

陈国涛, 万超超, 安雪姣, 冯琳琳, 夏祥, 张庆华. 嗜热复合菌群对偶氮染料的脱色特性及其脱毒[J]. 应用与环境生物学报, 2020, 26 (4): 800-808
Chen GT, Wan CC, An XJ, Feng LL, Xia X, Zhang QH. Decolorization and detoxification of the azo dyes by thermophilic microflora [J]. Chin J Appl Environ Biol, 2020, 26 (4): 800-808

嗜热复合菌群对偶氮染料的脱色特性及其脱毒

陈国涛 万超超 安雪姣 冯琳琳 夏祥 张庆华✉

江西农业大学生物科学与工程学院, 江西省农业微生物资源开发与利用工程实验室 南昌 330045

摘要 偶氮染料所造成的环境污染问题已成为近年来亟待解决的问题。以前期构建的嗜热偶氮染料降解复合菌群为研究对象, 探究其在不同初始pH、培养温度、染料浓度及不同结构偶氮染料的脱色特性, 并对不同浓度下染料的降解进行动力学分析; 通过紫外-可见光扫描、红外光谱扫描及酶活性变化等分析偶氮染料的生物降解情况。此外, 还将通过植物毒理性实验来验证偶氮染料降解后的脱毒情况。研究发现, 该复合菌群在初始pH为8、温度为55℃的条件下脱色效果最佳, 在含400 mg/L直接黑G的脱色培养基中静置培养48 h后, 脱色率高达100%; 且对直接黑G具有较高的耐受能力, 在3 000 mg/L的条件下脱色率仍高达70%; 对不同结构的偶氮染料均表现出较好的脱色性能; 动力学分析发现其最佳脱色速率与浓度分别为40.597 3 mg g⁻¹ h⁻¹、484.337 6 mg/L。通过紫外-可见光扫描及红外光谱扫描分析发现偶氮染料直接黑G在降解前后化学键及表面官能团发生了明显的变化; 酶活性分析发现偶氮染料降解酶在降解后显著提高。此外, 植物毒理性实验证明经复合菌群降解后的染料代谢产物对植物的毒性大幅度降低, 可能被降解为其他低毒性物质。本研究结果表明该复合菌群具有较好的染料脱色降解性能, 这将为偶氮染料的无污染化处理奠定理论基础。(图6 表4 参43)

关键词 嗜热复合菌群; 偶氮染料; 脱色特性; 脱毒效果

Decolorization and detoxification of the azo dyes by thermophilic microflora

CHEN Guotao, WAN Chaochao, An Xuejiao, FENG Linlin, XIA Xiang & ZHANG Qinghua✉

Jiangxi Engineering Laboratory for the Development and Utilization of Agricultural Microbial Resources, College of Bioscience and Biotechnology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China

Abstract Recently, the environmental pollution caused by azo dyes has become an urgent problem. Based on our previous study regarding the degradation of constructed azo dyes by thermophilic microflora, the decolorization characteristics of the azo dyes under different initial pH, temperature, dye concentration, and structures were explored by kinetic analyses. Specifically, the biodegradation of azo dyes were analyzed using a scanning ultraviolet-visible spectrophotometer, an infrared spectral scanner, and enzyme activity changes. In addition, the detoxification of the azo dye was verified by plant toxicity experiments. We found that the optimal decolorization and degradation conditions of the thermophilic microflora were at an initial pH of 8, a temperature of 55℃, and a decolorization rate of 400 mg/L, in which the Direct Black G dye reached 100% after 48 h. Furthermore, the thermophilic microflora had a high tolerance to Direct Black G, despite the decolorization rate reaching 70% at a Direct Black G concentration of 3 000 mg/L. In addition, the thermophilic microflora showed a better decolorization performance when using different structures of the azo dyes. Furthermore, the kinetic analysis revealed that the optimal decolorization rate and concentration were 40.597 3 mg g⁻¹ h⁻¹ and 484.337 6 mg/L, respectively. Through the scanning ultraviolet-visible spectrophotometer and the infrared spectral scanning analysis, the chemical bonds and the surface functional group of the azo dyes were shown to have changed significantly before and after degradation, while the enzyme activity analysis showed that the azo dye-degrading enzyme significantly increased after degradation. Finally, the plant toxicity experiment proved that the toxicity of azo dye metabolites was greatly reduced in plants after being degraded by the thermophilic microflora, which may be due to their transformation into other low-toxic substances. Hence, this work demonstrated that this microflora improved the decolorization and degradation performance of the dye, which can act as a theoretical foundation for the non-polluting treatment of azo dyes.

Keywords thermophilic microflora; azo dyes; decolorization characteristics; detoxification effect

收稿日期 Received: 2019-10-29 接受日期 Accepted: 2019-12-19

国家自然科学基金项目(31860025, 31660024)、江西省杰出青年人才资助计划项目(20171BCB23044)和江西省自然科学基金项目(20151BAB204001)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (31860025 and 31660024), the Outstanding Youth Talent Funding Program of Jiangxi Province, China (20171BCB23044) and the Natural Science Foundation of Jiangxi Province (20151BAB204001)

✉通讯作者 Corresponding author (E-mail: zqh_net@163.com)

随着印染技术和工业的发展,大量不同种类的合成染料被广泛应用于各行各业的生产之中,在种类繁多的染料中以偶氮染料使用最多,占我国染料总量的80%^[1]。偶氮染料是分子结构中具有一个或多个偶氮基(—N=N—)的芳香类化合物,这类染料具有生产过程简单、成本低廉、易于合成、性质稳定与染色性能突出等优点,被广泛应用于印染、纺织、化妆品、食品和制药等行业中^[2]。偶氮染料具有抗酸、抗碱、抗光、抗微生物等特性,在环境中长时间不能被降解,是毒性大且难降解有机化合物之一。偶氮染料会导致水体生态系统的破坏,影响水体的功能,同时也会对水中的微生物和鱼类产生毒害作用。此外,偶氮染料还具有致癌、致畸、致突变“三致”作用,任意排放到环境中会对人类的健康造成严重的威胁^[3-4]。因此,如何高效处理偶氮染料废水是目前众多学者关注的焦点,且具有重大的研究意义。

目前,国内外处理偶氮染料废水的方法主要有物理法、化学法和生物法三大类^[5]。物理法主要包括膜分离技术、吸附法、沉淀法、萃取分离法及磁分离法等;化学法主要包括化学混凝法、化学氧化法、电化学法等。由于物理和化学方法具有运行成本高、能耗大、适应性低、效率低、降解不彻底、存在二次污染及产生大量难以处理的污泥等诸多缺点,从而限制了其广泛的应用^[6]。而生物法是利用微生物降解偶氮染料,实现对偶氮染料废水的治理,且具有成本低廉、净化彻底、环保无污染、操作简单等优点,因此生物法处理偶氮染料废水具有良好的应用前景^[7]。近年来国内外众多学者已经筛选出许多偶氮染料脱色降解的微生物,主要包括细菌、真菌及藻类^[8]。真菌脱色主要分两种,吸附脱色和降解脱色,大多数真菌都是通过菌体吸附染料进行脱色,仅有白腐真菌脱色机制是降解脱色^[9];藻类对偶氮染料的脱色降解机理主要是对染料的吸附,但当微生物进入衰亡期后,微生物菌体会发生自溶现象,从而将吸附的染料释放出来^[10];而细菌主要通过分泌多种酶来破坏其偶氮结构,从而实现其脱色降解,且细菌具有适应环境能力强、繁殖速度快等优点而被广泛应用^[11]。

对于偶氮染料废水的处理,单一菌株因种类有限、适应范围较窄、广谱性较差,脱色率往往较低,且单一菌株一般只能将发色基团打开,不能进一步将中间代谢产物进一步降解,导致处理效果不理想^[12]。例如胡景华等在纺织工业废水中筛选出的单一菌株培养48 h后对直接黑38(400 mg/L)的脱色率仅为60%左右^[12]。相比于单一菌株而言,复合菌群能够通过多种微生物之间的协同作用实现偶氮染料的最大程度的降解与矿化。杨财容等在活性污泥中筛选出了6株活性黑脱色菌,研究发现该复合菌群较单一菌株具有较强的脱色能力,最高脱色率达95.68%^[7];范凤霞等构建的混合菌群FF具有较强的脱色能力,培养24 h后对浓度为200 mg/L的活性黑5染料的脱色率高达94.8%^[3]。因此,构建复合菌群来处理偶氮染料废水具有较好的应用前景^[13]。

为此,我们以前期构建的嗜热复合菌群为研究对象,探究其对偶氮染料的脱色降解特性,并通过紫外-可见光扫描、傅里叶红外光谱扫描及酶活性分析偶氮染料的生物降解情况,此外,还将通过植物毒性实验来验证偶氮染料降解后的脱毒情况,以期偶氮染料的无污染化处理提供相应的理论基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种来源 本研究采用前期构建的嗜热偶氮染料降解复合菌群,该复合菌群于55 ℃静置培养48 h后可完全脱色400 mg/L的直接黑G染料,具有较强的脱色性能;且该复合菌群经PCR-DGGE分析鉴定后,发现其包含的主要菌种有*Anoxybacillus flavithermus* strain 52-1A、*Bacillus thermoamylovorans* strain DKP、*Brevibacillus aydinogluensis* strain PDF25、*Geobacillus thermoleovorans* strain NP1、*Tepidiphilus thermophilus* strain JHK30等^[14]。

1.1.2 偶氮染料 偶氮染料甲基橙(C₁₄H₁₄N₃NaO₃S₃、327.33)、苋菜红(C₂₀H₁₁N₂Na₃O₁₀S₃、604.47)、刚果红(C₃₂H₂₂N₆Na₂O₆S₂、696.68)、直接黑38(C₃₄H₂₅N₉Na₂O₇S₂、781.73)、直接黑G(C₃₄H₂₇N₁₃Na₂O₇、839.77)均购买于山东西亚化学股份有限公司。其分子结构、最大吸收峰与偶氮键数目见表1。

1.1.3 脱色培养基 蛋白胨2.0 g、葡萄糖5.0 g、牛肉膏3.0 g、MgSO₄ 0.2 g、KH₂PO₄ 1.8 g、NaH₂PO₄ 3.5 g、FeCl₃ 0.01 g、MnSO₄ 0.02 g, pH 7.2。

1.1.4 仪器设备 UV-9000紫外分光光度计:上海元析仪器有限公司;精密恒温培养箱:上海-恒科学仪器有限公司;傅里叶红外光谱仪:珀金埃尔默仪器有限公司;PHS-3C型pH计:上海雷磁仪器厂;电子天平:塞多利斯公司;高速离心机:上海菲恰尔分析仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 不同因素对偶氮染料脱色的影响 将活化的菌液按10% (V/V)的接种量接种至脱色培养基(直接黑G 600 mg/L)中,在其他条件保持一致的情况下探究pH(4、5、6、7、8、9、10)、温度(35、45、55、65、75 ℃)、不同染料浓度(400、600、800、1 000、1500、3 000 mg/L)以及不同结构的偶氮染料(甲基橙、苋菜红、刚果红、直接黑38、直接黑G)对该复合菌群脱色的影响,设置3个重复,测定不同培养时间降解液的脱色率。

1.2.2 不同初始浓度直接黑G的脱色动力学 将活化的菌液按10% (V/V)的接种量接种至脱色培养基中,在其他条件保持一致的情况下探究优化条件下染料初始浓度对脱色速率的影响,浓度范围为100-1 500 mg/L,间隔2 h取样分析。

1.2.3 脱色率的测定 取不同培养时间的降解液(4 h、8 h、12 h、24 h、36 h、48 h)于10 000 r/min下离心15 min,取其上清,在染料的最大吸收波长处测定其吸光值B,以未接种的染料培养基的吸光值A作为对照,并计算其脱色率。脱色率的计算公式如下所示:

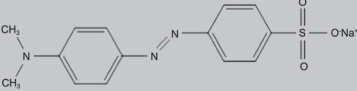
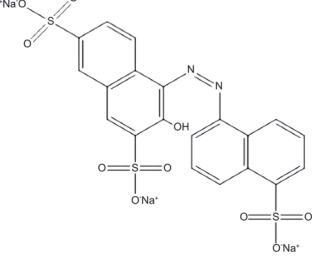
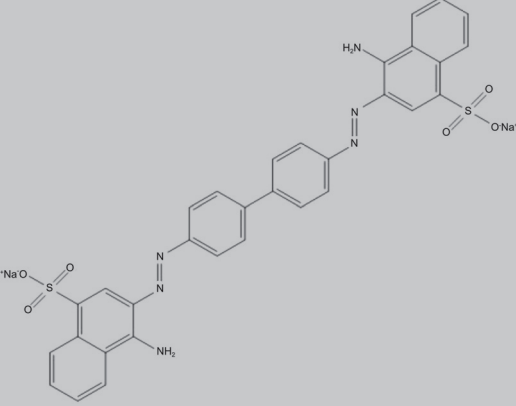
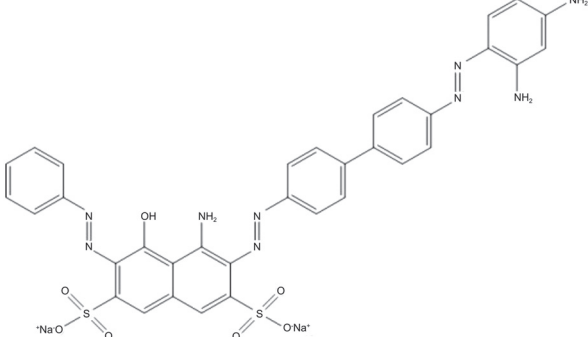
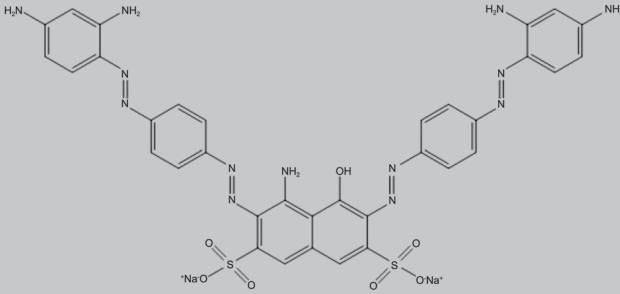
$$\text{脱色率} = (A-B)/A \times 100\% \quad (1)$$

1.2.4 不同培养时间降解液的紫外-可见光谱扫描 将活化好的复合菌群按10% (V/V)的接种量接入至脱色培养基中(直接黑G 600 mg/L),于初始pH 7.2、温度为55 ℃的条件下静置培养。分别取培养0 h、6 h、24 h、48 h后的降解液于10 000 r/min下离心15 min,取其上清,并利用紫外-可见分光光度计进行全波长扫描,扫描范围为200-900 nm。

1.2.5 染料脱色前后的红外光谱扫描 将活化好的复合菌群按10% (V/V)的接种量接入至脱色培养基中(直接黑G 600 mg/L),于初始pH 7.2、温度为55 ℃的条件下静置培养。取培养48 h后的降解液于10 000 r/min离心15 min,取其上清,

表1 偶氮染料的分子结构、最大吸收峰与偶氮键数目

Table 1 Molecular structure and maximum absorption peak of azo dyes

偶氮染料 Azo dye	分子结构 Structure of molecular	吸收峰 Absorption peak (λ/nm)	偶氮键 Azo bond
甲基橙 Methyl orange		465	1
苋菜红 Amaranth		520	1
刚果红 Congo red		493	2
直接黑38 Direct Black 38		590	3
直接黑G Direct Black G		645	4

并加入等体积的色谱级乙酸乙酯进行萃取分离，分离后的萃取液用旋转蒸发仪在45℃下浓缩得到干燥物。随后干燥物中加入少量乙酸乙酯溶解，同时加入烘干的无水硫酸钠进行脱水，然后通过0.22 μm的有机微孔滤膜过滤并烘干得到待测样品。将样品与溴化钾（光谱纯）按1:100的混合并研磨成粉末，压片后利用傅里叶红外光谱仪对直接黑G和降解后产物进行扫描。扫描波数范围为500-4 000 cm⁻¹，扫描分辨率为4个波

数，共计扫描32次。

1.2.6 直接黑G降解酶测定 将活化好的复合菌群按10%（V/V）的接种量接入至脱色培养基中（直接黑G 600 mg/L），于初始pH 7.2、温度为55℃的条件下静置培养。取培养24 h后的降解液于10 000 r/min离心15 min，上清液作为胞外酶的来源，菌体细胞则悬浮于100 mmol/L、pH 7.2的磷酸盐缓冲液中，然后进行超声波破碎处理，将超声波发生器保持为

50 A的输出, 每20 s 10次, 间隔10 s, 在4 ℃下破碎15 min, 并于10 000 r/min离心15 min, 其上清液作为胞内酶的来源, 测定偶氮还原酶^[15-16]、漆酶^[17]、木质素过氧化物酶^[18-19]以及锰过氧化物酶酶活^[20]。

1.2.7 直接黑G降解前后的植物毒理性测定 将活化好的复合菌群按10% (V/V) 的接种量接种至脱色培养基中 (直接黑G 600 mg/L), 在初始pH 7.2、温度为55 ℃的条件下静置培养。取不同培养时间 (0、12、24、36、48 h) 的降解液于10 000 r/min离心15 min, 取其上清并用0.22 μm的微孔滤膜过滤后备用。同时以未接菌的脱色培养基 (直接黑G 600 mg/L) 作为对照, 以灭菌的蒸馏水作为空白对照。选取绿豆种子为材料进行直接黑G降解产物的植物毒理性测定。实验具体步骤为: 挑选成熟饱满、无霉变、种皮完好无损、大小相当、有生命力的绿豆种子, 采用2%的双氧水对其消毒10 min, 蒸馏水冲洗数次后并用温水浸泡30 min, 然后分别在每个发芽盒中放入20颗绿豆种子并浇入10 mL相应的染料降解液、染料培养基及灭菌的蒸馏水。种子将置于28 ℃的光照培养箱中培养, 7 d后分别观测绿豆种子的发芽率、根长及茎长等参数, 验证该复合菌群对偶氮染料直接黑G的降解脱毒效果。

2 结果与讨论

2.1 不同培养条件对菌株脱色的影响

pH在偶氮染料降解过程中负责染料分子在细胞膜上的转运, 同时还可以通过细胞膜的通透性影响微生物对营养物质的吸收与利用, 故pH值是染料脱色过程中的主要参数之一^[21]。不同pH值对复合菌群脱色的影响如图1(A)所示, 复合菌群可在较广的pH范围内对染料进行脱色。初始pH值为4-8时, 复合菌群对染料的脱色能力逐渐增强, 其中当pH为8时脱色效果最佳, 培养8 h和48 h后脱色率分别达到了86%与97%。然而

进一步提高至pH值为10时, 该复合菌群的对染料的脱色效果明显减弱。上述结果表明该复合菌群能够在pH 8的环境里较好的生存, 各种相关脱色降解酶的酶活力处于较高水平; 而其他的过酸或过碱的环境可能是引起了微生物细胞表面的特性与酶构象的改变, 进而导致微生物的生长与代谢能力受阻^[22]。有研究表明, 印染厂排放的偶氮染料废水的pH值一般在8-9之间^[23], 因此该复合菌群对处理偶氮染料废水具有良好的匹配性。

温度是微生物生长与代谢过程中的一个重要参数, 其通过影响酶活力的大小来影响微生物对偶氮染料的脱色^[24]。不同温度对该复合菌群脱色的影响如图1(B)所示, 温度为35-55 ℃时, 该复合菌群的脱色能力逐渐增强。当温度为55 ℃时, 其脱色效果最好, 培养48 h后脱色率高达98%; 进一步提高温度, 其脱色率明显下降。结果表明该复合菌群具有一定的嗜热性, 该温度下复合菌群代谢能力旺盛, 酶活力较高, 故脱色能力较强; 由于偶氮染料废水主要产生在温度高达50-60 ℃的染浴与漂洗阶段^[25], 因此该复合菌群对于处理偶氮染料废水具有一定的匹配性与应用潜力。此外, 嗜热复合菌群在高温条件下具有代谢速度快、处理效率高及能够有效杀死病原微生物等优点, 且嗜热复合菌群分泌的一些嗜热酶具有较高的稳定性, 室温中可长期保持活性, 能够抵抗化学变性^[26], 在降解偶氮染料中展现了良好的开发与应用潜力。

研究表明, 染料的毒性与其浓度成正比, 浓度越高, 其毒性也就越大; 同时高浓度的染料也会产生更多的芳香族化合物中间体, 一定程度上会抑制微生物的正常生长与代谢^[27]。不同初始染料浓度对该复合菌群脱色的影响如图1(C)所示, 该复合菌群可在较广的浓度范围内进行脱色, 其中当染料浓度为400 mg/L时, 其脱色率在48 h可高达100%, 进一步提高染料浓度, 该复合菌群的脱色能力逐渐减弱。结果表明, 高浓度的

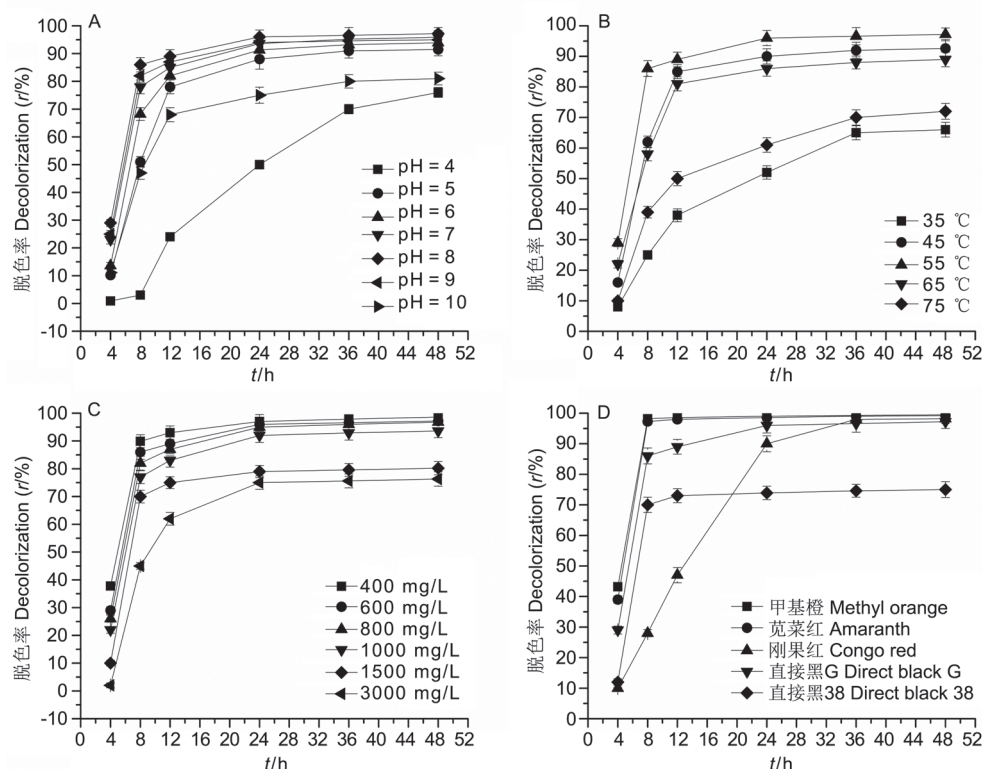


图1 不同培养条件对菌株脱色的影响。

Fig. 1 Effect of different culture conditions on the decolorization of strains.

染料具有较高的毒性,对微生物的生长与代谢具有一定的抑制作用。但总体而言,该复合菌群对高浓度的染料具有一定的耐受能力,当浓度为3 000 mg/L时,该复合菌群依然能够正常生长且脱色率高达70%。因此,该复合菌群具有较强的脱色能力,且对于处理高浓度的偶氮染料废水具有极大的应用前景。

研究表明,偶氮染料的脱色与偶氮双键的数目、染料分子的结构特征及芳香环上的取代基数目与种类有关^[28]。该复合菌群对不同结构偶氮染料的脱色影响如图1(D)所示,在这几种染料中,甲基橙、苋菜红、直接黑G与直接黑38在培养8 h后脱色率达到70%-98%,而在相同时间内刚果红的脱色率仅为28%。而培养48 h后,甲基橙、苋菜红、刚果红与直接黑G的脱色率均达到了99%左右,但直接黑38的脱色率仅为70%。甲基橙、苋菜红与刚果红脱色效果较好的原因可能是其分子量小,分子结构相对简单且含有的偶氮键数目较少^[29]。而直接黑G脱色效果好的原因可能是其分子结构中含有多个氨基,而氨基是促进偶氮双键的断裂的基团^[30]。对于直接黑38而言,可能是由于其本身的分子结构不同的原因,偶氮双键不易被还原,导致其脱色效果受到一定的影响^[31]。由于常见的偶氮染料废水为多种不同的染料的混合物,因此,该复合菌群充分展现了优异的降解性能与底物降解广谱性,具有极大的工业化应用潜质。

2.2 不同初始浓度直接黑G的脱色动力学

为了更深入地探究染料初始浓度对脱色效率的影响,选取浓度范围为200-3 000 mg/L的直接黑G进行分析,其结果如图2所示。随后对复合菌群脱色降解后剩余染料浓度的ln值和培养时间进行拟合,结果如表2所示,由表可知,剩余染料浓度的ln值和培养时间符合线性关系,故该复合菌群对偶氮染料直接黑G的脱色降解符合一级反应动力学;研究发现随着染料浓度的提高,降解反应速率常数也随之逐渐降低,由此说明高浓度的偶氮染料对该复合菌群的脱色降解具有一定的抑制作用,因此可利用底物抑制模型Haldane方程来描述该复合菌群的脱色降解的动力学方程^[32]:

$$R = \frac{R_{\max} \cdot \rho}{\rho + \rho^2/K_i + K_s} \quad (2)$$

式中, R 是指脱色速率($\text{mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$), ρ 是指染料初始浓度(mg/L), $R_{\max}$ 是指染料的最大脱色速率($\text{mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$), K_i 是抑制常数(mg/L), K_s 是指底物饱和常数(mg/L)。

对不同染料浓度下初始阶段脱色速率的实验值与理论值进行拟合,结果如图3所示,相关系数 $r = 0.9876$,拟合效果较好,由此说明该动力学方程可较好地描述脱色速率与染料浓度的变化及染料浓度对脱色具有一定的抑制作用。由图3可知,随着染料浓度的不断升高,其脱色速率也会随之增大,达到某一个最高值即存在一个最佳脱色速率 R_{opt} 与浓度 ρ_{opt} 。经计算,抑制常数 $K_i = 173.7765 \text{ mg/L}$,底物饱和常数 $K_s = 1349.9116 \text{ mg/L}$,最大脱色速率 $R_{\max} = 266.8948 \text{ mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$,并带入公式(3)与(4)进行计算最佳脱色速率与染料浓度^[33]。

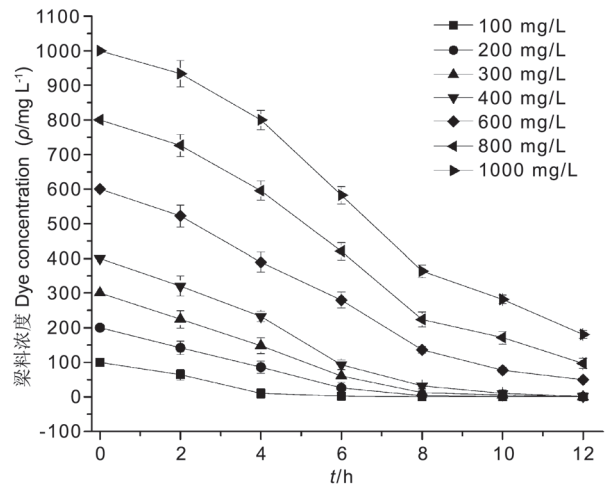


图2 不同初始染料浓度下复合菌系的脱色效率。

Fig. 2 Decolorization of microflora with different initial dye concentrations.

$$R_{\text{opt}} = 1 + 2 \sqrt{\frac{K_s}{K_i}} \quad (3)$$

$$\rho_{\text{opt}} = \sqrt{K_i K_s} \quad (4)$$

经计算,最佳脱色速率 $R_{\text{opt}} = 40.5973 \text{ mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$,最佳浓度 $\rho_{\text{opt}} = 484.3376 \text{ mg/L}$,该结果与图3拟合的结果相一致,由此说明该动力学模型的适用性,且该结果与孔春雷等人对酸性红GR的脱色动力学研究^[34]相一致。

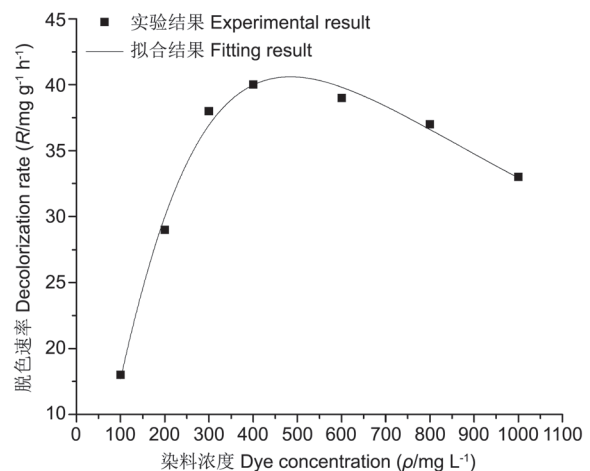


图3 复合菌群脱色模型动力学方程拟合曲线。

Fig. 3 Fitted curve of kinetics equation of decolorization model by microflora.

2.3 紫外-可见光谱扫描分析

偶氮染料在降解前后的紫外-可见光谱扫描图谱如图3所示,该图谱表明了偶氮染料在降解前后特征吸收峰的变化。如图4A所示,直接黑G的特征吸收峰是645 nm,嗜热复合菌群降解染料6 h后,在645 nm处直接黑G的特征吸收峰减小,

表2 复合菌群对偶氮染料脱色降解反应的动力学方程及参数

Table 2 Parameter and equation of kinetics of decolorization of azo dye by microflora

染料浓度 Dye concentration ($\rho/\text{mg L}^{-1}$)	动力学方程 Kinetic equation	反应速率常数 Reaction rate constant	r^2
100	$y = -0.6586x + 4.8103$	0.6586	0.9835
200	$y = -0.5418x + 5.9441$	0.5418	0.9343
300	$y = -0.5198x + 6.4949$	0.5198	0.9213
400	$y = -0.4676x + 6.7865$	0.4676	0.9151
600	$y = -0.2198x + 6.6643$	0.2198	0.9619
800	$y = -0.1819x + 6.9223$	0.1819	0.9557
1000	$y = -0.1485x + 7.1098$	0.1485	0.9574

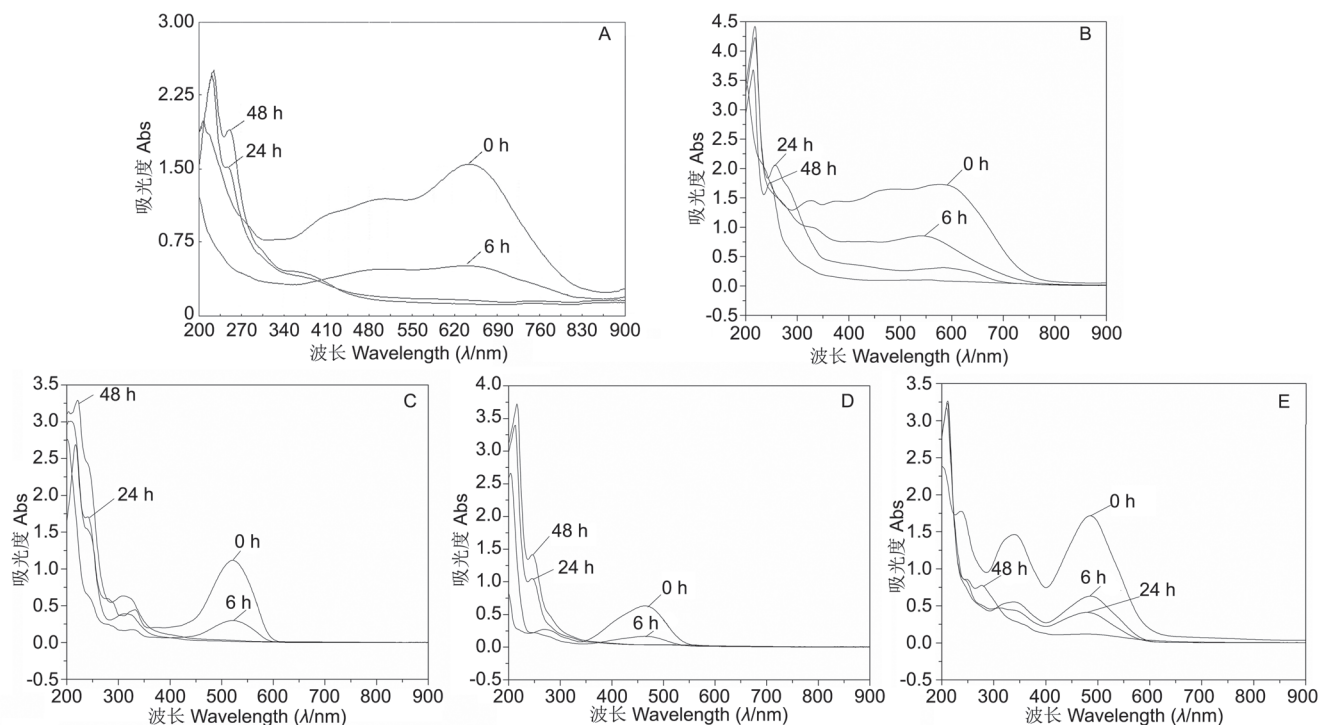


图4 染料降解前后的紫外-可见光谱。A: 直接黑G; B: 直接黑38; C: 苋菜红; D: 甲基橙; E: 刚果红。

Fig. 4 UV-visible spectra before and after dye degradation. A: Direct Black G; B: Direct Black 38; C: Amaranth; D: Methyl orange; E: Congo red.

且发生了小幅度的特征吸收峰紫移现象,原因可能是发色基团—N=N—以及助色基团—NH₃、—OH的脱落,从而导致偶氮染料生色基团的电子云密度下降^[35];降解24 h与48 h后,在645 nm处的特征吸收峰几乎消失,可能是生色团和共轭体系被破坏导致的;而在210和252 nm处却出现新的特征吸收峰,210和252 nm处的特征吸收峰可能是苯环类结构产生的,且脱色48 h后特征吸收峰增高,表明染料没有被完全矿化,而是生成了新的小分子中间代谢产物,如图4(B-E)所示,直接黑38、苋菜红、甲基橙及刚果红在降解前后的特征吸收峰也均有类似的变化。有文献报道,新的代谢产物可能是苯胺类化合物,苯胺类化合物也具有一定的毒性,其是否能够被进一步降解还有待探究^[36];同时也证明了直接黑G的脱色是由微生物降解而非吸附所致。

2.4 红外扫描分析

偶氮染料直接黑G降解前后的红外光谱分析如图5所示,在直接黑G未降解的红外光谱中,波数在3 449 cm⁻¹代表的是苯胺类物质中—NH₂伸缩振动,波数在2 983及2 828 cm⁻¹代表的是C—H的伸缩振动,波数在1 610 cm⁻¹代表的是苯环上C=C键的伸缩振动,波数在1 400-1 600 cm⁻¹代表偶氮双键与苯环骨架振动吸收峰的重叠,波数在1 356 cm⁻¹代表的是N原子连接苯环的C—N特征吸收峰,波数在1 187和1 047 cm⁻¹分别代表磺酸根的不对称伸缩振动与对称伸缩振动,波数在650-900 cm⁻¹代表苯环的面外弯曲振动吸收峰。通过偶氮染料直接黑G降解前后的红外光谱对比发现,偶氮染料直接黑G降解前后的红外光谱发生了显著的变化。其中波数在1 400-1 600 cm⁻¹的偶氮振动吸收峰明显减弱,说明直接黑G的—N=N—双键被破坏,且相关研究表明,偶氮染料的降解最初是由偶氮双键的断裂开始,而偶氮双键是偶氮染料生色基团,从而揭示了偶氮染料脱色的原因^[37];同时波数在1 187和1 047 cm⁻¹处吸收峰几乎完全消失,表明磺酸基团消失,原因可能是磺酸基团在高温环境下结构不稳定,从而导致其脱落^[38];而降

解后波数在3 449 cm⁻¹处的吸收峰依然存在,表明直接黑G降解后可能产生了其他带有—NH₂的中间代谢物。有文献报道,偶氮染料被降解后会生成苯胺类中间代谢产物,因此直接黑G降解后的代谢产物很有可能是侧链带有—NH₂的苯胺类化合物,这与黄春梅研究的偶氮染料降解的中间产物^[39]一致。

2.5 直接黑G降解前后酶活性

相关研究表明,偶氮染料的微生物降解与其本身生长代谢产生的一系列酶系有关;众所周知,微生物的生长代谢是一个非常复杂的过程,需要多种酶的共同参与^[40]。因此,对其降解酶的活性研究也是了解其降解情况的关键。大部分偶氮染料结构中都含有磺酸基团如直接黑G,且相对分子质量较大,不能穿过细胞膜进入胞内进行还原,因此偶氮还原酶及其他相关的降解酶系需依赖于氧化还原介质传递电子给偶氮染料,使其偶氮双键断裂,实现偶氮染料的降解^[41]。直接黑G降解前后酶活性变化的情况如表3所示,与降解前相比,降解后的胞内偶氮还原酶、木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶及漆酶的酶活性增加均极其显著($P < 0.01$),其诱导率分

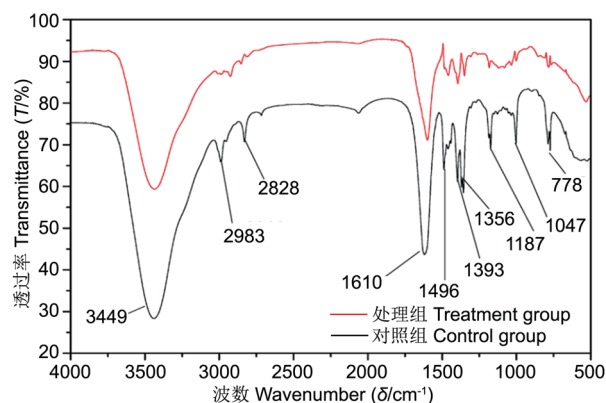


图5 染料降解前后的红外光谱。

Fig. 5 Infrared spectra before and after dye degradation.

别为238.8%、353.5%、525.7%、274.8%；相应的胞外偶氮还原酶、木质素过氧化物酶及锰过氧化物酶的酶活性增加也均极其显著 ($P < 0.01$)，其诱导率分别为57.5%、541.7%、587.2%。上述结果表明，在该嗜热复合菌群降解直接黑G的过程中，偶氮还原酶、木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶及漆酶均具有关键性作用，且相对于降解前，降解后这些酶的诱导率均显著增加，也从另一角度阐明了偶氮染料的存在诱导该复合菌群的生长代谢增强；据文献报道，偶氮还原酶在降解过程中可诱导偶氮染料断裂偶氮双键^[42]，漆酶对偶氮染料及其中间代谢产物均具有较好的降解作用^[40]，而过氧化物酶类在降解偶氮染料同样也占有重要地位，尤其是降解磺化染料^[43]；此

外，本研究中这些酶的共存也表明了降解染料过程中这些酶具有较好的协同作用。

2.6 直接黑G降解前后的植物毒理性

用绿豆种子来测试直接黑G降解后的脱毒效果，如表4和图6所示，蒸馏水萌发的绿豆种子，其发芽率为100%，根长及芽长分别为4.49和10.12 cm，而未经复合菌群处理的染料溶液萌发的绿豆种子与蒸馏水相比差异极显著 ($P < 0.01$)，其绿豆种子发芽率只有63%，且种子的根长及芽长均较短，分别为0.91和1.36 cm，对绿豆种子的生长有明显的抑制作用；而经过复合菌群处理后的降解液萌发的种子与染料溶液相比差异极显著 ($P < 0.01$)，其种子的发芽率及根长、芽长均有明显

表3 直接黑G降解前后酶活性的变化
Table 3 Changes in enzyme activity before and after Direct Black G degradation

酶 Enzyme	对照 Control (0 h)	胞外 Ext	处理 Test (24 h)	胞外 Ext
	胞内 Int		胞内 Int	
偶氮还原酶 Azo reductase ^a	1.5064 ± 0.0018	0.9374 ± 0.0037	5.1037 ± 3.0023 [*]	1.4763 ± 1.0368 [*]
木质素过氧化物酶 Lignin peroxidase ^b	0.0043 ± 0.0002	0.0036 ± 0.0012	0.0195 ± 0.0003.	0.0231 ± 0.0025 [*]
锰过氧化物酶 Manganese peroxidase ^c	0.0035 ± 0.0036	0.0039 ± 0.0049	0.0219 ± 0.0023 [*]	0.0268 ± 0.0075 [*]
漆酶 Laccase ^d	0.0025 ± 0.0001	BDL	0.0712 ± 0.0006 [*]	0.0023 ± 0.0001

a: 酶单位是1 mL反应体系中1 min还原1 μmol甲基红所需酶量；b: 酶单位是每分钟使1 μmol藜芦醛合成所需酶量；c: 酶单位是每分钟使1 μmol Mn²⁺转化为Mn³⁺所需酶量；d: 酶单位是每分钟氧化1 μmol ABTS生成1 μmol自由基所需酶量。*: 降解后酶活性和降解前相比差异极显著 ($P < 0.01$)；BDL: 低于检测水平。

a: The enzyme unit is required to reduce 1 μmol of methyl red in 1 mL for 1 min; b: The enzyme unit is the amount of enzyme required to synthesize 1 μmol veratrol per minute; c: The enzyme unit is the amount of enzyme required to convert 1 μmol of Mn²⁺ to Mn³⁺ per minute; d: The enzyme unit is the enzyme required to oxidize 1 μmol of ABTS per minute to produce 1 μmol of free radicals. *: Enzyme activity after degradation was significantly different from control at the 0.01 level. BDL: Below detectable level.

表4 绿豆种子的根长、芽长以及发芽率
Table 4 Root length, shoot length and germination rate of mung bean seeds

时间 Time (t/h)	根长 Root length (l/cm)	芽长 Shoot length (l/cm)	发芽率 Germination (r/%)
蒸馏水 Distilled water	4.49 ± 0.37	10.12 ± 0.03	100
染料 Dye	0.91 ± 0.12 [*]	1.36 ± 0.29 [*]	63
12	2.19 ± 0.13 ^{**}	3.82 ± 0.94 ^{**}	85
24	3.45 ± 0.21 ^{**}	7.16 ± 0.46 ^{**}	87
36	3.98 ± 0.18 ^{**}	8.98 ± 0.26 ^{**}	93
48	4.05 ± 0.09 ^{**}	9.12 ± 0.69 ^{**}	95

*: 在染料中萌发的种子与在蒸馏水中萌发的种子相比差异极显著 ($P < 0.01$)；**: 在染料降解液中萌发的种子与在染料中萌发的种子相比差异极显著 ($P < 0.01$)。

*: Seeds germinated in dye are significantly different from the seeds germinated in distilled water at the 0.01 level; **: The seeds germinated in degradation products are significantly different from the seeds germinated in DBG at the 0.01 level.

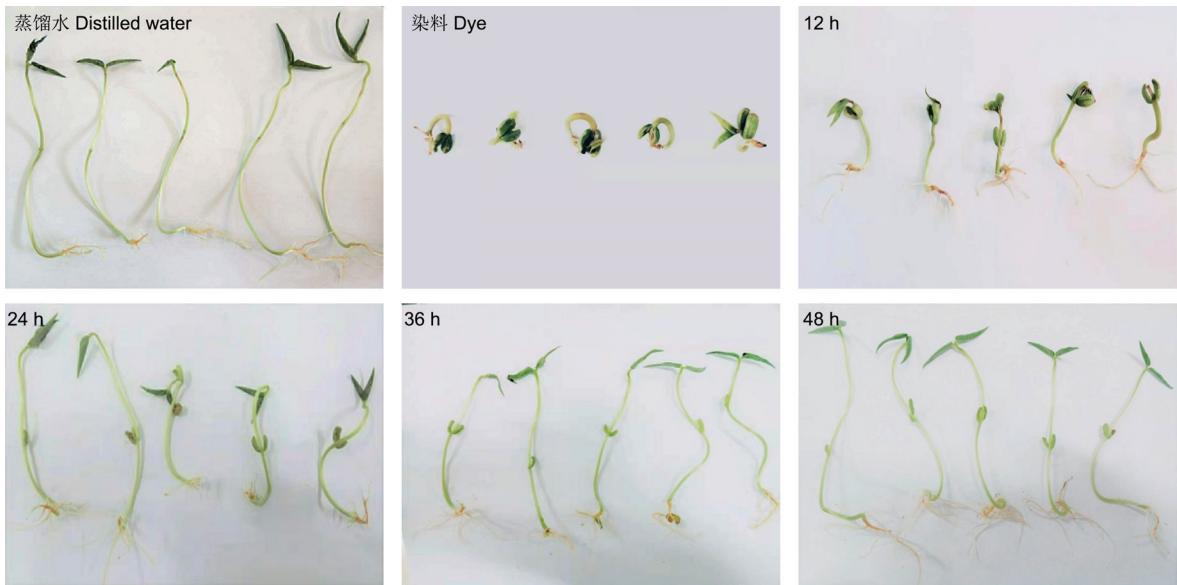


图6 偶氮染料及降解产物对绿豆生长的影响。
Fig. 6 Effect of azo dyes and degradation products on the growth of mung bean.

的增加,到48 h种子的发芽率达到了95%,根长及芽长分别为4.05和9.12 cm。相比之下,经过复合菌群处理的降解液对植物种子的生长状况明显优于未处理的,且长势与蒸馏水处理的种子较为接近。因此,上述植物毒理性试验分析表明,混合菌群可以将有毒的偶氮染料降解为低毒性物质,同时也为偶氮染料的无污染化处理及加强农业灌溉的实际应用提供了一定的理论基础。

3 结论

以前期构建的嗜热偶氮染料降解复合菌群为研究对象,探究了其脱色降解特性。该复合菌群在初始pH为8、温度为55 °C的条件下脱色降解效果最佳,48 h脱色率高达99%。且对直接黑G偶氮染料具有较高的耐受能力,在浓度3 000 mg/L

的条件下脱色率仍高达70%,对不同结构的偶氮染料均表现出了较好的脱色性能。同时,利用Haldane方程对不同浓度的染料脱色进行动力学拟合,最佳脱色速率 R_{opt} 与浓度 p_{opt} 分别为40.597 3 mg g⁻¹ h⁻¹、484.337 6 mg/L。紫外可见光及红外光谱扫描分析发现偶氮染料在降解后其化学键及表面官能团发生了明显的变化,且在偶氮染料的生物降解过程中,偶氮还原酶、木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶及漆酶起着重要作用,且降解后酶活性显著提高;植物毒理性实验证明了偶氮染料经复合菌群降解后的代谢产物对植物的毒性大大降低,这将为偶氮染料废水的无污染化处理提供理论基础。此外,当前对于复合菌群降解偶氮染料的代谢途径与分子机制尚缺少研究,需要进一步的探究,以期为实现偶氮染料废水的快速、高效、彻底的降解奠定基础。

参考文献 [References]

- 1 宋昭仪,胥维昌,马文静,胡金玲,杨洪新.偶氮染料废水处理技术及研究进展[J].染料与染色,2018,55(6):50-54 [Song ZY, Xu WC, Ma WJ, Hu JL, Yang HX. Advances in research and treatment of azo dye wastewater [J]. *Dyes Dyeing*, 2018, 55 (6): 50-54]
- 2 巴桑.偶氮染料与化合物的颜色及危害[J].西藏科技,2015(1):38-39 [Ba S. Color and harm of azo dyes and compounds [J]. *Tibet Sci Technol*, 2015 (1): 38-39]
- 3 李威,崔岱宗,林璐瑶,邸新,李少龙,赵敏.一株偶氮染料高效降解菌的筛选及其降解特性分析[J].农产品加工,2015(6):10-14 [Li W, Cui DZ, Lin LY, Di X, Li SL, Zhao M. Screening and degradation characteristics of an azo dye-efficient degrading bacterium [J]. *Agricult Prod Processing*, 2015 (6): 10-14]
- 4 Modi HA, Garima R, Chetan A. Decolorization of water soluble azo dyes by bacterial cultures, isolated from dye house effluent [J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101 (16): 6580-6583
- 5 张华春,熊国臣.偶氮染料废水处理方法研究进展[J].染料与染色,2016,53(3):45-51 [Zhang HC, Xiong GC. Research progress in the treatment of azo dye wastewater [J]. *Dye Color*, 2016, 53 (3): 45-51]
- 6 董振,刘亮,郝艳,蒋继宏,刘伟杰.偶氮染料废水处理技术的研究进展[J].水处理技术,2017,43(4):6-10 [Dong Z, Liu L, Hao Y, Jiang JH, Liu WJ. Research progress in azo dye wastewater treatment technology [J]. *Technol Water Treatment*, 2017, 43 (4): 6-10]
- 7 郑洁.生物法对偶氮染料废水脱色的研究[J].科技创新与应用,2018(32):64-65 [Zheng J. Study on decolorization of azo dye wastewater by biological method [J]. *Sci Technol Innov Appl*, 2018 (32): 64-65]
- 8 花莉,解井坤,朱超,马宏瑞,彭香玉.微生物对偶氮染料脱色降解的研究进展[J].西北农林科技大学学报,2015,43(10):103-113 [Hua L, Xie JK, Zhu C, Ma HR, Peng XY. Research progress of microbial decolorization and degradation of azo dyes [J]. *J NW A&F Univ*, 2015, 43 (10): 103-113]
- 9 葛飞,石贝杰,唐尧,杨良军,郑述祥,张谐天,段震超.11株白腐真菌对5种偶氮染料脱色效果比较及其脱色条件优化[J].环境工程学报,2016,10(2):963-970 [Ge F, Shi BJ, Tang Y, Yang LJ, Zheng SX, Zhang XT, Duan ZC. Comparison of decolorization of five azo dyes by 11 white rot fungi and optimization of their decolorization conditions [J]. *J Environ Eng*, 2016, 10 (2): 963-970]
- 10 Mokhtar N, Aziz EA, Aris A, Ishak WFW, Ali NSM. Biosorption of azo-dye using marine macro-alga of *Euchema spinosum* [J]. *J Environ Chem Eng*, 2017, 5 (6): 5721-5731
- 11 都林娜,李刚,王阳,泮琇,袁波音.细菌降解偶氮染料的研究进展[J].工业水处理,2015,35(12):1-4 [Du LN, Li G, Wang Y, Pan X, Qiu BY. Research progress of bacterial degradation of azo dyes [J]. *Ind Water Treatment*, 2015, 35 (12): 1-4]
- 12 胡景华,朱向东,孔令保,赖芬菊,刘好桔,陈浪,张庆华.一株嗜热偶氮染料脱色菌的分离鉴定及其脱色特性[J].环境工程学报,2016,10(8):4563-4568 [Hu JH, Zhu XD, Kong LB, Lai FJ, Liu HJ, Chen L, Zhang QH. Isolation, identification and decolorization of a thermophilic azo dye decolorizing bacteria [J]. *J Environ Eng*, 2016, 10 (8): 4563-4568]
- 13 张金平,阚振荣,苏维.混合培养体系对实际染料废水的脱色与降解研究[J].安徽农业科学,2011,39(18):11032-11034 [Zhang JP, Yan ZR, Su W. Study on decolorization and degradation of actual dye wastewater by mixed culture system [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2011, 39 (18): 11032-11034]
- 14 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]. *Bioresour Technol*, 2018, 250: 650-657
- 15 Zimmermann T, Kulla HG, Leisinger T. Properties of purified Orange II azoreductase, the enzyme initiating azo dye degradation by *Pseudomonas* KF46. *Eur J Biochem*, 1982, 129 (1): 197-203
- 16 崔岱宗.偶氮染料脱色细菌的脱色特性及偶氮还原机理的研究[D].哈尔滨:东北林业大学,2012 [Cui DZ. Study on decolorization characteristics and azo reduction mechanism of azo dye decolorizing bacteria [D]. Haerbin: Northeast Forestry University, 2012]
- 17 Legerská B, Chmelová D, Ondrejovi M. Decolourization and detoxification of monoazo dyes by laccase from the white-rot fungus *Trametes versicolor* [J]. *J Biotechnol*. 2018, 285: 84-90
- 18 Naveen K, Surbhi S, Tithi M, Rachana S, Simran T, Indu ST. Biodecolorization of azo dye Acid Black 24 by *Bacillus pseudomycoides*: process optimization using Box Behnken design model and toxicity assessment [J]. *Bioresour Technol*, 2019, 8:

- 100311
- 19 Kshama B, Payal A, Nikhil B, Datta M. Community synergism: degradation of triazine dye reactive Black 1 by mixed bacterial cultures KND_PR under microaerophilic and aerobic conditions [J]. *Environ Proc*, 2019, **6** (3): 713-739
 - 20 Asses N, Ayed L, Hkiri N, Hamdi M. Congo Red decolorization and detoxification by *Aspergillus niger*: removal mechanisms and dye degradation pathway [J]. *BioMed Res Int*, 2018, **2018**: 1-9
 - 21 Chen KC, Wu JY, Liou DJ, Wang CJ. Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains [J]. *J Biotechnol*, 2003, **101** (1): 57-68
 - 22 甘国娟, 田红灯, 潘永龙, Asit Mazumder, 潘响亮, 梁岩. 一株新的高效偶氮染料脱色菌 *Paenibacillus dendritiformis* GGJ7 及其脱色作用[J]. 应用与环境生物学报, 2018, **24** (3): 563-569 [Gan GJ, Tian HD, Pan YL, Asit M, Pan XL, Liang Y. A new high-efficiency azo dye decolorizing bacteria *Paenibacillus dendritiformis* GGJ7 and its decolorization [J]. *J Appl Environ Biol*, 2018, **24** (3): 563]
 - 23 惠丰立, 牛秋红, 刘征, 柯涛, 陈长路, 袁伟. 活性红BF-3BN脱色菌群的构建及特性研究[J]. 环境工程学报, 2011, **5** (7): 1538-1541 [Hui FL, Niu QH, Liu Z, Ke T, Chen CL, Yuan W. Study on the construction and characteristics of reactive red BF-3BN decolorizing bacteria [J]. *J Environ Eng*, 2011, **5** (7): 1538-1541]
 - 24 苏萌, 陶然, 杨扬, 麦晓蓓, 张敏, 王团团. 偶氮染料脱色菌 *Lysinibacillus* sp. FS1 的脱色性能[J]. 环境工程学报, 2015, **9** (10): 4664-4672 [Su M, Tao R, Yang Y, Mai XB, Zhang M, Wang TT. Decolorization performance of azo dye decolorizing bacteria *Lysinibacillus* sp. FS1 [J]. *J Environ Eng*, 2015, **9** (10): 4664-4672]
 - 25 Boonyakamol A, Imai T, Chairattanananokorn P, Higuchi T, Sekine M, Ukita M. Reactive Blue 4 decolorization under mesophilic and thermophilic anaerobic treatments [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2009, **152** (3): 405-417
 - 26 Hatta T, Mukerjee-Dhar G, Damborsky J, Kiyohara H, Kimbara K. Characterization of a novel thermostable Mn (II)-dependent 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase from a polychlorinated biphenyl- and naphthalene-degrading *Bacillus* sp. JF8 [J]. *J Biol Chem*, 2003: 21483-21492
 - 27 Medhat M, El-Zaiat SY, Altalbawy, Farag MA, Saleh, Hagar M. Characterization of the physical properties of azo merocyanine dyes in different solvents and concentrations [J]. *Optik*, 2017: 104-112
 - 28 陈燕, 王园秀, 肖婷, 沈飞, 王春莲, 张庆华. 嗜热复合菌系对不同结构偶氮染料的转化脱色性能[J]. 江西农业大学学报, 2017, **39** (1): 153-160 [Chen Y, Wang YX, Xiao T, Shen F, Wang CL, Zhang QH. Conversion and decolorization of different structures of azo dyes by thermophilic composite strains [J]. *J Jiangxi Agric Univ*, 2017, **39** (1): 153-160]
 - 29 Kaur B, Kumar B, Garg N, Kaur N. Statistical optimization of conditions for decolorization of synthetic dyes by *Cordyceps militaris* MTCC 3936 using RSM. [J]. *BioMed Res Int*, 2015, **2015**: 536745
 - 30 Singh A. Removal of synthetic textile dyes from wastewaters: a critical review on present treatment technologies [J]. *Crit Rev Env Sci Technol*, 2011, **41** (9): 807-878
 - 31 Kalyani DC, Patil PS, Jadhav JP, Govindwar SP. Biodegradation of reactive textile dye Red BLI by an isolated bacterium *Pseudomonas* sp. SUK1 [J]. *Bioresour Technol*, 2008, **99** (11): 4635-46
 - 32 Quan XC, Tang H, Xiong WC, Yang ZF. Bioaugmentation of aerobic sludge granules with a plasmid donor strain for enhanced degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid [J]. *J Hazard Mater*, 2010, **179** (1-3): 1136-1142
 - 33 王震文. 一种降解偶氮染料细菌菌株的筛选、鉴定及其脱色条件与机理研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2012 [Wang ZW. Screening, identification, decolorization conditions and mechanisms of bacterial strains for the degradation of azo dyes [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2012]
 - 34 孔春雷, 孙晓蕾, 周豪, 马桥, 张旭旺, 沈娥, 周集体, 曲媛媛. 菌株 *Acinetobacter* sp. C-2 对酸性红GR的脱色研究[J]. 环境科学与技术, 2013, **36** (3): 83-88 [Kong CL, Sun XL, Zhou H, Zhang XW, Shen E, Zhou JT, Qu YY. Biodecolorization of acid red GR by a newly isolated strain *Acinetobacter* sp. C-2 [J]. *Environ Sci Technol*, 2013, **36** (3): 83-88]
 - 35 谢学辉, 范凤霞, 袁学武, 刘娜, 柳建设. 高效混合菌群FF的筛选及其对活性黑5的脱色作用[J]. 东华大学学报, 2013, **39** (6): 802-813 [Xie XH, Fan FX, Yuan XW, Liu N, Liu JS. Screening of high-efficiency mixed flora FF and its decolorization effect on reactive black 5 [J]. *J Donghua Univ*, 2013, **39** (6): 802-813]
 - 36 王田田, 田姝. 纺织品中常见5种芳香胺鉴定体系的建立[J]. 针织工业, 2015 (9): 71-74 [Wang TT, Tian S. Establishment of five aromatic amine identification systems commonly used in textiles [J]. *Knitting Ind*, 2015 (9): 71-74]
 - 37 Harshad L, Sanjay G, Diby P. Low-cost biodegradation and detoxification of textile azo dye C.I. Reactive Blue 172 by *Providencia rettgeri* strain HSL1 [J]. *J Chem*, 2015: doi 10.1155/2015/894109
 - 38 Ayed L, Mahdhi A, Cheref A, Bakhrouf A. Decolorization and degradation of azo dye Methyl Red by an isolated *Sphingomonas paucimobilis*: biotoxicity and metabolites characterization [J]. *Desalination*, 2011, **274** (1-3): 272-277
 - 39 张娜. 偶氮染料降解菌的筛选及其降解机理初探[D]. 济南: 山东大学, 2016 [Zhang N. Screening of azo dye-degrading bacteria and its degradation mechanism [D]. Jinan: Shandong University, 2016]
 - 40 黄春梅. 偶氮染料的生物脱色及中间产物苯胺类的生物降解特性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2012 [Huang CM. Biological decolorization of azo dyes and biodegradation characteristics of intermediate aniline [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012]
 - 41 Chen Y, Zhang LZ, Feng LL, Chen GT, Wang YX, Zhai ZJ, Zhang QH. Exploration of the key functional strains from an azo dye degradation microbial community by DGGE and high-throughput sequencing technology [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2019, **26** (24): 24658-24671
 - 42 齐澄. 一株偶氮染料活性黑5降解菌的筛选、鉴定与其脱色条件及机理研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2016 [Qi C. Screening, identification and decolorization conditions and mechanism of an azo dye Reactive Black 5 degrading bacteria [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2016]
 - 43 Akkaya A, Ozseker EE, Akdogan HA. Degradation of dyes by laccase [J]. *Anal Lett*, 2016, **49** (6): 790-798