

冯 玮,石海英,徐 伟,等. 1 株高效降解偶氮染料菌株的筛选与鉴定[J]. 江苏农业科学,2015,43(4):352-354.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.04.124

# 1 株高效降解偶氮染料菌株的筛选与鉴定

冯 玮<sup>1</sup>,石海英<sup>1</sup>,徐 伟<sup>1</sup>,柳仁民<sup>2</sup>

(1.聊城大学生命科学学院,山东聊城 252000; 2.聊城大学化学化工学院,山东聊城 252000)

**摘要:**从山东聊城某印染厂污水处理池的活性污泥中筛选出 1 株能高效降解偶氮染料苋菜红的菌株 ts1-2,从生理生化特性和 16S rDNA 序列 2 个方面对该菌株进行鉴定,初步鉴定为驹形白色杆菌(*Leucobacter komagata*)。在静置培养条件下对该菌株的脱色反应进行研究,结果表明,ts1-2 菌株在染料初始浓度 50 mg/L 时有最佳脱色率,染料最大脱色浓度为 1 250 mg/L。在最适脱色条件下脱色 14 h,染料脱色率可达到 95% 以上。

**关键词:**偶氮染料;苋菜红;16s rDNA;脱色率

**中图分类号:** X703;Q939.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)04-0352-03

偶氮染料是一类在生产中广泛使用的染料,它具有色调范围广、色牢度高、合成成本低等优点,可用于纺织、皮制品的染色及印花等。在纺织工业中使用的偶氮染料约占染料总量的 70%<sup>[1]</sup>。

染料废水是较难处理的工业废水。废水中的染料不仅是原料的损失,也会污染环境,阻碍水体自身的净化,对水生植物和鱼类有毒害作用。水中的染料吸收了太阳光,削弱了光在水中的透射,从而抑制了水体中水生植物的光合作用,影响其生长,进而影响到整个食物链,使水生生态系统的多样性下降<sup>[2]</sup>,所以颜色的去除是处理染料废水所面临的一个重要问题。此外,从染料的结构、性质和特点可以判断,大多数染料

都具有潜在的毒性<sup>[3-4]</sup>。这就要求染料废水在排放入环境前必须处理。

本试验以偶氮染料苋菜红为降解对象,筛选能够高效降解此染料的菌种。细菌脱色偶氮染料的机理是产生能降解偶氮染料的偶氮还原酶,本研究还探讨了该菌株的产酶方式,为下一步优化产酶条件研究奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 采样 菌种采自山东聊城某印染厂污水处理车间厌氧污泥。

1.1.2 培养基 富集培养基:牛肉膏 1 g,酵母膏 1 g,蛋白胨 5 g,氯化钠 5 g,蒸馏水 1 000 mL;pH 值 7.0±0.2。脱色培养基:胰蛋白胨 10 g,酵母浸出物 5 g,氯化钠 5 g,蒸馏水 1 000 mL。

1.1.3 偶氮染料 苋菜红(amaranth),化学式见图 1。无特殊说明情况下,苋菜红染料均为 50 mg/L。

收稿日期:2014-04-21

基金项目:国家自然科学基金(编号:31170110)。

作者简介:冯 玮(1984—),女,山东聊城人,硕士研究生,讲师,主要从事资源微生物研究。E-mail:fengwei01@lcu.edu.cn。

通信作者:柳仁民,博士,教授,主要从事分析化学研究。E-mail:liurenmin@lcu.edu.cn。

[12] Park D S, Kim K T, Park Y J, et al. PCR-based sensitive detection of wood-decaying fungus *Phellinus linteus* by specific primer from rDNA ITS regions[J]. Formerly the Korean Journal of Mycology, 2001, 29(1): 7-10.

[13] 刘艳伟,任子旭,方 银,等. 桑枝皮提取物抑制血管紧张素转换酶活性的提取工艺优化[J]. 蚕业科学,2014,40(3):499-504.

[14] 肖建辉,梁宗琦,刘爱英. 虫草无性型及其相关真菌多糖的研究开发现状[J]. 药学学报,2002,37(7):589-592.

[15] Sánchez-Ballesteros J G V, Peláez F. Phylogenetic study of *Hypoxylon* and related genera based on ribosomal ITS sequences[J]. Mycologia, 2000, 92: 964-977.

[16] 朱有勇,王云月, Lyon B. 大丽轮枝菌核糖体基因 ITS 区段的特异扩增[J]. 植物病理学报,1999,29(3):250-255.

[17] Obornik M, Jirku M, Dolezel D. Phylogeny of mitosporic entomopathogenic fungi: is the genus *Paecilomyces* polyphyletic? [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2001, 47(9): 813-819.

[18] 张传博,王艳丽,易 萌,等. 江苏省天王镇磨盘山金蝉花分离菌株鉴定及系统发育分析[J]. 广东农业科学,2013,40(15):

152-154,封 4.

[19] 桂仲争,滕国琴,贾俊强,等. 蛹虫草食药两用开发价值[J]. 中国食物与营养,2012,18(3):70-73.

[20] Wu F Y, Hui Y, Ma X N, et al. Comparison of the structural characterization and biological activity of acidic polysaccharides from *Cordyceps militaris* cultured with different media[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28(5): 2029-2038.

[21] Kim S Y K J, Jung M. Y. antioxidant activities of selected oriental herb extracts[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1994, 71(6): 633-640.

[22] 王吉标,欧阳臻,赵 明,等. 响应面分析法优化金蝉花多糖的提取工艺[J]. 天然产物研究与开发,2014(3):438-443.

[23] 翁 梁. 野生蝉花与人工蝉花多糖的提取及抑菌试验[J]. 农业科技与装备,2010(11):22-24,29.

[24] 马宝琰,陈 新,邓军娥. 中药多糖研究进展[J]. 中国医院药学杂志,2003,23(6):42-44.

[25] 罗娅君,杨葵华. 药用蕨类植物多糖研究进展[J]. 绵阳师范学院学报,2008,27(11):71-74.

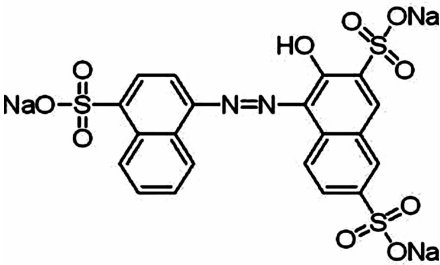


图1 苋菜红化学式

1.2 方法

1.2.1 脱色菌株筛选 将印染厂污水处理车间采集的污泥制成悬浊液,取上清液加入到活化富集培养基中富集,再转移到以偶氮染料为唯一碳源的培养基中驯化,驯化采用一次性投加高浓度化合物的驯化方法,每个驯化周期结束时,取一定体积培养基加入到新鲜的唯一碳源培养基中,并不断提高培养基中偶氮染料的含量,经过多次驯化后,反复进行平板涂布,分离出对偶氮染料有高效降解能力的菌株。

1.2.2 菌种鉴定 (1)形态学观察:将脱色菌株在细菌生长固体培养基平板上培养 24 h,经革兰氏染色后,用显微镜观察细胞形态。(2)生理生化特征:参照《伯杰氏细菌鉴定手册》及参考文献[5]进行鉴定。(3)16S rRNA 基因序列分析:采用 UNIQ-10 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取菌株 DNA。应用 16S rRNA 两端保守区域设计引物——正向引物 7F (5'-CAGAGTTTGATCCTGGCT-3') 和反向引物 1540R (5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') 进行 PCR 扩增。扩增反应体系模板 (基因组 DNA 20~50 ng/μL) 0.5 μL,5 × buffer 2.5 μL, dNTPs (各 2.5 mmol/L) 1 μL, 7F primer 0.5 μL, 1540R primer 0.5 μL, 补加 ddH<sub>2</sub>O 至 25 μL。扩增反应条件为 97 ℃ 3 min; 97 ℃ 25 s, 55 ℃ 25 s, 72 ℃ 1 min, 30 个循环; 72 ℃ 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖电泳检测。PCR 得到的扩增产物送交给生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序,得到的 16S rRNA 核苷酸序列登陆 NCBI,输入 GenBank 数据库进行 BLAST 比对,获取与其核酸序列相似度高的菌种。采用 MEGA 5.0 软件进行多序列匹配比对,计算相似序列之间的进化距离,利用 Neighbor-Joining 构建系统发育树。

1.2.3 产酶模式研究 测定细菌生产曲线,同时测定菌株对染料的脱色率和最大脱色浓度。将菌种接入到未加染料的 LB 培养基中,37 ℃ 静置培养过夜,将培养液按体积分数 2% 的量加入到染料培养基中进行脱色试验。培养液在 8 000 r/min 条件下离心 10 min,取上清液在染料的最大吸收峰 520 nm 处测其吸光度,按照公式计算脱色率:

脱色率 =  $\frac{D_0 - D_t}{D_0} \times 100\%$ 。

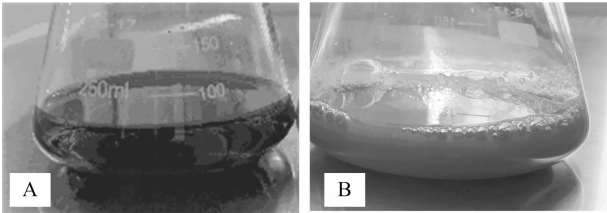
式中: D<sub>0</sub> 为加入细菌前染料的吸光度, D<sub>t</sub> 为加入细菌 t 时间后染料的吸光度。

2 结果与分析

2.1 菌种鉴定

2.1.1 形态学观察 经过分离筛选,并比较 24 h 内的脱色效率,得到 1 株能高效降解苋菜红偶氮染料的菌株 ts1-2。

当染料浓度为 50 mg/L 时,菌株 ts1-2 能在 14 h 内降解 95% 染料,最大脱色浓度为 1 250 mg/L (图 2)。经观察菌株在平板培养基上菌落为圆形,边缘整齐,白色或乳白色,镜检为革兰氏阳性,杆状,不运动。



A—菌株 ts1-2 在染料浓度为 50 mg/L 的培养基中培养 0 h;  
B—菌株 ts1-2 在染料浓度为 50 mg/L 的培养基中培养 14 h

图2 菌株 ts1-2 降解苋菜红偶氮染料效果

2.1.2 生理生化特征。菌株 ts1-2 部分生理生化特征见表 1。

表1 菌株 ts1-2 部分生理生化特征

生理生化试验	生理生化特征	生理生化试验	生理生化特征
淀粉水解	-	V. P. 反应	-
七叶苷水解	-	利用有机物	
脲酶	+	乙酸	+
硫化氢产生	+	草酸	+
吲哚产生	-	柠檬酸	-
硝酸盐还原	-	乳酸	+
甲基红试验	+	琥珀酸	+
		马尿酸	+

2.1.3 16S rRNA 基因序列分析 将扩增得到的 16S rRNA 基因电泳检测,测得其序列长度为 1 405 bp。经 BLASTn 软件序列分析,结果表明 ts1-2 与驹形白色杆菌 (*Leucobacter komagatae*) 聚为一簇,同源性最高。从 GenBank 中调取与细菌 ts1-2 同源性较高的 15 株菌株的 16S rRNA 基因序列构建系统发育树见图 3。结果显示,ts1-2 与 *L. komagatae* 种相似度最高达 99%。根据菌株的形态学特征、生理生化特征和 16S rRNA 基因序列分析,初步确认 ts1-2 菌为驹形白色杆菌。

2.2 产酶模式研究

将菌株在 37 ℃ 条件下静置培养测定其生长曲线,发现细菌 ts1-2 在 4~14 h 内为对数生长期,14~60 h 内为平衡期,60 h 后进入衰亡期 (图 4)。

细菌能够使偶氮染料褪色,是因为菌体产生了能够降解偶氮染料的偶氮还原酶<sup>[6]</sup>。Hu 等证明,细菌分泌的偶氮还原酶为一种诱导酶而不是固有酶<sup>[7]</sup>。在培养基中加入染料作为诱导物,菌体则会产生偶氮还原酶。测定细菌 ts1-2 生长 24 h 内脱色率,结果如图 5 所示。

菌体进入对数生长期时,菌体的脱色效率成指数增长,表明菌体内的偶氮还原酶随菌体增多而增多。当菌体生长进入平衡期后,菌体数量不再增加,重复加入染料后发现菌体仍有脱色能力,但脱色速率变小,说明能够还原染料的酶虽然保持一定活性但是没有新的酶产生,这种酶的合成方式应为同步合成型。

3 结论

纺织废水由于所含染料具有色度高、化学结构稳定以及

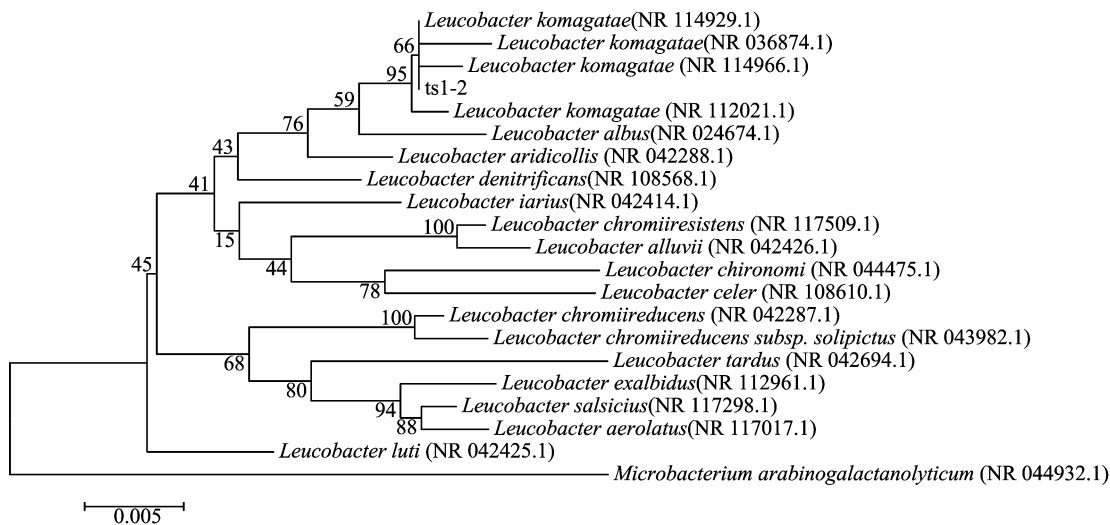


图3 16S rDNA 序列分析聚类结果

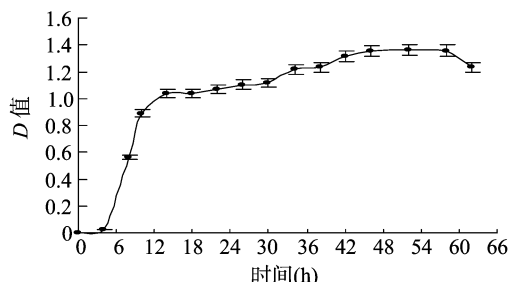


图4 细菌 ts1-2 生长曲线

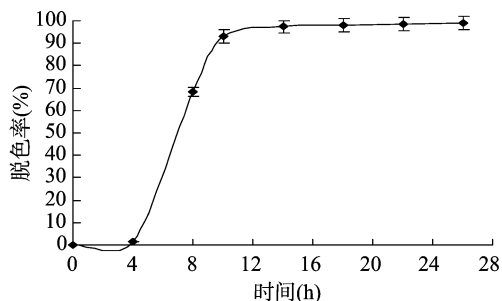


图5 细菌 ts1-2 生长 24 h 内脱色率

难于被降解等特点,成为目前最难处理和最受关注的废水之一。偶氮染料在纺织染料中所占的比例最高,超过了70%。目前处理染料废水的物理和化学方法具有处理成本高、处理不彻底并且容易造成二次污染等缺点<sup>[8]</sup>。因此,筛选高效降解偶氮染料的微生物,将其应用于染料废水处理具有深远的意义,并且逐渐成为研究的热点之一。

本试验从印染厂染料废水处理反应池的活性污泥中,筛选分离出1株能使偶氮染料苋菜红脱色的菌株 ts1-2。从形态学特征、生理生化特征和16S rDNA 基因序列比对3个方面对菌株进行鉴定,确定其为驹形白色杆菌(*L. komagatae*)。

Suzuki 等从纺织厂污水处理装置附近土壤中得到1株能够还原偶氮染料的芽孢杆菌 OY1-2<sup>[9]</sup>。Wong 等从染料废水污泥中分离出能够在好氧条件下将甲基红脱色的细菌肺炎克雷伯氏菌 RS-13<sup>[10]</sup>。Hu 等发现的菌株 *Pseudomonas luteola* 在完全静止或完全振荡的条件下均不降解染料,但在2 d

振荡加2 d 静止的条件下对染料的脱色效果显著<sup>[11]</sup>。本次分离得到的菌株 ts1-2 仅在静置培养14 h 就能使50 mg/L 浓度染料脱色95% 以上,培养条件简单,脱色效率高。本试验还发现此菌株的产酶方式为同步合成型,为进一步优化菌株产酶条件的工作奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] Saratale R G, Saratale G D, Kalyani D C, et al. Enhanced decolorization and biodegradation of textile azo dye Scarlet R by using developed microbial consortium - GR [J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100 (9): 2493 - 2500.
- [2] 薛方亮, 张雁秋. 染料废水处理技术最新研究进展[J]. *水科学与工程技术*, 2007 (2): 26 - 29.
- [3] Aouadene A, Di Giorgio C, Sarrazin L, et al. Evaluation of the genotoxicity of river sediments from industrialized and unaffected areas using a battery of short-term bioassays [J]. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2008, 49 (4): 283 - 299.
- [4] Umbuzeiro A, Freeman H, Warren S H, et al. The contribution of azodyes to the mutagenic activity of the Cristais River [J]. *Chemosphere*, 2005, 60: 55 - 64.
- [5] 刘洪灿, 周培瑾, 横田明, 等. 白色杆菌属一新种的分离鉴定及其系统发育学分析[J]. *微生物学报*, 1999, 39 (5): 396 - 401.
- [6] 柳广飞, 周集体, 王 竞, 等. 细菌对偶氮染料的降解及偶氮还原酶的研究进展[J]. *环境科学与技术*, 2006, 29 (4): 112 - 114.
- [7] Hu T L. Degradation of azo dye RP2B by *Pseudomonas luteola* [J]. *Water Science and Technology*, 1998, 38 (4/5): 299 - 306.
- [8] 杨清香, 贾振杰, 杨 敏. 微生物染料脱色研究进展[J]. *微生物学通报*, 2006, 33 (4): 144 - 148.
- [9] Suzuki Y, Yoda T, Ruhul A, et al. Molecular cloning and characterization of the gene coding for azoreductase from *Bacillus* sp. OY1-2 isolated from soil [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276 (12): 9059 - 9065.
- [10] Wong P K, Yuen P Y. Decolorization and biodegradation of methyl red by *Klebsiella pneumoniae* RS-13 [J]. *Water Research*, 1996, 30 (7): 1736 - 1744.
- [11] Hu T L. Decolourization of reactive azo dyes by transformation with *Pseudomonas luteola* [J]. *Bioresource Technology*, 1994, 49: 47 - 51.