 200 mg/L RB5 的基础培养基和果糖培养基中, 于 37  $^{\circ}$ C 恒温静置培养后测定偶氮还原酶活性, 以研究不同时刻(6、12、24 h)果糖对功能菌群/菌株脱色降解 RB5 过程中胞内和胞外偶氮还原酶活性的影响。每个实验条件做 3 组平行, 胞内和胞外偶氮还原酶活性的测定方法具体见已发表的相关报道<sup>[15]</sup>。

## 1.6 RB5 降解产物分析

### 1.6.1 紫外可见全波长分光光谱分析(ultraviolet-visible spectroscopy, UV-Vis)

将功能菌群 DDMZ1 和功能菌株 DDMZ1-1 按 10% (体积分数)的接种量分别接种于 200 mg/L RB5 的基础培养基和果糖培养基中, 于 37  $^{\circ}$ C

恒温静置培养。取 0、6、12、24 h 脱色液各 2 mL, 8 000 r/min 离心 10 min 收集上清液。将收集的上清液稀释 8 倍, 在 200–800 nm 波长范围内测定其紫外可见全光谱图。

### 1.6.2 液相色谱-飞行时间串联质谱联用分析 (LC-TOF-MS)

取上述条件下 24 h 脱色液各 100 mL, 以 8 000 r/min 离心 10 min 后保留上清液。用 0.22  $\mu\text{m}$  水相针式滤器过滤上清液并转移至色谱瓶中, 利用液相色谱-飞行时间串联质谱联用仪 (LC-TOF-MS, Agilent QTOF6520) 分析鉴定 RB5 降解产物。色谱柱采用 Agilent zorbax 300 Extend-C18 (4.6 mm $\times$ 150 mm), 柱填料粒径为 3.5  $\mu\text{m}$ 。二元流动相 A 为含 20 mmol/L 乙酸铵的超纯水, 流动相 B 为含 20 mmol/L 乙酸铵的甲醇, 洗脱方式是流动相 A 从 0 min (75%) $\rightarrow$ 8 min (65%) $\rightarrow$ 12 min (65%) $\rightarrow$ 14 min (75%) $\rightarrow$ 22 min (75%)。将来自 HPLC 柱的洗脱液依次导入二极管阵列检测器和 Q-TOF 质谱仪的电喷雾电离源。质谱仪在 50–1 100  $m/z$  的正负离子模式下检测。干燥气体的流速、温度和喷雾压力分别为 9 L/min、300  $^{\circ}\text{C}$  和 40 psig。毛细管电压和锥孔电压分别保持在 170 V 和 65 V。

### 1.7 毒性评估

通过绿豆毒性实验对 RB5 及其降解产物进行植物毒性评估, 以评价果糖作为共基质对功能菌群/菌株脱色降解 RB5 后的产物毒性影响。绿豆毒性实验选用绿豆种子作为研究对象, 分别用 10 mL 超纯水、RB5 溶液 (200 mg/L) 及其 48 h 后降解产物灌溉种子 (种子数量均为 20 粒), 于 25  $^{\circ}\text{C}$  恒温箱中孵育 2 d 后记录种子发芽率 (%), 5 d 后记录种子的胚根长度、胚芽长度及种子鲜重, 并计算胚芽和胚根的生长抑制率<sup>[20]</sup>。

### 1.8 染料广谱脱色性能评估

按 10% (体积分数) 的接种量将功能菌群

DDMZ1 和功能菌株 DDMZ1-1 分别接种于基础培养基和果糖培养基中, 加入不同结构的染料 (活性黑 5、活性艳蓝、孔雀石绿、刚果红、酸性橙 7、酸性红 112 和酸性黑 1) 使这些染料的终浓度均为 200 mg/L。于 37  $^{\circ}\text{C}$  下恒温静置培养 48 h 后测定脱色液脱色率, 以评价果糖作为共基质对功能菌群/菌株脱色不同结构染料广谱性能的影响。每种染料条件做 3 组平行试验。

### 1.9 统计学分析

采用 Origin 8.0 软件进行基础数据处理。利用 IBM SPSS Statistics 26 软件进行统计分析, 结果用平均值 $\pm$ 标准差表示, 对不同处理组数据进行单因素方差分析,  $P < 0.05$  表明数据存在显著性差异。

## 2 结果与讨论

### 2.1 功能菌株鉴定

从功能菌群 DDMZ1 中共分离出近 13 种不同的单菌, 其中菌株 DDMZ1-1 生长迅速, 对 RB5 的脱色降解能力最强。菌株 DDMZ1-1 是一种革兰氏阴性细菌, 菌体形态特征呈现杆状 (图 1A)。基于序列相似性分析结果可知, 菌株 DDMZ1-1 与伯克霍尔德菌 (*Burkholderia* sp.) TSH72 (GenBank 登录号为 AB508863) 表现出 99% 的相似性。因此, 功能菌株 DDMZ1-1 被鉴定为伯克霍尔德菌, 将其命名为 *Burkholderia* sp. DDMZ1-1, GenBank 登录号为 MK583567。图 1B 显示了 *Burkholderia* sp. DDMZ1-1 与其他细菌之间的系统发育关系。

### 2.2 不同理化条件对功能菌群/菌株脱色及生物量的影响

从图 2A 可以明显看出, 样品在 pH 3.0 时脱色率极低, 表明过酸环境会严重抑制功能菌群/菌株对 RB5 的脱色效果; 而当 pH 5.5 时功能菌群 DDMZ1 和功能菌株 *Burkholderia* sp.

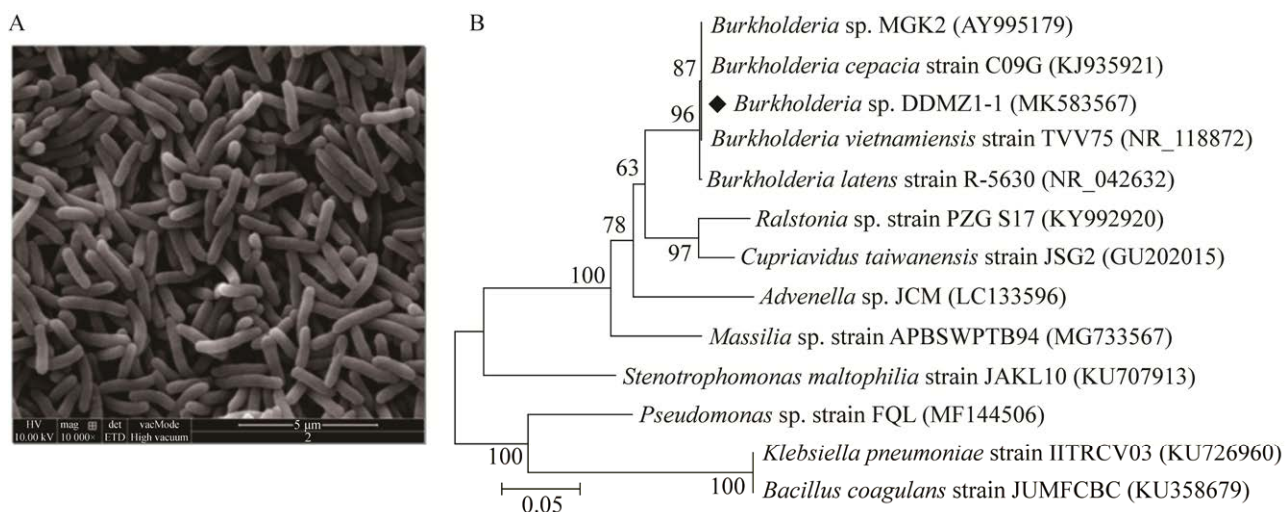


图1 *Burkholderia* sp. DDMZ1-1 的扫描电镜图(A)和系统发育树(B) 采用邻位相连法构建的系统发育树,分支节点上和括号中的数字分别表示 1 000 次重复的>50%的引导值和 GenBank 登录号;标尺 0.05 代表核苷酸替换率

Figure 1 The SEM photograph (A) and phylogenetic tree (B) of *Burkholderia* sp. DDMZ1-1. The tree was constructed using the neighbor-joining method, and the bootstrap values>50% based on 1 000 replications and GenBank accession numbers were given at branch points and brackets, respectively; Scale bar indicated 0.05 substitutions per nucleotide position.

DDMZ1-1 对 200 mg/L RB5 脱色效果最佳, 48 h 脱色率分别达到了 81%和 73%。此外, 功能菌群/菌株在 pH 适应性方面相较于菌群 StSp (pH 6.0–11.0)<sup>[7]</sup>和单菌 *Trichoderma harzianum* RY44 (pH 3.0–6.0)<sup>[21]</sup>有较大优势。除了 pH 外, 环境温度和盐度对微生物脱色性能也有显著影响。如图 2B 所示, 在温度 25–37 °C 范围内, 功能菌群/菌株对 RB5 脱色效果随着温度的升高而增加, 而且在 37 °C 时分别达到了 79%和 73% 的最大脱色率; 但当温度升高至 45 °C 时样品几乎无脱色效果, 这主要是由于高温严重抑制了功能菌群/菌株细胞内酶的活性并导致部分酶失活。由图 2C 可知, 功能菌群/菌株在 NaCl 浓度为 2.0% 时对 RB5 的脱色效果最好, 48 h 脱色率分别达到了 84%和 80%; 而在 5.0% 的高盐浓度下, 功能菌群/菌株对 RB5 仍有较高的脱色性能(62%和 35%)。据报道, 一株从印染

废水活性污泥中分离获得的单菌 *Pigmentiphaga daeguensis* AN-4a 在 NaCl 浓度增加到 0.5% 时, 对 10 mg/L 苯胺的去除率仅为 15.5%<sup>[22]</sup>。因此, 功能菌群/菌株均具有较高的耐盐性。此外, 从上述这些图中可以明显看出, 功能菌群 DDMZ1 在优化条件下(pH 5.5, 37 °C)对 RB5 的去除效率均高于功能菌株 *Burkholderia* sp. DDMZ1-1, 而且功能菌群对碱性及高盐环境均有更显著的适应性( $P < 0.05$ )。

由图 2 中生物量结果可知, 功能菌群/菌株在不同理化条件下的菌体密度具有明显差异( $P < 0.05$ )。将其与脱色结果相比较, 可以明显看出生物量的增加并不意味着脱色率的增加。例如, 在图 2D 中功能菌群 DDMZ1 在 pH 3.5 时  $OD_{600}$  为 2.22, 脱色率为 51% (图 2A), 而在 pH 5.0 时脱色率为 74%,  $OD_{600}$  仅为 1.88。比较图 2B、2C 和图 2E、2F 还会有更多类似的结果, 且该结论

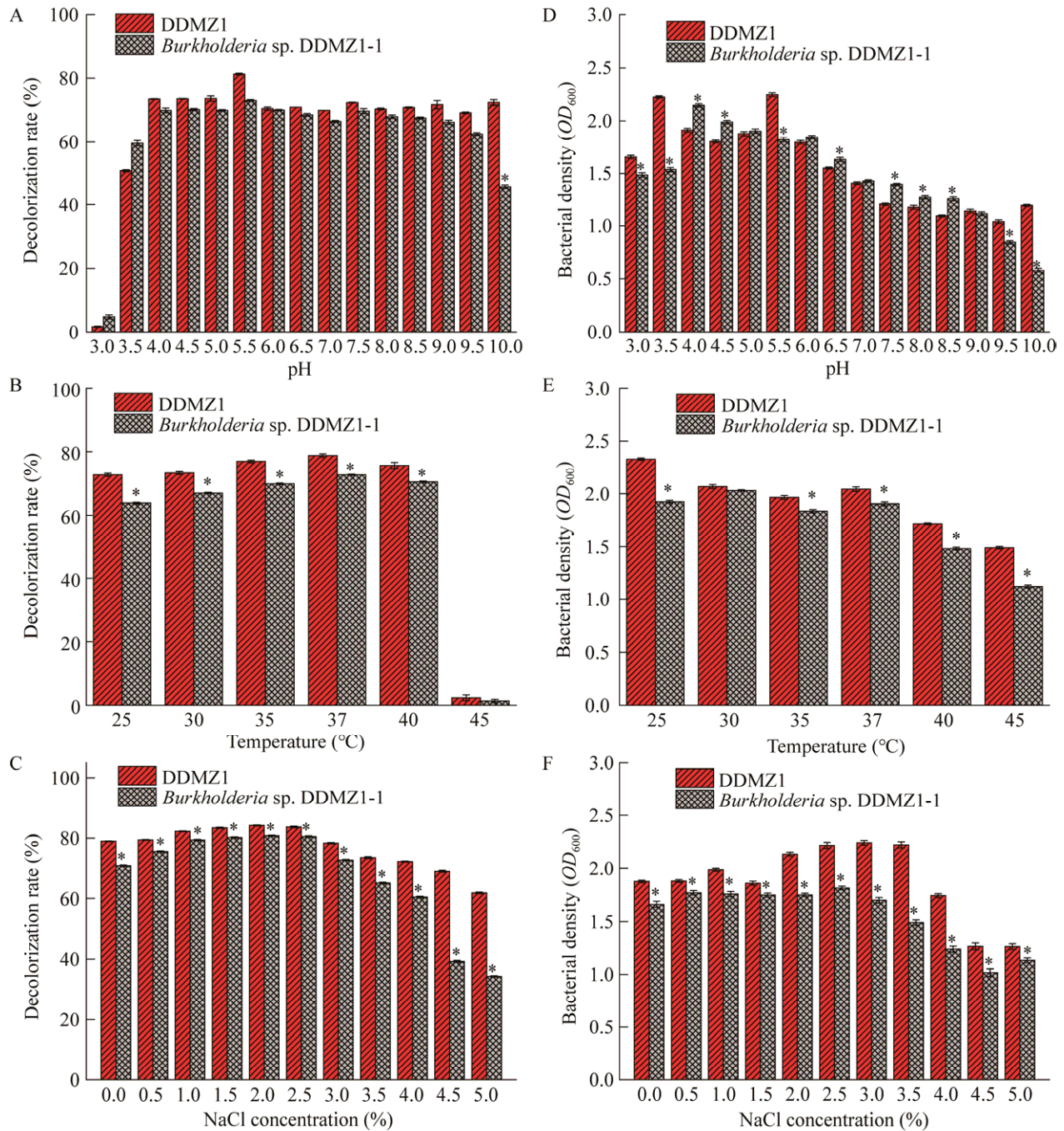


图 2 不同理化条件对功能菌群/菌株脱色性能和生物量的影响

Figure 2 Effects of disparate physicochemical conditions on decolorization performance and bacterial density of functional flora/strain. \*:  $P < 0.05$ .

同样适用于功能菌株 *Burkholderia sp. DDMZ1-1*。这表明细菌生物量并不是功能菌群/菌株脱色 RB5 的决定性因素, 可能还受到其他内在因素的影响, 如菌群群落结构、酶的分泌等。

### 2.3 果糖对功能菌群/菌株脱色不同初始浓度 RB5 的影响

由图 3 可知, 功能菌株的 FRU 组(添加果糖)与 BAC 组(不添加果糖)相比差异显著( $P < 0.05$ ),



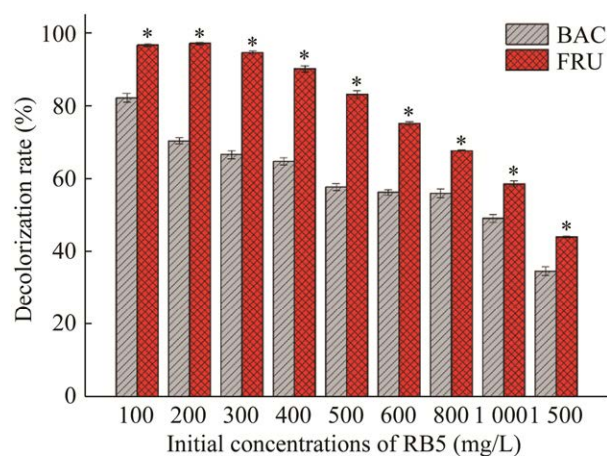


图3 果糖对功能菌株 *Burkholderia sp.* DDMZ1-1 脱色不同初始浓度 RB5 的影响 BAC: 基础培养基+功能菌株+不同初始浓度 RB5; FRU: 果糖培养基+功能菌株+不同初始浓度 RB5

Figure 3 Effect of fructose on decolorization performance on different initial concentrations of RB5 by *Burkholderia sp.* DDMZ1-1. BAC: Basic medium+*Burkholderia sp.* DDMZ1-1+RB5; FRU200: Fructose medium+*Burkholderia sp.* DDMZ1-1+RB5. \*:  $P < 0.05$ .

说明果糖的添加能够显著提升功能菌株对不同初始浓度 RB5 的脱色性能。结合比较已发表在相关文献中的功能菌群对应实验结果<sup>[23]</sup>可知, 功能菌群/菌株在果糖培养基中对 200 mg/L RB5 的

脱色效率分别高达 98%和 97%, 比不添加果糖样品的脱色率提升了近 21%和 27%。在已报道的研究中, 一株酿酒酵母菌 X19G2 利用葡萄糖作为共基质在 48 h 内对 150 mg/L RB5 的最大脱色效率也高达 99%<sup>[24]</sup>。这说明针对同一目标污染物, 不同的微生物对糖源的响应不同, 而导致这种共代谢特异性的潜在机制可能与酶的分泌、功能基因和功能蛋白的差异表达等内在因素有关。之后随着 RB5 初始浓度的增加, 功能菌群/菌株对 RB5 的脱色率有所下降, 但在果糖培养基中对 1 500 mg/L RB5 的脱色率仍达到了 48%和 44%左右。因此, 在难降解印染废水处理过程中添加果糖以提高脱色效率是可行的, 且功能菌群/菌株对高浓度 RB5 的耐受性和脱色潜力使其成为具有良好降解应用前景的生物资源。

## 2.4 偶氮还原酶分析

由表 1 可知, 功能菌群/菌株参与 RB5 降解脱色的偶氮还原酶活性随着反应时间的增长而增强, 且所有样品的胞外偶氮还原酶活性相较于胞内偶氮还原酶活性均显著增加了近 2-3 倍。据报道, 单菌 *Alishewanella sp.* CBL-2 对偶氮染料的降解脱色主要归因于胞外酶<sup>[25]</sup>。这些

表 1 不同时刻降解脱色后胞内和胞外偶氮还原酶活性

Table 1 Intracellular and extracellular azoreductase activities after decolorization at different reaction times

功能菌群/菌株 Functional flora/Strain	样品 Samples	偶氮还原酶活性 Azoreductase activity (U/mg-protein)									
		胞内 Intracellular (6 h)		胞外 Extracellular (6 h)		胞内 Intracellular (12 h)		胞外 Extracellular (12 h)		胞内 Intracellular (24 h)	
DDMZ1	BAC200	5.30±0.15b	14.11±0.07b	9.64±0.08b	18.26±0.11b	12.39±0.04b	22.50±0.10c				
	FRU200	9.26±0.17a	21.20±0.09a	12.73±0.08a	26.47±0.12a	17.14±0.09a	30.12±0.12a				
<i>Burkholderia sp.</i> DDMZ1-1	BAC200	3.33±0.04d	9.70±0.09d	4.61±0.02d	11.48±0.07d	6.21±0.04d	19.65±0.14d				
	FRU200	4.82±0.07c	10.27±0.07c	6.43±0.05c	16.64±0.04c	10.47±0.08c	24.14±0.12b				

BAC200: 基础培养基+功能菌群/菌株+RB5 (200 mg/L); FRU200: 果糖培养基+功能菌群/菌株+RB5 (200 mg/L). 数据为 3 次重复的平均值±标准误差. 同列不同小写字母表示不同样品间的显著性差异( $P < 0.05$ )

BAC200: Basic medium+functional flora/strain+RB5 (200 mg/L); FRU200: Fructose medium+functional flora/strain+RB5 (200 mg/L). Data were shown as Mean±SE of 3 replicates. Different lowercase letters in the same column indicated significant differences among disparate samples ( $P < 0.05$ ).

结果表明, 功能菌群/菌株降解脱色 RB5 主要依靠于胞外偶氮还原酶的作用。此外, 接种功能菌群 DDMZ1 的样品在不同时刻的胞内和胞外偶氮还原酶活性均明显高于接种功能菌株 *Burkholderia* sp. DDMZ1-1 的样品。例如, 接种功能菌群 DDMZ1 的样品 BAC200 培养 24 h 后的胞内和胞外偶氮还原酶活性分别为 12.39 U/mg-protein 和 22.50 U/mg-protein, 而接种功能菌株 *Burkholderia* sp. DDMZ1-1 的样品 BAC200 中胞内和胞外偶氮还原酶活性分别为 6.21 U/mg-protein 和 19.65 U/mg-protein。添加

果糖组别的偶氮还原酶活性较不添加果糖样品显著提升( $P < 0.05$ ), 特别是接种功能菌群 DDMZ1 的样品 FRU200 培养 24 h 后的胞外偶氮还原酶活性比样品 BAC200 高约 7.62 U/mg-protein。因此, 果糖作为共基质能显著刺激功能菌群/菌株分泌偶氮还原酶, 进而增强其催化偶氮键还原裂解的活性<sup>[9]</sup>。

## 2.5 RB5 降解产物

### 2.5.1 UV-Vis 分析

RB5 在 597、392 和 311 nm 处有 3 个特征吸收峰(图 4), 主要归因于偶氮双键体系中存在

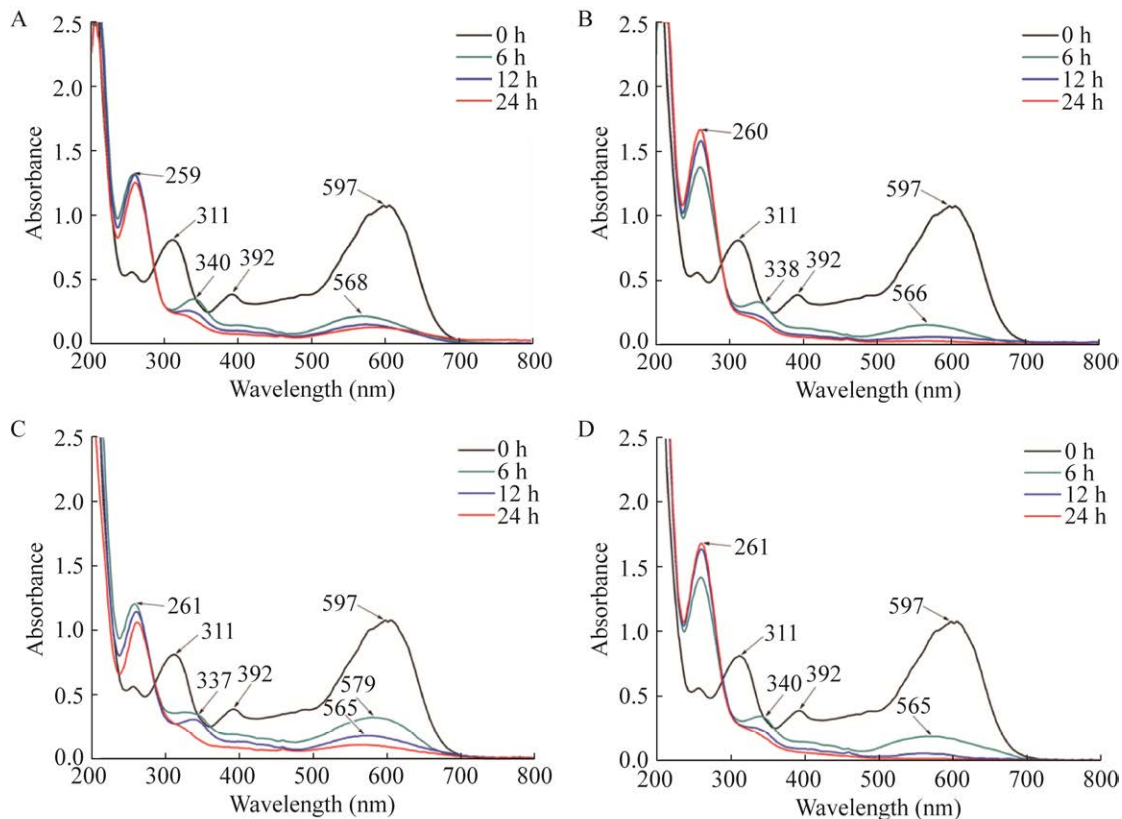


图 4 功能菌群/菌株对 RB5 脱色 6、12、24 h 的紫外-可见扫描谱图 A: BAC200-基础培养基+DDMZ1+RB5 (200 mg/L). B: FRU200-果糖培养基+DDMZ1+RB5 (200 mg/L). C: BAC200-基础培养基+*Burkholderia* sp. DDMZ1-1+RB5 (200 mg/L). D: FRU200-果糖培养基+*Burkholderia* sp. DDMZ1-1+RB5 (200 mg/L)

Figure 4 The UV-vis spectra of RB5 treated for 6 h, 12 h, 24 h by the flora/strain in BAC and FRU media. A: BAC200-basic medium+DDMZ1+RB5 (200 mg/L). B: FRU200-fructose medium+DDMZ1+RB5 (200 mg/L). C: BAC200-basic medium+*Burkholderia* sp. DDMZ1-1+RB5 (200 mg/L). D: FRU200-fructose medium+*Burkholderia* sp. DDMZ1-1+RB5 (200 mg/L).

的发色基团以及萘和苯组分<sup>[26-27]</sup>。脱色不同时间后的 RB5 光谱显示, 3 个特征吸收峰显著降低, 且在 579、565、340 和 261 nm 等波长处检测到新的吸收峰。这一系列特征峰波长和峰强的变化表明 RB5 染料分子中的主要发色基团已被功能菌群/菌株(部分)降解, 产生了新的代谢产物。此外, 接种功能菌群 DDMZ1 的样品脱色不同时刻后的 3 个特征吸收峰强度均低于接种功能菌株 *Burkholderia* sp. DDMZ1-1 的样品, 表明功能菌群 DDMZ1 对 RB5 的降解脱色能力更强。然而样品 FRU200 (含果糖)脱色不同时间后检测到的 3 个特征吸收峰强度相较于样品 BAC200 (不含果糖)也显著降低, 这进一步证明了果糖的添加对功能菌群/菌株降解脱色 RB5 的促进效果。

### 2.5.2 LC-TOF-MS 分析

功能菌群 DDMZ1 对 RB5 的代谢产物研究已经发表在相关文献[23]中, 为了深入比较功能菌群/菌株降解 RB5 过程中的产物差异性, 本实验采用 LC-TOF-MS 技术进一步鉴定了 RB5 在功能菌株体系中的降解产物, 并推导出 RB5 的降解路径(图 5)。

在样品 BAC200 (不含果糖)中, RB5 的偶氮键首先被功能菌株 *Burkholderia* sp. DDMZ1-1 分泌的偶氮还原酶对称裂解为 1,2,7-三氨基-8-羟基萘-3,6-二磺酸(TAHNDS)和 2-[(4-氨基苯)磺酰基]硫酸氢乙酯(图 5A), 但这 2 个中间代谢产物在功能菌群降解体系中均未检测到。随后, TAHNDS 在接触氧气后容易自发地去除 2 个氢离子, 形成中间体 7-氨基-8-羟基-1,2-萘醌-3,6-二磺酸-1,2-二亚胺(TAHNDS<sub>DP1</sub>), 再自氧化生成二羟基萘醌-3,6-二磺酸化亚胺(TAHNDS<sub>DP2</sub>)<sup>[28]</sup>。2-[(4-氨基苯)磺酰基]硫酸氢乙酯经过脱磺酸和羟基化作用转化为 2-(4-氨基苯磺酰基)乙醇(p-Base), 再通过脱羟基化和脱氢作用生成 4-乙

烯磺酰基-苯胺(vinyl-p-Base), 且这 2 个中间代谢产物经常在染料 RB5 降解过程中被检测到<sup>[29-30]</sup>。vinyl-p-Base 经过脱磺酸和羟基化作用进一步转化为 4-氨基苯酚, 并开环裂解生成终产物 6-氨基-6-氧己酸, 而 RB5 在功能菌群不含果糖降解体系中的终产物是 6-氧代-庚酸酰胺。

在添加果糖的样品 FRU200 中检测到更多低分子量、结构简单的代谢产物, 并推导出更多潜在的降解路径(图 5B)。首先, RB5 的双偶氮键经功能菌株对称和不对称还原裂解和脱磺酸作用生成分子量分别为 189.22、281.30、316.28 g/mol 的 2,7,8-三氨基-萘-1-醇、2-[(4-氨基苯)磺酰基]硫酸氢乙酯和 2-(4-二氮烯基-苯基-磺酰基)-乙基磺酸钠, 但在功能菌群果糖降解体系中未检测到前两种中间产物。随后, 2,7,8-三氨基-萘-1-醇通过脱氨基和羟基化作用转变成 7,8-二氨基-萘-1,2-二醇。该中间代谢产物芳香环上相邻位置的 2 个羟基被进一步氧化生成 7,8-二氨基-萘-1,2-二酮, 之后芳香环发生裂解形成 2,3-二氨基-6-(2-羧基乙基)苯甲酸, 这一代谢过程与之前 Adnan 等<sup>[26]</sup>的报道一致。最后该产物进一步被催化裂解为(Z)-己二烯酸, 或经脱羧、脱氨基和甲基化作用生成 2,4-二叔丁基苯胺。然而在功能菌群果糖降解体系中, 2,3-二氨基-6-(2-羧基乙基)苯甲酸通过部分脱羧作用生成 2,3-二氨基苯甲酸。2-(4-二氮烯基-苯基-磺酰基)-乙基磺酸钠通过加氢作用和脱磺酸作用转化成 2-[(4-胂苯基)磺酰基]乙醇, 接着通过脱氨基作用形成 p-Base, 而 2-[(4-氨基苯)磺酰基]硫酸氢乙酯则通过脱磺酸作用直接转化成 p-Base。之后 p-Base 的降解转化过程与样品 BAC200 中相同, 并且生成终产物 6-氨基-6-氧己酸。功能菌群果糖体系中这部分降解路径与功能菌株类似, 但未检测到中间产物 2-[(4-胂苯

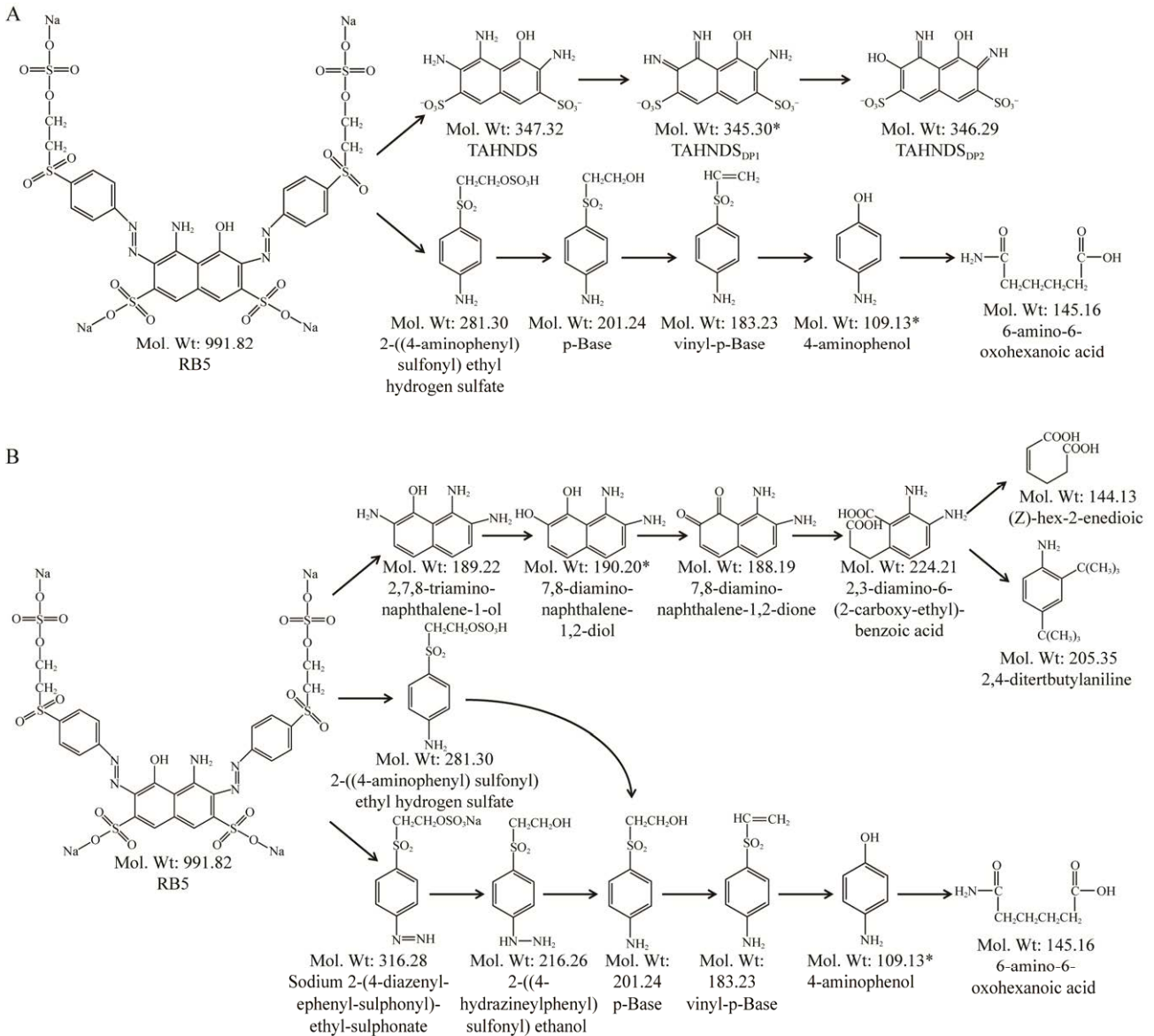


图 5 RB5 在接种功能菌株样品中的降解路径 A: BAC200-基础培养基+*Burkholderia* sp. DDMZ1-1+RB5 (200 mg/L). B: FRU200-果糖培养基+*Burkholderia* sp. DDMZ1-1+RB5 (200 mg/L). \*: 根据 LC-TOF-MS 结果推测但未检测到的降解产物

Figure 5 Proposed pathways for RB5 degradation in the samples inoculated with *Burkholderia* sp. DDMZ1-1. A: BAC200-basic medium+*Burkholderia* sp. DDMZ1-1+RB5 (200 mg/L). B: FRU200-fructose medium+*Burkholderia* sp. DDMZ1-1+RB5 (200 mg/L). \*: By-products were not detected but postulated from LC-TOF-MS results.

基)磺酰基]乙醇, 且生成的终产物是 6-氧代-庚酸酰胺。

大部分检测出的降解产物是无色的, 因为它们无像偶氮键那样的生色团。显然, RB5 在

功能菌群 DDMZ1 和功能菌株 *Burkholderia* sp. DDMZ1-1 体系中的降解路径表现出了较大的相似性与一定的差异性。其中, RB5 在功能菌群 DDMZ1 体系中被生物降解成分子量更小且

结构更简单的代谢产物,且添加果糖的样品 FRU200 比对照样品 BAC200 代谢形成的降解产物更多。

## 2.6 毒性评估

短期且敏感的生态毒理学生物测定,如种子萌发和幼苗早期生长试验,常用来评估化学药品和工业废水的植物毒性<sup>[20]</sup>。本实验采用绿豆作为处理对象,以超纯水和 RB5 染料作为空白对照,比较研究了果糖共基质对功能菌群/菌株降解脱色 RB5 后的产物植物毒性影响,结果如表 2 所示。

与对照样品超纯水相比,未经处理的 RB5 染料显著抑制了绿豆的种子萌发和幼苗生长 ( $P<0.05$ ),其中对幼苗根长的抑制率高达 88.4%,表明母体染料 RB5 对绿豆种子具有极大的植物毒性作用。接种了功能菌株 *Burkholderia* sp. DDMZ1-1 的样品 BAC200 具有最低的绿豆幼苗根长和鲜重,说明 RB5 经功能菌株生物降解后的产物比 RB5 染料本身毒性更强。然而接种了

功能菌群 DDMZ1 的样品 BAC200 的茎长和鲜重均高于 RB5 染料样品,表明功能菌群对 RB5 有较好的脱毒作用。分别接种了功能菌群/菌株的样品 FRU200 (含果糖)对绿豆种子萌发几乎无抑制作用,且 FRU200 的绿豆幼苗生长参数值相较于 RB5 和对应的 BAC200 均有提升,特别是在 DDMZ1 降解液中孵育的幼苗根长及在功能菌株组别中的幼苗茎长和鲜重均具有明显差异 ( $P<0.05$ )。因此,果糖作为共基质可显著促进功能菌群/菌株对 RB5 降解产物的脱毒作用。

## 2.7 染料广谱脱色性能评估

由图 6 可知,功能菌群/菌株对不同染料的脱色效率存在显著差异,而这种差异性主要是由染料的不同化学结构和取代基类型引起的<sup>[31]</sup>。在 BAC 培养基中,功能菌群 DDMZ1 对除刚果红外其他染料的脱色效率均普遍高于功能菌株 *Burkholderia* sp. DDMZ1-1。例如,功能菌群 DDMZ1 对 200 mg/L 酸性橙 7 的脱色率达到 76%左右,而功能菌株 *Burkholderia* sp. DDMZ1-1

表 2 RB5 及其降解产物毒性对绿豆种子萌发及幼苗生长参数的影响

Table 2 Effect of RB5 and its degradation products toxicity on seed germination and early seedling growth parameters of mung bean

参数 Parameter	超纯水	RB5	DDMZ1		<i>Burkholderia</i> sp. DDMZ1-1	
	Ultrapure water		BAC200	FRU200	BAC200	FRU200
种子萌发率 Seed germination rate (%)	100	95	95	100	95	100
茎长 Shoot length (cm)	4.10±0.25a	1.31±0.14c	1.81±0.29bc	1.85±0.25b	1.33±0.37bc	1.81±0.28bc
茎长抑制率 Shoot length inhibition rate (%)	0	68.0	55.9	54.9	67.6	55.9
根长 Root length (cm)	3.10±0.17a	0.36±0.07bc	0.18±0.05c	0.40±0.11b	0.17±0.08c	0.28±0.09bc
根长抑制率 Root length inhibition rate (%)	0	88.4	94.2	87.1	94.5	91.0
鲜重 Fresh weight (g)	0.36±0.05a	0.21±0.07b	0.22±0.04b	0.25±0.02b	0.18±0.04b	0.21±0.03b

BAC200-基础培养基+功能菌群/菌株+RB5 (200 mg/L); FRU200-果糖培养基+功能菌群/菌株+RB5 (200 mg/L). 数据为 3 次重复的平均值±标准误差. 同行不同小写字母表示不同样品间的显著性差异 ( $P<0.05$ )

BAC200-basic medium+functional flora/strain+RB5 (200 mg/L); FRU200-fructose medium+functional flora/strain+RB5 (200 mg/L). Data were shown as mean±SE of 3 replicates. Different lowercase letters in the same row indicated significant differences among disparate samples ( $P<0.05$ ).

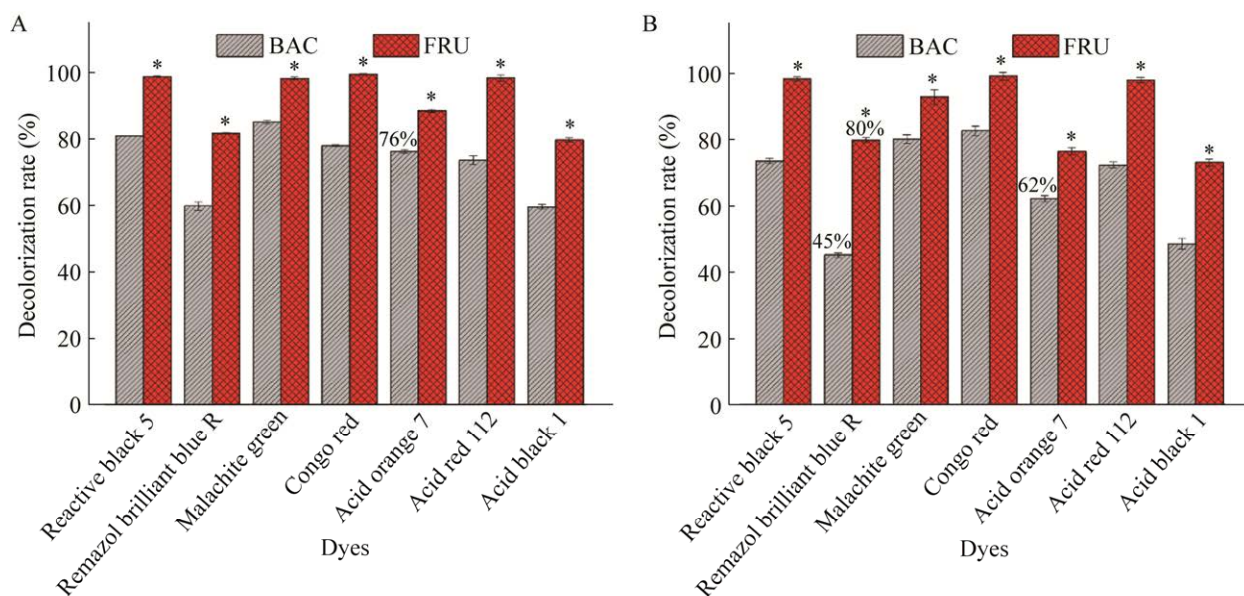


图 6 功能菌群 DDMZ1 (A)和功能菌株 *Burkholderia sp.* DDMZ1-1 (B)对不同染料的广谱脱色性能 BAC-基础培养基+功能菌群/菌株+染料(200 mg/L); FRU-果糖培养基+功能菌群/菌株+染料(200 mg/L)  
Figure 6 Broad-spectrum decolorization of different dyes by the flora DDMZ1 (A) and *Burkholderia sp.* DDMZ1-1 (B). BAC-basic medium+functional flora/strain+dye (200 mg/L); FRU-fructose medium+functional flora/strain+dye (200 mg/L). \*:  $P < 0.05$ .

对酸性橙 7 的脱色率仅为 62%。因此, 功能菌群 DDMZ1 在处理含有此类染料的废水方面具有更高的广谱适用性。当在生物降解体系中添加果糖作为共基质后, 功能菌群/菌株对不同结构染料的脱色效果相较于 BAC 组(不含果糖)均显著提升( $P < 0.05$ )。特别是功能菌株对活性艳蓝的脱色率在样品 FRU 中达到 80%左右, 比样品 BAC 的脱色率提升了近 35%。这些结果表明, 果糖作为共基质可以显著促进对含染料废水的生物处理效率, 且功能菌群 DDMZ1 相较于功能菌株 *Burkholderia sp.* DDMZ1-1 具有更强的染料广谱脱色性能。

### 3 结论

本文以对偶氮染料 RB5 具有高效降解脱色性能的天然功能菌群 DDMZ1 和功能菌株 *Burkholderia sp.* DDMZ1-1 为研究对象, 探究

并比较果糖共代谢强化功能菌群/菌株降解脱色 RB5 的效能及差异机制。

(1) 功能菌群 DDMZ1 在较宽的 pH 值 (3.5–10.0)、温度 (25–40 °C) 和盐浓度 (0%–5%) 培养范围内对 RB5 的去除效率均高于功能菌株 *Burkholderia sp.* DDMZ1-1。

(2) 在优化条件下 (pH 5.5, 37 °C), 果糖作为共基质能够显著提升功能菌群/菌株对不同初始浓度 RB5 的脱色性能, 特别是针对 200 mg/L RB5 的去除效率分别高达 98% 和 97%。

(3) 果糖的添加能显著刺激功能菌群/菌株分泌胞外偶氮还原酶进而增强其活性, 且 RB5 在功能菌群 DDMZ1 果糖共代谢体系中被生物降解成更多分子量低、结构简单的代谢产物。

(4) 功能菌群/菌株体系中 RB5 降解产物的植物毒性在添加果糖的样品 FRU200 中显著降低, 且功能菌群 DDMZ1 对不同结构类型染料

具有更强的广谱脱色性能。

本研究揭示功能菌群/菌株利用果糖共代谢降解脱色 RB5 的效能差异情况及其微生物学作用机制, 为共基质强化和有效调控含偶氮染料废水生物处理提供理论依据。

## REFERENCES

- [1] IMRAN M, ARSHAD M, NEGM F, KHALID A, SHAHARONA B, HUSSAIN S, MAHMOOD NADEEM S, CROWLEY DE. Yeast extract promotes decolorization of azo dyes by stimulating azoreductase activity in *Shewanella* sp. strain IFN<sub>4</sub>[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2016, 124: 42-49.
- [2] ZENG Q, WANG Y, ZAN FX, KHANAL SK, HAO TW. Biogenic sulfide for azo dye decolorization from textile dyeing wastewater[J]. *Chemosphere*, 2021, 283: 131158.
- [3] 刘娜, 郑秀林, 谢学辉, 孙朋, 王丽, 苏海民. 氧气对混合菌群脱色降解偶氮染料效果的影响[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(8): 2359-2371.
- LIU N, ZHENG XL, XIE XH, SUN P, WANG L, SU HM. Effect of oxygen on decolorization and degradation of azo dyes by mixed flora[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(8): 2359-2371 (in Chinese).
- [4] NEETHA JN, SANDESH K, GIRISH KK, CHIDANANDA B, UJWAL P. Optimization of Direct Blue-14 dye degradation by *Bacillus fermus* (Kx898362) an alkaliphilic plant endophyte and assessment of degraded metabolite toxicity[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2019, 364: 742-751.
- [5] HE XL, SONG C, LI YY, WANG N, XU L, HAN X, WEI DS. Efficient degradation of azo dyes by a newly isolated fungus *Trichoderma tomentosum* under non-sterile conditions[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 150: 232-239.
- [6] 李锋, 梁念, 孙建中. 一株新型苯胺蓝降解菌 MP-13 的代谢特征[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(1): 43-53.
- LI F, LIANG N, SUN JZ. Degradation characteristics of a novel aniline blue-discoloring bacterial strain MP-13[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(1): 43-53 (in Chinese).
- [7] ESKANDARI F, SHAHNAVAZ B, MASHREGHI M. Optimization of complete RB-5 azo dye decolorization using novel cold-adapted and mesophilic bacterial consortia[J]. *Journal of Environmental Management*, 2019, 241: 91-98.
- [8] YU L, CAO MY, WANG PT, WANG S, YUE YR, YUAN WD, QIAO WC, WANG F, SONG X. Simultaneous decolorization and biohydrogen production from xylose by *Klebsiella oxytoca* GS-4-08 in the presence of azo dyes with sulfonate and carboxyl groups[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(10): e00508-e00517.
- [9] CHEN GT, AN XJ, LI HG, LAI FJ, YUAN E, XIA X, ZHANG QH. Detoxification of azo dye direct black G by thermophilic *Anoxybacillus* sp. PDR2 and its application potential in bioremediation[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 214: 112084.
- [10] MAHMOOD F, SHAHID M, HUSSAIN S, SHAHZAD T, TAHIR M, IJAZ M, HUSSAIN A, MAHMOOD K, IMRAN M, BABAR SAK. Potential plant growth-promoting strain *Bacillus* sp. SR-2-1/1 decolorized azo dyes through NADH-ubiquinone: oxidoreductase activity[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 235: 176-184.
- [11] 张庆华, 陈国涛, 冯琳琳, 陈燕, 夏祥, 王园秀. 混合菌群对偶氮染料的脱色降解研究进展[J]. *应用与环境生物学报*, 2020, 26(2): 469-478.
- ZHANG QH, CHEN GT, FENG LL, CHEN Y, XIA X, WANG YX. Research progress on microbial decolorization and degradation of azo dyes[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2020, 26(2): 469-478 (in Chinese).
- [12] 郭光, 田芳, 刘妍, 刘廷凤, 丁克强, 刘翀. 中度嗜盐菌群对酸性大红 GR 的脱色性能研究[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(11): 2567-2574.
- GUO G, TIAN F, LIU Y, LIU TF, DING KQ, LIU C. Decoloring acid scarlet GR by a moderately halophilic bacterial consortium[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(11): 2567-2574 (in Chinese).
- [13] CHEN Y, FENG LL, LI HG, WANG YX, CHEN GT, ZHANG QH. Biodegradation and detoxification of direct black G textile dye by a newly isolated thermophilic microflora[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 250: 650-657.
- [14] BERA SP, TANK SK. Screening and identification of newly isolated *Pseudomonas* sp. for biodegrading the textile azo dye C.I. Procion Red H-3B[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2021, 130(6): 1949-1959.
- [15] ZHANG QY, XIE XH, LIU YB, ZHENG XL, WANG YQ, CONG JH, YU CZ, LIU N, HE ZJ, LIU JS, SAND W. Sugar sources as co-substrates promoting the degradation of refractory dye: a comparative study[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 184: 109613.

- [16] ZHANG QY, XIE XH, LIU YB, ZHENG XL, WANG YQ, CONG JH, YU CZ, LIU N, SAND W, LIU JS. Co-metabolic degradation of refractory dye: a metagenomic and metaproteomic study[J]. *Environmental Pollution*, 2020, 256: 113456.
- [17] 程俊茗, 万明月, 周晋扬, 贾丹, 胡鲲. 鲫源迟缓爱德华氏菌的分离鉴定及其毒力基因的检测[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(10): 2380-2390.
- CHENG JM, WAN MY, ZHOU JY, JIA D, HU K. Identification and virulence genes detection of *Edwardsiella tarda* isolated from *Carassius auratus gibelio*[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(10): 2380-2390 (in Chinese).
- [18] QIU LJ, WANG L, TAN L, LI M, WU CQ, LI L, ZHANG Z, JIANG HC, SUN QM, ZHANG TS. Molecular characterization of genomic DNA in *Mycoplasma pneumoniae* strains isolated from serious *Mycoplasma pneumoniae* cases in 2016, Yunnan, China[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2018, 58: 125-134.
- [19] PATHIRAJA G, EGODAWATTA P, GOONETILLEKE A, TE'O VSJ. Solubilization and degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) by naturally occurring facultative anaerobic bacteria[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 651(Pt 2): 2197-2207.
- [20] 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.
- [21] HADIBARATA T, SYAFI UDDIN A, AL-DHABAAN FA, ELSHIKH MS, RUBIYATNO. Biodegradation of mordant orange-1 using newly isolated strain *Trichoderma harzianum* RY44 and its metabolite appraisal[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2018, 41(5): 621-632.
- [22] HUANG JX, LING JY, KUANG CZ, CHEN JL, XU YB, LI YX. Microbial biodegradation of aniline at low concentrations by *Pigmentiphaga daeguensis* isolated from textile dyeing sludge[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2018, 129: 117-122.
- [23] ZHANG QY, XIE XH, LIU YB, ZHENG XL, WANG YQ, CONG JH, YU CZ, LIU N, LIU JS, SAND W. Fructose as an additional co-metabolite promotes refractory dye degradation: performance and mechanism[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 280: 430-440.
- [24] DAMMAK I, BEN ATITALLAH I, LOUATI I, HADRICH B, MECHICHI T. Optimization of reactive black 5 decolorization by the newly isolated *Saccharomyces cerevisiae* X19G2 using response-surface methodology[J]. *3 Biotech*, 2022, 12(6): 142.
- [25] AJAZ M, ELAHI A, REHMAN A. Degradation of azo dye by bacterium, *Alishewanella* sp. CBL-2 isolated from industrial effluent and its potential use in decontamination of wastewater[J]. *Journal of Water Reuse and Desalination*, 2018, 8(4): 507-515.
- [26] ADNAN LA, SATHISHKUMAR P, MOHD YUSOFF AR, HADIBARATA T. Metabolites characterisation of laccase mediated reactive black 5 biodegradation by fast growing ascomycete fungus *Trichoderma atroviride* F<sub>03</sub>[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2015, 104: 274-282.
- [27] SAMIEE S, GOHARSHADI EK, NANCARROW P. Successful degradation of reactive black 5 by engineered Fe/Pd nanoparticles: mechanism and kinetics aspects[J]. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2016, 67: 406-417.
- [28] 杨厚云. 生物电化学系统强化偶氮染料去除和二氧化碳转化的研究[D]. 合肥: 中国科学技术大学博士学位论文, 2018.
- YANG HY. Enhancement of azo dyes decolorization and CO<sub>2</sub> conversion in bioelectrochemical systems[D]. Hefei: Doctoral Dissertation of University of Science and Technology of China, 2018 (in Chinese).
- [29] BONUGLI-SANTOS RC, VIEIRA GAL, COLLINS C, FERNANDES TCC, MARIN-MORALES MA, MURRAY P, SETTE LD. Enhanced textile dye decolorization by marine-derived basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063 using integrated statistical design[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(9): 8659-8668.
- [30] ZHENG XL, XIE XH, LIU YB, CONG JH, FAN J, FANG YR, LIU N, HE ZJ, LIU JS. 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.
- [31] KHAN Z, JAIN K, SONI A, MADAMWAR D. Microaerophilic degradation of sulphonated azo dye-reactive red 195 by bacterial consortium AR1 through co-metabolism[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2014, 94: 167-175.