

# 染料的生物降解研究\*

许玫英<sup>1,2</sup> 郭俊<sup>1,2</sup> 岑英华<sup>1,2</sup> 孙国萍<sup>1,2\*\*</sup>

(广东省微生物研究所 广州 510070)<sup>1</sup> (广东省菌种保藏与应用重点实验室 广州 510070)<sup>2</sup>

**摘要:** 生物降解法是染料污染治理的重要方法。针对目前使用量较大的偶氮染料、三苯基甲烷染料和蒽醌染料这3大类染料,重点介绍了厌氧和好氧条件下的偶氮还原及其机理、三苯基甲烷染料降解菌和蒽醌染料降解菌的研究进展。

**关键词:** 染料, 生物降解, 脱色机理

**中图分类号:** Q939.1 LX791 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 01-0138-06

## Review of Studies on the Dye Biodegradation\*

XU Mei-Ying<sup>1,2</sup> GUO Jun<sup>1,2</sup> CEN Ying-Hua<sup>1,2</sup> SUN Guo-Ping<sup>1,2\*\*</sup>

(Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070)<sup>1</sup>

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou 510070)<sup>2</sup>

**Abstract:** Biological process is the important approach to treat the dye pollutants. This paper gives a systematic introduction to the three types of important dyes, azo dyes, triphenylmethane dyes and anthraquinone dyes, including azo reduction and mechanism under anaerobic and aerobic conditions, advances of triphenylmethane dyes and anthraquinone dyes biodegradation.

**Key words:** Dye, Biodegradation, Decolorizing mechanism

随着染料化学工业的发展,合成染料被广泛应用于纺织、皮革、食品、日用化工等行业中。据调查,目前世界染料年产量约为  $8 \sim 9 \times 10^5$  t,染料种类多达 100,000 多种,在染料的使用过程中大约有 10% 被直接排放到污水处理系统或环境中<sup>[1]</sup>。染料对环境的污染首先是对水体色度的污染。水体中只要存在很少量的染料(对于某些染料来说,在不足 1mg/L 的染料浓度条件下)即可产生很高的色度,这不仅影响水体环境的美观,也影响水体的透光性和气体的溶解度。人工合成的染料通常含有复杂的芳香环结构、品种繁多、化学稳定性高、生物可降解性低,且多数染料及其代谢中间产物具有致突变性、致癌性和其他毒性,这也是染料成为重要的环境污染物的原因之一<sup>[2]</sup>。

传统的污水处理系统对于非异生型化合物通常具有较稳定的处理效果,而对于染料这类难降解的人工合成化合物的处理效率较差。物化法的运行成本通常较高,且容易产生二次污染。微生物具有繁殖速度快,适应性强等特点,利用高效脱色微生物进行环境污染整治不仅成本低,且可减少二次污染的产生,因此,采用生物法对染料污染进行整治越来越受到人们的关注。

\* 国家高技术研究发展计划项目 (“863”项目) (No. 2003AA214040)

国家自然科学基金资助项目 (No. 30500009)

广东省自然科学基金团队项目 (No. 015017)

广东省自然科学基金项目资助 (No. 04000242)

\*\* 通讯作者 Tel: 86-20-87684471, Fax: 86-20-87684471, E-mail: ebiotech@gdas.ac.cn

收稿日期: 2005-04-15, 修回日期: 2005-05-30

染料种类繁多,其共同特点是由于发色基团的存在而能够吸收可见光。以相似的发色基团来划分染料,可将染料分为偶氮染料、蒽醌染料、三苯基甲烷染料、二苯基甲烷染料、硝基染料、亚硝基染料、吡啶染料、靛蓝染料、花青染料等。其中偶氮染料、蒽醌染料、三苯基甲烷染料是目前使用较广的3大类染料。

## 1 偶氮染料的生物降解研究

分子中含有偶氮双键( $-N=N-$ )的染料统称为偶氮染料,这些染料可以含有2个或3个偶氮双键,是染料中用量最大的一类,约占全部染料的70%。到目前为止,只在一种天然物质(4,4'-二羟基偶氮苯)中发现偶氮双键,市场上所使用的2,000多种偶氮染料几乎都是人工合成的<sup>[1]</sup>。自70年代未发现某些肠道细菌可降解偶氮染料以来,越来越多的学者致力于染料微生物脱色、降解研究。目前已分离到的偶氮脱色菌主要包括芽孢杆菌、黄单胞菌、克雷伯氏菌等十几个菌属。最近,同济大学乐毅全等<sup>[3]</sup>分离到一株偶氮染料脱色菌,经生理生化鉴定为 *Shewanella putrefaciens*。Xu等从印染废水处理系统的活性污泥中分离到一株对多种偶氮染料和蒽醌染料均具有高效脱色能力的希瓦氏菌新种——脱色希瓦氏菌(*Shewanella decolorationis*) S12<sup>[4]</sup>。

**1.1 厌氧条件下的偶氮还原及其机理** 已发现的偶氮染料脱色菌大多数是在厌氧条件下非特异性地还原偶氮双键,使偶氮染料脱色。这一过程是由酶催化的,这种酶通常称为偶氮还原酶。研究表明,厌氧条件下进行的偶氮还原反应过程的底物专一性相当低,很多种还原型的中间介质均能使偶氮化合物还原。

早期的研究认为,细菌黄素依赖型的还原酶所催化产生的黄素可对偶氮化合物进行非特异性的还原<sup>[5]</sup>,由于细胞膜对强极性的磺化染料的允许穿透能力较低,因此细胞抽提物往往比完整细胞具有更快的厌氧偶氮还原速率。这种模式认为黄素还原酶即是文献上泛指偶氮还原酶。另一种反应模式认为,细菌非特异性地还原偶氮染料,并不要求偶氮染料或者还原了的黄素穿过细胞膜。1997年,Keck等<sup>[6]</sup>发现在 *Sphingomonas xenophaga* BN6 的偶氮染料脱色系统中,蒽醌类化合物(2,6-双磺酸蒽醌)起着氧化还原介质的功能,该介质通过细胞膜上的蒽醌还原酶还原后所产生的羟基蒽醌可还原培养液中的偶氮染料,此反应是一种纯化学的氧化还原反应(图1)。

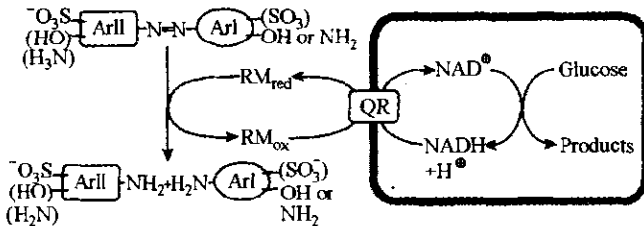


图1 *Sphingomonas xenophaga* BN6 依赖氧化还原中间介质还原偶氮染料的可能机制<sup>[6]</sup>

Rafii等<sup>[7]</sup>也发现某些分离自肠道的严格厌氧菌的偶氮还原过程也不需要穿过细胞膜。Rau和Stolz<sup>[8]</sup>在大肠杆菌的细胞质中发现一种NADH依赖型的Lawson还原酶具有厌氧还原偶氮的能力,氨基酸序列测定结果表明该酶就是氧不敏感的硝酸还原酶NfsB,进一步的实验表明,该菌株另一个氧不敏感的硝酸还原酶NfsA在厌氧条件下也具有醌依赖型偶氮还原酶的功能。最近,从芽孢杆菌SF中发现了一种耐碱和耐热的偶氮还原酶,该酶为一种NADH依赖型的偶氮还原酶,厌氧条件下FAD可有效地提高酶

的脱色活性<sup>[9]</sup>。

许玫英等对脱色希瓦氏菌 S12 的偶氮脱色特性和脱色机理的研究结果表明, 该菌能在含 500mg/L 酸性大红 GR 的固体培养基上形成明显的脱色圈<sup>[10]</sup>, 在浓度为 200mg/L 的液体染料培养基中经 384h 的培养, 可实现偶氮还原产生的芳香胺类化合物的开环降解。该菌负责偶氮脱色的酶属于组成型表达, 主要位于细胞膜。这些脱色酶本身对分子氧并不敏感, 但必须在严格厌氧条件下才显示出脱色活性。电子穿梭子 FAD、FMN 和 AQS 对菌株 S12 完整细胞的偶氮脱色均有一定的促进作用。细胞膜上脱色酶的脱色活性与 FAD 的量成正相关, 加入 NADH 可进一步增强 FAD 对脱色酶活性的促进作用。

**1.2 好氧条件下的偶氮还原及其机理** 近年来, 好氧条件下具有对偶氮染料还原脱色的菌株陆续被发现。这些细菌大部分是在其他碳源存在的条件下才具有好氧偶氮还原的能力<sup>[1, 2, 9]</sup>, 能以偶氮染料为唯一碳源和能源进行好氧生长的菌株仍然较少<sup>[11]</sup>。Kulla 等人从具有降解 4, 4'-dicarboxyazobenzene 能力的菌群中分离到 *Xenophilus azovorans* KF46F 和 *Pigmentiphaga kullae* K24, 它们分别能以偶氮染料 Carboxy-orange I 和 Carboxy-orange II 为唯一碳源和能源生长<sup>[1]</sup>。从 4-aminobenzenesulfonate 富集驯化的菌群中也分离到能以磺酸偶氮染料 4-carboxy-4'-sulfoazobenzene (CSAB) 为唯一碳源和能源生长的 *Hydrogenophaga intermedia* S1<sup>[12]</sup> 和菌株 S5<sup>[13]</sup>。最近的研究也证实了 *Sphingomonas* 1CX 具有降解几种磺酸偶氮染料和低浓度酸性橙 7 的能力<sup>[14]</sup>。然而, 目前所谓的细菌好氧还原偶氮染料, 大部分是指将好氧摇床条件下培养细菌以较大的接种量接种至含染料的培养基中, 在静置条件下观察染料脱色的情况。推测这主要是由于接种的好氧细菌快速消耗培养基中的氧气, 形成局部的低氧分压, 从而实现染料的脱色。这种现象实际上也属于厌氧偶氮还原脱色。

细菌对偶氮染料的好氧降解通常是由好氧偶氮还原酶来完成的。这类酶能在分子氧存在的条件下特异性地催化偶氮化合物降解脱色。Zimmermann 等早已从 *Pigmentiphaga kullae* K24 和 *Xenophilus azovorans* KF46F 中分离纯化到对 Carboxy-Orange 进行特异性降解的好氧偶氮还原酶<sup>[1]</sup>。Mazumder 等<sup>[15]</sup>从 *Caulobacter subvibrioides* C7-D 中分离纯化到一种对氧不敏感的偶氮还原酶, 该酶可对酸性橙 6、酸性红 88、甲基红等七种偶氮染料进行还原脱色。近年来, 对不同结构的偶氮化合物进行特异性好氧还原的偶氮还原酶也先后从 *Bacillus* sp. OY1-2, *Escherichia coli*, *Xenophilus azovorans* KF46F 和 *Pigmentiphaga kullae* K24 等菌株中克隆、测序<sup>[1]</sup>。好氧 FMN 依赖型的偶氮还原酶 (AzoA) 也首次从人肠道革兰氏阳性细菌中被发现<sup>[16]</sup>。对这些酶基因序列进行比较, 结果发现其序列的同源性相当低, 表明这些酶各自都有不同的进化起源。

## 2 三苯基甲烷染料的生物降解研究

三苯基甲烷染料除了在纺织、印染、造纸和化工行业使用外, 还被广泛地应用于食品、医药和生物学的染色方面。在中国大颚鼠类的 CHO 细胞和其它五种不同的哺乳动物细胞所进行的细胞毒性研究结果表明, 三苯基甲烷染料龙胆紫和结晶紫这些化合物均具有有丝分裂的生物毒性<sup>[17]</sup>。

早在 1981 年, Yatome 等就发现 *Pseudomonas pseudomallei* 13NA 具有降解三苯基甲烷染料的能力。与碱性品红和维多利亚蓝相比, 甲基紫和结晶紫更容易被脱色。有关

染料脱色与结构之间的关系的研究结果表明,三苯基甲烷类染料的脱色能力与染料的分子量和辛醇-水界面共效应无关<sup>[18]</sup>。1991年, Yatome等<sup>[19]</sup>又报道了 *B. subtilis* IFO 13719对结晶紫、Prarosanine和维多利亚蓝等三苯基甲烷染料的降解。在低细胞生长量的条件下,反应8h后结晶紫开始脱色,24h后细胞生长量明显提高,这时候结晶紫被完全脱色。该研究发现,当结晶紫的浓度低于  $7 \times 10^{-6}$  mol/L时可以被脱色,当浓度达到  $1.5 \sim 2.0 \times 10^{-5}$  mol/L时细菌的生长被完全抑制。在低生长量的条件下, *B. subtilis*还可对碱性槐黄O、碱性品红和维多利亚蓝等染料进行脱色。而对于生长速率相当快的大肠杆菌、假单胞菌等则无法对结晶紫进行脱色。Roth等<sup>[20]</sup>分离到21株具有三苯基甲烷染料脱色活性的疏水亲脂的细菌,这些菌株均可对结晶紫和孔雀绿进行脱色,其中活性最强的是 *Mycobacterium*。德国的一项专利技术采用 *Corynebacterium* 和 *Mycobacterium* 对三苯基甲烷染料进行降解,在  $15^{\circ}\text{C} \sim 40^{\circ}\text{C}$  不需外加碳源的条件下,细菌经1~12h反应后可将结晶紫和孔雀绿从废水或土壤中除去。Jones和Falkinham<sup>[21]</sup>也发现 *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium marinum* 和 *Mycobacterium chelonae* 均能对孔雀绿和结晶紫进行脱色。分析在含有孔雀绿的培养基中生长的 *M. avium* A5的脂质特性的结果发现该菌细胞表面的脂质部分具有强的螯合染料的能力,细胞膜的脱色活性是细胞粗提液的五倍,膜的脱色活性主要是由蛋白质完成的。印度学者Sani和Banerjee<sup>[22]</sup>从印染厂废水处理系统出水口附近的土壤和水样中分离到几株具有三苯基甲烷染料脱色作用的菌株,其中 *Kurthia* sp. 对孔雀绿、结晶紫、洋红、副品红和艳绿等染料均具有高效的脱色特性,尤其是对结构较简单的副品红仅需53min即可达到100%的脱色。该菌株对含多种三苯基甲烷染料的印染废水也具有高的脱色速率。Jian等<sup>[23]</sup>分离到3株气单胞菌,它们对偶氮染料的酸性大红、三苯基甲烷染料的碱性绿和蒽醌染料的活性艳蓝均具有脱色作用,尤其对碱性绿的脱色能力最强。经检测,发现这3株菌各含有一个大质粒,将这些大质粒消除后,菌株的脱色速率出现不同程度的降低。最近,Sharma等<sup>[24]</sup>从土壤和活性污泥中分离到25株对酸性紫17具有脱色作用的菌株,其中归属于 *Bacillus* sp., *Alcaligenes* sp. 和 *Aeromonas* sp. 的五株菌对染料的脱色率达到50%以上。将这五株菌组成菌群研究它们对不同三苯基甲烷染料的脱色能力,结果发现该菌群可对酸性紫17、酸性蓝15、结晶紫、孔雀绿、艳绿这5种三苯基甲烷染料进行有效地脱色。

尽管染料的脱色研究已经被广泛开展,但目前有关三苯基甲烷染料生物降解中间产物的报道仍然较少。Yatome等<sup>[25]</sup>采用薄层层析(TLC)和气质联用(GC-MS)分析了 *Nocardia corallina* 降解结晶紫的主要代谢产物为4,4'-二甲胺苯酚(4,4'-bis dimethylamino benzophenone)。最近,Gosetti等<sup>[26]</sup>采用液质联用(LC-MS)研究了食品工业中常用的三苯基甲烷染料E133艳蓝FCF的氧化降解途径,为进一步深入研究三苯基甲烷染料的生物降解途径提供了有力的技术支持。

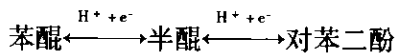
### 3 蒽醌染料的生物降解研究

含有蒽醌结构或多环酮结构的染料称为蒽醌染料。蒽醌染料这种多芳环的结构特点使其化学结构更稳定、更难生物降解。尽管蒽醌染料的产量仅次于偶氮染料,但目前有关蒽醌染料的脱色菌和脱色机理的研究报道仍然很少。

日本学者Itoh等<sup>[27-29]</sup>先后报道了 *Bacillus subtilis*, *Pichia anomala* 和 *Coriolus versico-*

lor 对蒽醌染料的降解, 并对这些菌株的蒽醌染料降解途径进行了初步的研究。南开大学和大连理工大学也对蒽醌染料及其中间体溴氨酸的微生物降解性进行了研究<sup>[30-32]</sup>。辛宝平等从土壤中筛选到一株对溴氨酸具有高效脱色能力的黄杆菌 BX26, 研究发现该菌的脱色酶属于诱导性胞外酶<sup>[30]</sup>。宋文华等对分离到的两株蒽醌染料脱色优势菌 ND1 和 ND2 的脱色基因进行初步定位, 结果发现这两株菌降解染料的能力都是由质粒控制的<sup>[31]</sup>。许玫英等对脱色希瓦氏菌 S12 的蒽醌染料脱色特性及其脱色酶的研究结果表明, 该菌株首先以生物絮凝的方式使培养液中的染料浓度迅速降低, 继而通过生物降解的方式逐步实现染料的开环降解, 该菌负责蒽醌染料脱色的酶是属于组成型表达的, 主要位于细胞膜的外周可溶性蛋白。

蒽醌及其衍生物的还原是通过两步可逆反应, 由苯醌经半醌还原为对苯二酚, 其还原过程如下式所示:



细菌降解蒽醌染料时, 一般认为先要通过一种还原酶, 催化还原裂解染料分子的共扼键, 使其结构发生变化。Itoh 等<sup>[27]</sup>研究发现, *Bacillus subtilis* 对蒽醌染料的脱色还原速率与醌环上取代基的性质有很大的关系, 其脱色顺序如下: 二羟基 > 氨基-羟基 > 氨基-甲基 > 二氨基。在厌氧条件下, 蒽醌染料的脱色速率通常比偶氮染料慢。分散红 15 的一种可能的降解途径为氨基的脱除和分子的不饱和共扼键的破坏。黄丽萍等<sup>[33]</sup>的研究表明, 溴氨酸的微生物代谢中间产物有邻苯二甲酸产生, 降解产物是一种溴代芳磺酸类化合物。

#### 4 存在问题及研究展望

生物降解是染料污染治理的重要方法。目前有关染料生物降解的研究大多只涉及偶氮染料, 对于三苯基甲烷染料和蒽醌染料的生物降解研究则较少。国内外对于脱色微生物的研究仍主要集中在染料高效菌株的分离、选育以及个别脱色酶的纯化和特性研究这一层次。近年来分子生物技术和化学分析检测手段的发展, 为染料生物降解研究的深入开展打下了良好的基础。染料脱色菌的脱色特性、脱色机理及其相关遗传背景研究的深入开展, 与有机物氧化相耦联的新型呼吸途径的发现和研 究, 将有利于进一步提高染料生物降解的效率。

#### 参 考 文 献

- [1] Stolz A. *Applied and Microbiology Biotechnology*, 2001, **56**: 69 ~ 80.
- [2] Banat I M, Nigam P, Singh D, *et al.* *Bioresource Technology*, 1996, **58**: 217 ~ 227.
- [3] 乐毅全, 朱核光, 王世芬. *上海环境科学*, 2003, **22** (8): 556 ~ 558.
- [4] Xu M, Guo J, Cen Y, *et al.* *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, **55**: 363 ~ 368.
- [5] Russ R, Rau J, Stolz A. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66** (4): 1429 ~ 1434.
- [6] Keck A, Klein J, Kudlich M, *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **63**: 3684 ~ 3690.
- [7] Raffi F, Franklin W, Cerniglia C E. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, **56** (7): 2164 ~ 2151.
- [8] Rau J, Stolz A. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69** (6): 3448 ~ 3455.
- [9] Maier J, Kandelbauer A, Erlacher A, *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **70** (2): 837 ~ 844.
- [10] 许玫英, 钟小燕, 曹 涓, 等. *微生物学通报*, 2005, **32** (1): 5 ~ 9.
- [11] Dykes G A, Timm R G, von Holy A. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, **60**: 3027 ~ 3029.
- [12] Contzen M, Moore E R B, Blümel S, *et al.* *Systematic and Applied Microbiology*, 2000, **23**: 487 ~ 493.

- [13] Blümel S, Contzen M, Lutz M, *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64** (6): 2315 ~ 2317.
- [14] Coughlin M F, Kinkle B K, Tepper A, *et al.* *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 1999, **23**: 341 ~ 346.
- [15] Mazumder R, Logan J R, Mikell A T, *et al.* *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 1999, **23**: 476 ~ 483.
- [16] Chen H, Wang R F, Cerniglia C E. *Protein Expression and Purification*, 2004, **34**: 302 ~ 310.
- [17] Nelson C R, Hites R A. *Environmental Science and Technology*, 1982, **14**: 1147 ~ 1149.
- [18] Yatome C, Ogawa T, Koga D, *et al.* *J Soc Dyers Colourists*, 1981, **97**: 166 ~ 168.
- [19] Yatome C, Ogawa T, Matsui M. *Journal of Environmental Science and Health*, 1991, **A26**: 75 ~ 87.
- [20] Roth P, Sattler K, Berger R, *et al.* *Zbl Mikrobiol*, 1992, **147**: 409 ~ 417.
- [21] Jones J J, Falkinham J O. *Agents and Chemotherapy*, 2003, **47** (7): 2323 ~ 2326.
- [22] Sani R K, Banerjee U C. *Enzyme and Microbial Technology*, 1999, **24**: 433 ~ 437.
- [23] Jian H, Tso W-W, Wong T M Y, *et al.* In: Michael Healy *et al.* (eds.) *Environmental Monitoring and Biodiagnostics of Hazardous Contaminants*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000. 91 ~ 104.
- [24] Sharma D K, Saini H S, Singh M, *et al.* *Journal of Basic Microbiology*, 2004, **44** (1): 59 ~ 65.
- [25] Yatome C, Yamada S, Ogawa T, *et al.* *Applied and Microbiology Biotechnology*, 1993, **38**: 565 ~ 569.
- [26] Cosetti F, Gianotti V, Angioi S, *et al.* *Journal of Chromatography. A*, 2004, **1054**: 379 ~ 387.
- [27] Itoh K, Yatome C, Ogawa T. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1993, **50**: 522 ~ 527.
- [28] Itoh K, Kitade Y, Yatome C. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1996, **56**: 413 ~ 418.
- [29] Itoh K, Kitade Y, Yatome C. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1998, **60**: 786 ~ 790.
- [30] 辛宝平, 庄源益, 邹其猛, 等. *中国环境科学*, 2000, **20** (4): 332 ~ 336.
- [31] 宋文华, 颜慧, 胡国臣, 等. *环境化学*, 1999, **18** (3): 265 ~ 271.
- [32] Dong X, Zhou J, Liu Y. *Process Biochemistry*, 2003, **39**: 89 ~ 94.
- [33] 黄丽萍, 周集体, 杨凤林, 等. *大连理工大学学报*, 2000, **40** (5): 557 ~ 561.