

研究报告



一株新型苯胺蓝降解菌 MP-13 的代谢特征

李锋 梁念 孙建中*

江苏大学环境与安全工程学院生物质能源研究所 江苏 镇江 212013

摘要:【背景】三苯甲烷类染料的广泛使用对我国生态环境构成了极大危害, 亟待开发一种经济、高效和环境友好型的染料废水处理技术。目前, 利用微生物处理染料废水被认为是一种环境友好型的方法。【目的】通过解析菌株 MP-13 对苯胺蓝的降解特性, 为该菌株在染料废水治理中的应用提供核心理论与技术依据。【方法】从食木白蚁肠道中筛选一株苯胺蓝脱色菌, 对其进行 16S rRNA 基因序列分析鉴定, 确定其基本生物学特征, 然后通过 FTIR、GC/MS 等分析手段解析该菌对苯胺蓝的降解特征。【结果】菌株 MP-13 经鉴定为土白蚁特拉布尔希氏菌(*Trabulsiella odontotermis*), 该菌对苯胺蓝降解的最适温度、pH 和转速分别为 35 °C、8.0 和 180 r/min, 苯胺蓝浓度为 200 mg/L 时最大脱色率可达 97.3%, 且对苯胺蓝的耐受浓度可达 1 500 mg/L。此外, FTIR 和 GC/MS 的结果表明苯胺蓝被降解为小分子芳香族化合物。【结论】*Trabulsiella odontotermis* MP-13 对苯胺蓝有较强降解能力和较高耐受性, 可作为染料废水生物修复的潜在菌株资源。

关键词: 三苯甲烷类染料, 苯胺蓝, 土白蚁特拉布尔希氏菌, 降解途径

Degradation characteristics of a novel aniline blue-discoloring bacterial strain MP-13

LI Feng LIANG Nian SUN Jian-Zhong*

Biofuels Institute, School of the Environment and Safety Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China

Abstract: [Background] The wide use of aniline blue, a common refractory organic pollutants, harms and threatens the ecological environments. Hence, it is important to develop an eco-friendly and cost-effective technology to treat the dye contaminated wastewater. Biological method is environmentally friendly and applied to deal with dye contaminated wastewater. [Objective] Our study was to provide a core theory and supporting technology to isolate and characterize a novel bacterial strain, *Trabulsiella odontotermis* MP13, for its potential decolorization of dye wastewater. [Methods] Some aniline blue-decoloring bacteria were first isolated from the gut of a termite species, *Microtermes pakistanicus*, and then identified by 16S rRNA gene sequence analysis for their phylogeny property and other relevant biological properties.

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31772529); Research Innovation Program for College Graduates of Jiangsu Province (KYLY16_0910); Priority Program Development of Jiangsu Provincial Higher Education Institutions (4013000019)

*Corresponding author: Tel: 86-511-88796122; E-mail: jzsun1002@ujs.edu.cn

Received: 11-05-2019; Accepted: 13-06-2019; Published online: 13-07-2019

基金项目: 国家自然科学基金(31772529); 江苏省研究生科研与实践创新计划项目(KYLY16_0910); 江苏省高校优势学科建设工程资助项目(4013000019)

*通信作者: Tel: 0511-88796122; E-mail: jzsun1002@ujs.edu.cn

收稿日期: 2019-05-11; 接受日期: 2019-06-13; 网络首发日期: 2019-07-13

Further, with a variety of evaluation methods, such as FTIR and GC/MS, the degradation characteristics of aniline blue by strain MP13 were analyzed. **[Results]** A novel bacterial strain MP-13 was identified as *Trabulsiella odontotermitis* that could tolerate and effectively degrade aniline blue up to a high concentration of 1 500 mg/L. The optimal temperature, pH and rotation speed for dye decolorization were 30 °C, 8.0, and 180 r/min, respectively. The decolorization efficiency was up to 97.3%, when aniline blue concentration was at 200 mg/L. Further, the FTIR and GC/MS analysis showed that aniline blue was biotransformed into low molecular weight aromatic compounds. **[Conclusion]** *Trabulsiella odontotermitis* MP-13 exhibited a remarkable decolorization ability for aniline blue, suggesting its potential for industrial dye waste water treatment.

Keywords: Triphenylmethane dye, Aniline blue, *Trabulsiella odontotermitis*, Degradation pathways

三苯甲烷类染料是继偶氮类和蒽醌类染料之后使用量排位第三的染料, 其中包括孔雀石绿、结晶紫、灿烂绿和苯胺蓝等, 它们被广泛应用于纺织印染、造纸、医药和生物染色等^[1]。许多研究结果表明此类染料在生产和使用过程中产生的有色废水不仅对环境造成污染, 而且能够在环境中积累和富集后通过食物链进入到生物体内, 从而对人和动物的生命健康构成巨大、潜在的威胁^[2-3]。因此, 如何利用环境友好型技术处理人工合成的有机染料废水, 已成为国内外研究者的关注热点之一。

染料废水的脱色降解方法主要有物理法、化学法和生物法, 其中生物法在处理过程中不会产生二次污染, 微生物能够将染料物质矿化成低毒或者无毒的小分子化合物, 因此, 生物法被认为是一种环境友好和高效低成本的方法^[4]。目前, 三苯甲烷类染料降解的研究主要集中于孔雀石绿和结晶紫, 而关于微生物降解苯胺蓝的报道较少。苯胺蓝作为一种典型的三苯甲烷类染料, 不仅具有稳定、复杂的化学结构, 而且还是此类染料中的高分子量化合物(分子结构见图 1), 在自然条件下极难被降解。三苯甲烷类染料分子的显色基团是碳氮键($-C=N-$)^[5], 微生物可以通过分泌特定的酶催化碳氮键断裂, 从而使其脱色降解为低毒或者无毒小分子化合物。相关研究表明与三苯甲烷类染料降解相关的酶有: 漆酶、锰过氧化物酶、木质素过氧化物酶、细胞色素 P450 单加氧酶、三苯基甲烷类染料还原酶 TMR 和染料脱色酶

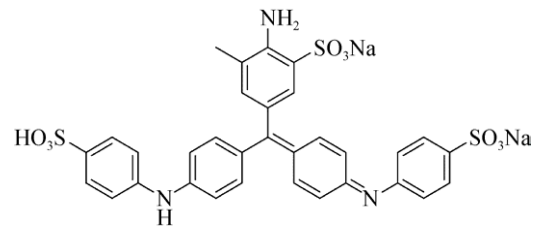


图 1 苯胺蓝化学结构

Figure 1 Structure of aniline blue

TpmD 等^[6]。真菌降解三苯甲烷类染料存在一定的劣势, 如生长速度慢、环境适应能力差和不易于基因操作等。因此, 生长速度快、环境适应性更强的细菌引起研究者的极大关注。

迄今为止, 已报道有关苯胺蓝脱色降解的细菌仅有 *Streptomyces* AG-56、*Shewanella oneidensis* MR-1、*Pseudomonas aeruginosa* WZR-B、*Acinetobacter* sp. EL1、*Providencia* sp. EL2 和 *Weeksella virosa* EL3 等^[7-10]。尽管上述细菌降解苯胺蓝表现出一定效果, 但细菌降解苯胺蓝可能的降解途径及分子机制尚不明确, 因此发掘高效、广谱的染料脱色菌种, 并进一步深入研究可能的降解途径以及参与其中的酶系等具有重要意义。

在以往报道中利用苯胺蓝筛选木质素降解菌^[11], 本课题组在白蚁肠道共生菌降解木质素的筛选过程中发现多种细菌对苯胺蓝具有高效脱色功能。在此基础上, 利用多种染料对细菌脱色能力进行检测, 筛选出具有广谱脱色能力的细菌后, 对其进行分子生物学鉴定、脱色条件和降解

产物分析, 并推测苯胺蓝的降解途径, 进一步丰富三苯甲烷类染料废水处理中所需菌种资源并完善苯胺蓝降解分子机理研究, 以期为提高该菌对三苯甲烷类染料的降解效果及实现工业化应用奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

2016年7月于云南省西双版纳州中国科学院西双版纳热带植物园次生雨林中采集木食性白蚁, 在被蚁蚀的腐木段中收集白蚁后, 将其放于事先底部有湿润滤纸的培养皿中带回实验室, 放置于避光的室温环境中培养待用。根据兵蚁形态特征及 CO II 基因序列鉴定为巴基斯坦小白蚁(*Microtermes pakistanicus*)。

1.1.2 主要试剂及仪器

苯胺蓝、亚甲基蓝、刚果红、苯酚红、孔雀石绿和天青 B, 国药集团化学试剂有限公司; 其余化学试剂均为国产分析纯; 细菌通用 PCR 引物、Ezup 柱式细菌基因组 DNA 提取试剂盒和 Taq DNA 聚合酶, 生工生物工程(上海)股份有限公司。电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; PCR 仪, 伯乐公司; 紫外可见分光光度计, 贝克曼库尔特有限公司; 傅立叶变换红外光谱仪, 赛默飞世尔科技公司; 气相色谱质谱联用仪(GC/MS), 安捷伦科技有限公司。

1.1.3 培养基

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, NaCl 10.0, pH 7.2, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

分离培养基(g/L): 胰蛋白胨 5.0, 酵母粉 2.5, NaCl 5.0, 琼脂 15.0, pH 7.2, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min, 待培养基温度降到 60 °C 以下, 加入 100 mg 经过 0.22 μ m 滤膜过滤灭菌的苯胺蓝。

复筛培养基(g/L): 胰蛋白胨 5.0, 酵母粉 2.5, NaCl 5.0, 琼脂 15.0, pH 7.2, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min 后, 待培养基温度降到 60 °C 以下, 分别加入一定量经 0.22 μ m 滤膜过滤灭菌的染料(亚甲基蓝、刚果

红、苯酚红或天青 B)。

液体脱色培养基(g/L): 胰蛋白胨 5.0, 酵母粉 2.5, NaCl 5.0, CaCl₂ 0.1, pH 7.2, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min 后, 加入 5 mL 经过 0.22 μ m 滤膜过滤灭菌的微量元素溶液, 再加入一定量过滤灭菌的染料(苯胺蓝、亚甲基蓝、天青 B、刚果红或孔雀石绿)。微量元素溶液(g/L): CuSO₄·5H₂O 0.1, ZnSO₄·7H₂O 0.12, MgSO₄·7H₂O 0.2, FeSO₄·7H₂O 0.16, MnSO₄·H₂O 0.08。

1.2 方法

1.2.1 样品处理及菌株的分离纯化

选取巴基斯坦小白蚁的工蚁在无菌水中清洗 2-3 次后, 用 75% 酒精对白蚁表面消毒, 然后在中性 PBS 缓冲液中漂洗。在无菌条件下, 将解剖的白蚁肠道置于无菌的 0.9% 生理盐水中, 然后用研磨棒将肠道研磨成匀浆状态。肠道匀浆液用无菌生理盐水经过一定梯度稀释后, 取稀释 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 倍的溶液各 100 μ L 涂布于固体分离培养基上, 将培养皿放置于 30 °C 的培养箱中培养 2-4 d。将具有明显脱色圈的单克隆转接至 LB 培养基中培养后, 再次用固体分离培养基进行划线分离、纯化细菌(重复 2-3 次划线), 直至得到单克隆。纯化后的单克隆进行培养后, 划线于复筛培养基平板上, 检测单克隆对其他类型染料的脱色能力; 挑取单菌落菌株继续分离纯化, 获得纯菌株后, 单独接种于不同类型染料(苯胺蓝、天青 B、亚甲基蓝、刚果红和苯酚红)固体培养基、液体苯胺蓝和孔雀石绿验证细菌是否具有广谱染料脱色能力。最终筛选到一株脱色圈较大且可使多种染料脱色的细菌, 然后对其进行分子生物学鉴定。

1.2.2 细菌 DNA 提取及鉴定

将单克隆接种于 LB 培养基中, 30 °C、180 r/min 培养过夜, 取 1 mL 培养液置于离心管中, 经 12 000 r/min 离心 2 min 后, 弃上清液, 收集菌体, 经无菌水漂洗后的菌体, 用细菌基因组试剂盒提取 DNA。细菌 16S rRNA 基因扩增通用引物为 27F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3')和

1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), PCR 反应体系及条件参考文献[12]。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 委托生工生物工程(上海)股份有限公司对细菌序列进行双向测序。将测序完成的 16S rRNA 基因序列拼接后, 提交至 NCBI 网站的 GenBank 数据库, 并进行 BLASTn (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) 相似性比对。下载 BLAST 比对序列相似性较高的菌株序列, 利用 MEGA 5.05 软件计算序列相似度, 同时用邻接法 (neighbor-joining method) 构建菌株系统发育树, 确定物种的系统发育地位。

1.2.3 不同培养条件对染料脱色率的影响

将菌株 MP-13 接种于 LB 培养基中, 在 30 °C、180 r/min 条件下培养 12 h, 收集一定体积培养液在 12 000 r/min 离心 2 min, 弃上清液, 用无菌液体脱色培养基重悬后作为种子液。以 5% 接种量研究在不同温度(20、25、30、35 和 40 °C)、pH (5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0)、转速(100、130、150、180、和 220 r/min)条件下培养 36 h 后, 细菌对浓度为 200 mg/L 苯胺蓝溶液脱色效果的影响。同时, 考察菌株 MP-13 在接种量为 5%、30 °C 和 180 r/min 条件下培养 36 h 后, 不同初始浓度(300、500、800、1 000 和 1 500 mg/L)对苯胺蓝溶液脱色效果的影响。

1.2.4 染料脱色率测定

液体脱色培养基接菌培养一段时间后, 无菌条件下吸取 2 mL 培养液, 经 12 000 r/min 离心 2 min, 取上清液, 采用分光光度法在 600 nm (苯胺蓝可见光的最大吸收峰)处测定吸光度, 根据公式(1)计算脱色率:

$$\eta (\%) = (A_0 - A_i) / A_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中 A_0 表示液体脱色培养基不接细菌初始吸光度, A_i 表示脱色培养基接种细菌经过一段时间脱色后的溶液吸光度。

1.2.5 紫外/可见吸收光谱分析

取浓度为 100 mg/L 苯胺蓝溶液和降解 24 h 离心后的上清液, 用紫外可见分光光度计在波长 190–900 nm 范围内进行扫描。

1.2.6 FTIR 分析

苯胺蓝降解前后的 FTIR 分析方法参考文献[13], 具体步骤为: 以浓度为 300 mg/L 苯胺蓝脱色培养基为考察对象, 分别取未经细菌处理和经细菌降解 36 h 后的溶液各 100 mL, 然后经过 0.45 μm 孔径滤头过滤, 过滤液经冷冻干燥成粉末, 与 KBr 按照一定比例(质量比 1:100)混匀研磨后, 压片, 进行红外光谱扫描, 波数 4 000–400 cm^{-1} 。

1.2.7 GC/MS 分析

苯胺蓝降解产物提取步骤及分析方法参考文献[13], 具体步骤为: 取浓度为 300 mg/L 苯胺蓝脱色培养基和经过 36 h 细菌脱色降解的培养基上清液, 用等体积乙酸乙酯萃取后, 取上层有机相备用, 下层水相溶液经上述操作重复 2 次后, 合并 3 次萃取液, 加入无水亚硫酸钠干燥后, 经旋转蒸发有机相至结晶, 然后用色谱纯甲醇溶解结晶物, 再经 0.22 μm 滤膜过滤后, 利用 GC/MS 测定苯胺蓝降解后中间产物, 色谱柱为 HP-5MS (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm), 载气为 He, 气体流速为 1 mL/min, 进样体积为 1 μL ; 升温程序: 初始温度 50 °C, 保持 5 min, 以 10 °C/min 速度升温至 280 °C, 保持 10 min; 进样口温度 280 °C, 离子源温度 250 °C, 在电子轰击(EI)模式 70 eV 条件下, 质谱扫描范围 30–800 (m/z)。

2 结果与分析

2.1 苯胺蓝降解细菌的筛选与鉴定

2.1.1 苯胺蓝脱色菌筛选

采用平板划线法从分离固体培养基上发现多株具有明显脱色圈的细菌, 其中一株编号为 MP-13 的细菌可以使多种类型染料脱色, 结果如图 2 所示。从图 2 中可知, 菌株 MP-13 在不同染料固体培养基中培养 24–48 h 后可以产生明显脱色圈, 说明此菌株可以分泌胞外酶使除苯胺蓝以外的染料脱色, 初步推断菌株 MP-13 具有广谱染料脱色性能。从液体染料脱色情况来看, 经菌株 MP-13 降解后的苯胺蓝和孔雀石绿的颜色基本消失, 而对照组染料颜色基

本没有变化,说明此菌对苯胺蓝和孔雀石绿具有较强的脱色能力。此外,从离心后的菌体沉淀来看,苯胺蓝溶液底部菌体呈乳白色,说明此菌对苯胺蓝的脱色主要依靠胞外酶;而孔雀石绿溶液底部呈淡绿色,说明此菌对孔雀石绿的脱色能力除靠分泌胞外酶外,还有自身菌体对染料的吸附作用。

2.1.2 苯胺脱色菌的 16S rRNA 基因序列分析

基于 16S rRNA 基因序列分析的结果,确定菌株 MP-13 的分类地位。将双向测序获得菌株 MP-13 的 16S rRNA 基因序列,经 DNAMAN 序列拼接后

(1 445 bp)提交至 GenBank 数据库,序列登录号为 MF455199,同时在 NCBI 数据库中进行序列相似性比对,选取 BLAST 中相似度较高的 7 株细菌序列,并下载相关序列后,利用 MEGA 5.05 计算细菌序列相似度,同时利用其中的邻接法(neighbor-joining method)构建细菌系统发育树(图 3)。如图 3 所示,菌株 MP-13 与 *Trabulsiella odontotermitis* strain zjsru-4 在同一个分支上,序列相似性为 99.03%,因此将该菌株命名为 *Trabulsiella odontotermitis* MP-13。

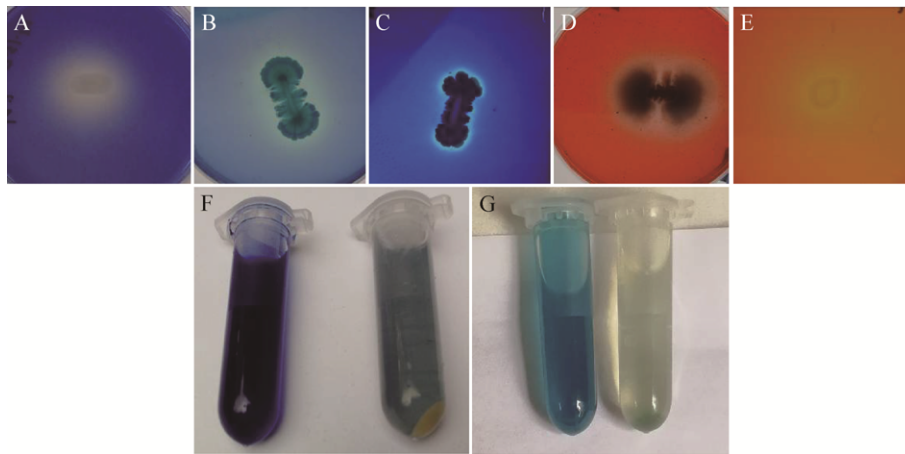


图 2 菌株 MP-13 在苯胺蓝(A)、天青 B (B)、亚甲基蓝(C)、刚果红(D)、苯酚红(E)、液体苯胺蓝(F)和孔雀石绿(G)培养基中生长时产生脱色

Figure 2 The decolorization of aniline blue (A, F), azure B (B), methylene blue (C), congo red (D), phenol red (E) and malachite green (G) by strain MP-13 cultured on the medium

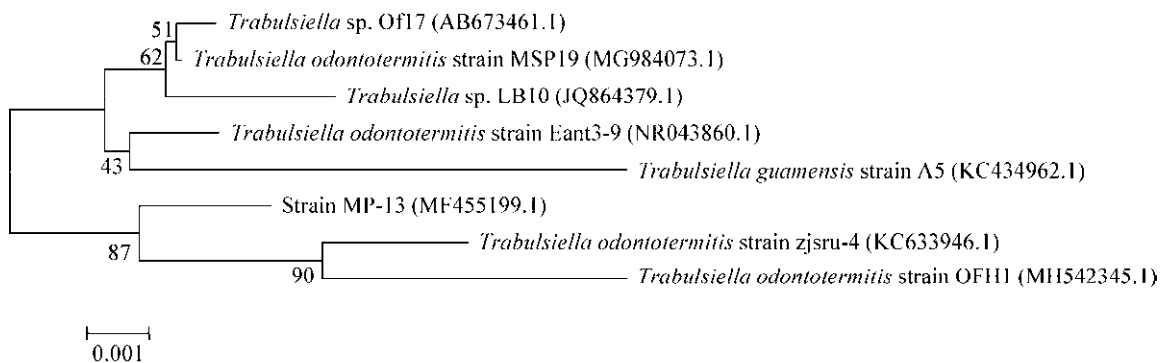


图 3 菌株 MP-13 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Figure 3 Phylogenetics tree based on 16S rRNA gene sequence of strain MP-13

注: 括号中序号: 菌株登录号; 分支点上的数字: Bootstrap 支持率; 标尺刻度 0.001: 序列差异的分支长度。

Note: Numbers in parentheses: the sequence accession number; Numbers in each branch points: the percentages supported by bootstrap; Bar=0.001: nucleotide divergence.

2.2 紫外/可见吸收光谱分析

紫外/可见吸收光谱分析表明细菌降解后苯胺蓝的显色基团($-C=N-$)被破坏,导致苯胺蓝溶液颜色发生变化。由图 4 中可知,苯胺蓝在 196、312 和 600 nm 处具有明显吸收峰,这与文献[7]报道的基本一致,600 nm 处吸收峰是苯胺蓝的显色基团。然而,经过 24 h 细菌降解后的苯胺蓝溶液,在 600 nm 处的吸收峰完全消失,并且 312 nm 处吸收峰强度降低,而 196 nm 处吸光度显著增强。已有研究表明,如果染料脱色依靠菌体吸附脱色,那么 3 个吸收峰应该成比例降低^[14],由此可以证明菌株 MP-13 主要通过分泌胞外酶破坏显色官能团($-C=N-$)和其他类型化学键,从而导致苯胺蓝脱色降解。

2.3 菌株 MP-13 对苯胺蓝的降解特性

细菌对苯胺蓝的脱色效果受多种生长条件影响,如培养温度、初始 pH、转速和底物浓度等。培养基初始 pH 对细菌生长及代谢能力起着至关重要的作用,因此考察了培养基初始 pH 对菌株 MP-13 脱色苯胺蓝的影响。由图 5A 可知,该菌的环境适应能力较强,即在广泛的 pH 5.0–9.0 环境下可以使苯胺蓝脱色。当 pH 为 7.0 或 8.0 时,苯胺蓝脱色率分别达到 90.3% 和 96%;当 pH 降低或者增加时,苯胺蓝脱色率明显降低,其中 pH 为 5.0 时脱色率降到 41.7%,而 pH 为 9.0 时脱色率可以达

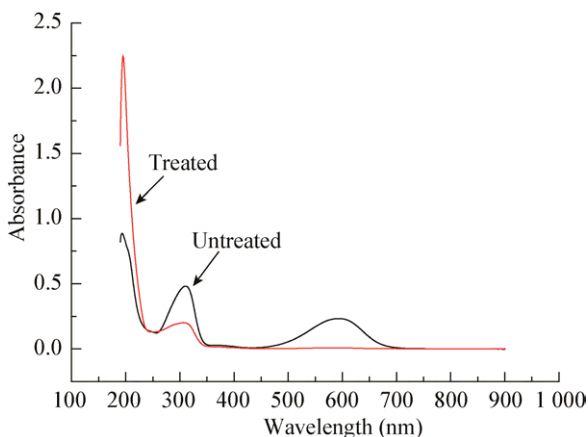


图 4 脱色前后苯胺蓝的紫外/可见吸收光谱
Figure 4 UV/vis absorption spectra of aniline blue before and after decolorization

到 83.6%。脱色率降低可能与细菌分泌的酶活力有关,有研究表明三苯甲烷类还原酶在 pH 9.0 时具有较高酶活力^[15]。过碱或过酸的环境都会使细菌脱色效率降低,该菌在偏碱环境下(pH 8.0)脱色率最高,因此在处理偏碱染料废水时具有广泛的应用前景。

培养温度影响细菌生长及其所分泌胞外酶活力,从而导致苯胺蓝的脱色效率有较大差异。由图 5B 可知,在温度为 20–40 °C 的范围内,苯胺蓝脱色率都大于 60%;当温度为 35 °C 时,菌株 MP-13 对苯胺蓝的脱色效率达到最佳(94.3%);当温度为 20 °C 时,苯胺蓝脱色效率最低(66%);当温度达到 40 °C 时,脱色率也可达到 81%。由此表明,温度对细菌胞内外酶活性和酶促反应影响较大,进而影响苯胺蓝脱色效率^[16]。

溶氧量是影响降解有机物速率的主要因素之一。由图 5C 可知,随着摇床转速的增加,脱色率也随着增加。相关研究表明三苯甲烷类染料脱色降解过程中,可能要依赖 NADH/NADPH 加氧酶,适当增加废水中溶氧量可能促进染料脱色降解效率^[17]。当摇床转速为 180 r/min 时,菌株 MP-13 对苯胺蓝的脱色率达到最大值 97.3%;而当转速增加到 220 r/min 时,苯胺蓝脱色率降低到 92.6%,这可能是由于转速达到一定值时,培养基中的溶氧基本饱和,继续增大转速反而可能造成菌体损伤,从而造成脱色率降低。因此菌株 MP-13 脱色降解苯胺蓝的最佳转速为 180 r/min。

苯胺蓝初始浓度是影响菌株 MP-13 脱色效果的重要因素。由图 5D 可知,随着苯胺蓝浓度的增加(浓度从 300 mg/L 上升到 1 500 mg/L),脱色率呈现降低趋势。在中高浓度 300 mg/L 时,脱色率可达最高 96.5%;继续增加苯胺蓝浓度到 500、800 和 1 000 mg/L 时,脱色率分别为 93.5%、88.6% 和 77.2%;而当浓度达到 1 500 mg/L 时,脱色率明显降低,但仍达到 63.2%。由此可以说明苯胺蓝浓度增加后,溶液中毒性随着增大,抑制菌体生长,从而导致脱色率降低。

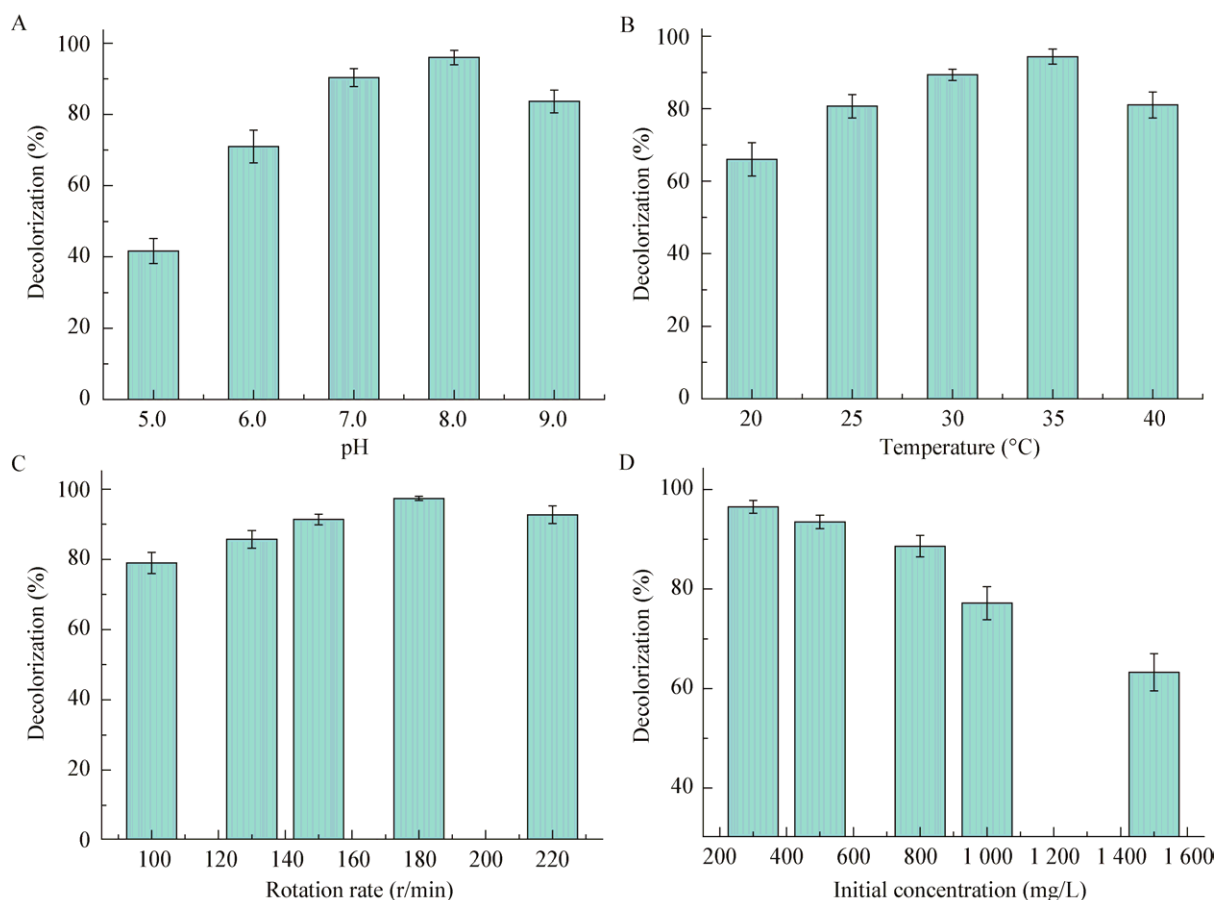


图 5 不同因素对苯胺蓝脱色率的影响

Figure 5 Effect of different environment parameters on decolorization of aniline blue dye

注: A: pH; B: 温度; C: 转速; D: 初始浓度.

Note: A: pH; B: Temperature; C: Rotation rate; D: Initial concentration.

2.4 FTIR 分析

红外光谱图可以直观反映苯胺蓝降解前后的化学官能团变化情况, 从而推断苯胺蓝分子结构中可能断裂的化学键类型。由图 6 可知, 降解前苯胺蓝中存在三苯甲烷类染料的 3 个特征吸收峰 (1574 、 1367 和 1169 cm^{-1}), 并且苯胺蓝降解前后 FTIR 图谱在指纹区 ($1700\text{--}500\text{ cm}^{-1}$) 的吸收峰强度及吸收峰数量发生明显变化, 比如: 降解后光谱图中消失了 1496 、 1367 、 913 和 731 cm^{-1} 等处的吸收峰, 并有新吸收峰出现在 1660 、 1449 和 1401 cm^{-1} 处。经检索得知, 在 1574 cm^{-1} 处的吸收峰归因于苯环上的 C-H 伸缩; 在 1496 cm^{-1} 处的吸收峰归因于染料结构存在自由 N-H 基团, 降解

产物中消失表明苯胺蓝支链断裂; 在 1367 cm^{-1} 处的吸收峰归因于 C-H 伸缩振动; 在 1169 cm^{-1} 处的吸收峰是由芳香化合物 C-N 伸缩振动引起; 在 1122 cm^{-1} 处的吸收峰归因于 C-OH 伸缩弯曲; 在 1035 cm^{-1} 处的吸收峰是 C-O 伸缩引起的; 在 900 cm^{-1} 以下吸收峰都归属于芳香族化合物或苯环, 其中在降解产物中 731 、 652 和 593 cm^{-1} 处的吸收峰消失, 同时在 619 cm^{-1} 和 519 cm^{-1} 处出现新吸收峰, 表明芳香化合物结构因降解发生化学键断裂。降解产物中新出现的 1660 cm^{-1} 吸收峰归属于芳基酮的 C=O 伸缩振动, 表明芳香化合物在降解过程中被羰基化, 这一结果与 GC/MS 分析降解产物中发现芳香酮类化合物一致。在 1449 cm^{-1} 和

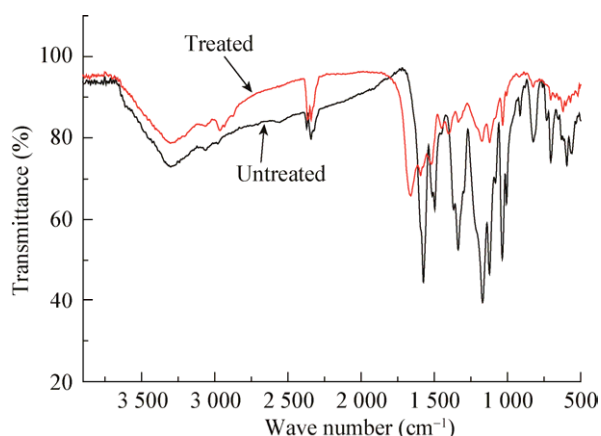


图6 苯胺蓝脱色前后的 FTIR 图谱

Figure 6 FTIR spectra of aniline blue before and after decolorization

1400 cm^{-1} 处的吸收峰, 分别归因于芳香基团和 C=C 伸缩引起的, 表明降解产物中还有苯环类结构存在。综上所述, 可以推断降解产物中存在 C=O、-OH、-NH₂ 基团及苯环结构, 并由 GC/MS 进行了验证, 本研究结果也与以往微生物降解三苯甲烷类染料的报道^[18-22]基本一致。

2.5 GC/MS 分析苯胺蓝降解产物及推断其降解途径

通过 GC/MS 定性分析降解过程的中间代谢产物, 初步明确了菌株 MP-13 对苯胺蓝的主要代谢

特征与途径(结果见表 1 和图 7)。经细菌处理 12 h 的苯胺蓝溶液可以鉴定到 5 个新物质, 保留时间分别为 7.265、20.265、21.805、23.090 和 24.460 min, 经过与 NIST library 中标准物质图谱比对, 证实 5 种新物质分别为: 2-苯乙醇、2-羟基-3,5,5-三甲基-2-环己烯-1-酮、2,2'-亚甲基双(6-叔丁基对甲酚)、4,4'-二氨基二苯甲酮和 2,4,6-三羟基苯甲醛。延长细菌降解时间到 36 h 时, 共检测到 10 种物质, 除上述 5 种外, 其他 5 种物质分别为异戊酸(3.310 min)、乙苯(3.725 min)、间二甲苯(3.815 min)、2'-氨基苯乙酮(10.025 min)和 2-(4-羟苯基)乙醇(11.580 min)。其中 4,4'-二氨基二苯甲酮也在其他已报道三苯甲烷类染料(孔雀石绿、结晶紫和棉蓝)^[13,21-22]中发现, 由此可以证明 4,4'-二氨基二苯甲酮是三苯甲烷类染料的主要降解中间产物, 对苯胺蓝进一步降解起主要作用。

根据鉴定到的代谢产物并结合已报道的三苯甲烷类染料文献^[13,21-22], 推测菌株 MP-13 降解苯胺蓝可能的降解途径(图 7)。首先, 苯胺蓝在特定酶的作用下, 使显色基团碳氮键断裂, 并伴随侧链断裂生成三苯甲烷为骨架的无色物质和芳香族化合物; 随后, 三苯甲烷类似物的中心碳原子发生羟基化反应并伴随碳碳键断裂^[14], 被羟基化的物质进

表 1 苯胺蓝降解产物的 GC/MS 鉴定结果

Table 1 Identification of metabolites of aniline blue by GC/MS analysis

序号 No.	保留时间 Retention time	化学名称 Chemical name	分子式 Molecular formula	分子量 Molecular weight	12 h 36 h	
1	3.310	3-methyl-butanoic acid	C ₅ H ₁₀ O ₂	102	-	+
2	3.725	Ethylbenzene	C ₈ H ₁₀	106	-	+
3	3.815	1,3-dimethyl-benzene	C ₈ H ₁₀	106	-	+
4	7.265	Phenylethyl alcohol	C ₈ H ₁₀ O	122	+	+
5	10.025	1-(2-aminophenyl)-Ethanone	C ₈ H ₉ NO	135	-	+
6	11.580	4-hydroxy-benzeneethanol	C ₈ H ₁₀ O ₂	138	-	+
7	20.265	2-hydroxy-3,5,5-trimethyl-cyclohex-2-enone	C ₉ H ₁₄ O ₂	154	+	+
8	21.805	2,2'-methylenebis [6-(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-phenol]	C ₂₃ H ₃₂ O ₂	340	+	+
9	23.090	4,4'-diaminobenzophenone	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O	212	+	+
10	24.460	2,4,6-trihydroxybenzaldehyde	C ₇ H ₆ O ₄	154	+	+

注: +: 检测到; -: 未检测到。

Note: +: Detected; -: Not detected.

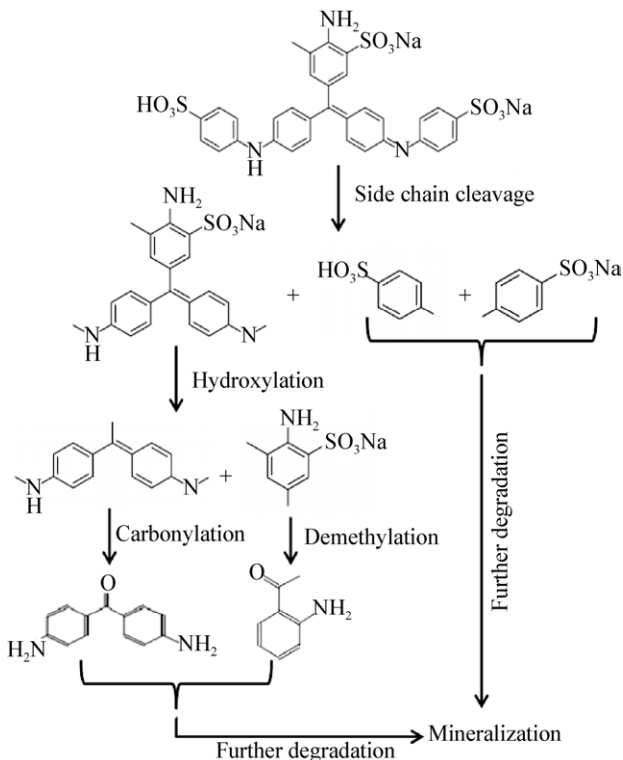


图7 基于GC/MS结果推断菌株MP13对苯胺蓝的降解途径

Figure 7 The proposed biodegradation pathways of aniline blue by strain MP-13 based on the results of GC/MS

一步发生羰基化反应生成4,4'-二氨基二苯甲酮, 而由碳碳键断裂生成物质经过去甲基反应生成2'-氨基苯乙酮; 最终这些物质经过一系列酶催化, 开环最终完全被矿化成二氧化碳和水。综上所述, 可知菌株MP-13降解苯胺蓝代谢途径与已报道的细菌降解孔雀石绿、结晶紫和棉蓝存在相似之处。

3 讨论与结论

Trabulsiella 是一类广泛存在于自然环境中的革兰氏阴性细菌, 具备降解多种类型有机污染物的能力。本研究从高等白蚁肠道筛选分离得到一株对苯胺蓝具有高效脱色降解能力的菌株MP-13, 经过16S rRNA基因序列和系统发育分析, 初步鉴定为土白蚁特拉布尔希氏菌(*Trabulsiella odontotermis*)。土白蚁特拉布尔希氏菌是由Chou等首次从白蚁肠道中分离得到^[23], 目前关于此菌

的报道也都是分离于白蚁肠道, 并且该菌对芳香族化合物的降解性能还不清楚, 仅在降解黄曲霉毒素B1领域有所报道^[24]。迄今为止, 尚未见到该菌在降解染料类有机化合物方面的报道, 然而本研究发现菌株MP-13具有多种类型染料的脱色能力, 并且根据报道该种菌的基因组中含有可降解双苯酚和二噁英等难降解物质的相关酶基因序列^[24]。因此, 进一步探索该菌对苯胺蓝降解特征及代谢途径, 为将来该种菌株应用到染料废水治理中奠定基础。

菌株MP-13对三苯甲烷类的有机污染物具有广谱性、较高浓度耐受力 and 降解能力, 表现出了潜在的产业化应用价值。与其他细菌相比, 该菌可在较宽的pH(5.0–9.0)和温度(20–40 °C)范围内, 表现出对苯胺蓝较好的脱色降解能力; 其中在温度为35 °C、pH 8.0和转速180 r/min的培养条件下, 该菌对200 mg/L苯胺蓝的最大脱色率可达97.3%。此外, 浓度为300–1 500 mg/L的苯胺蓝溶液对菌株MP-13的生长及脱色能力没有产生较大的影响, 即使染料浓度达到1 500 mg/L时, 该菌对苯胺蓝脱色率也可达到63%以上, 如果延长培养时间脱色率会达到更高数值。在实际环境中, 印染行业废水中染料可能是多种类型共存, 而菌株MP-13对亚甲基蓝、天青B、刚果红、苯酚红和孔雀石绿也具有脱色潜力, 表现出了一定广谱的底物利用能力。其次, 染料废水的酸碱性直接影响细菌的代谢能力, 从不同pH对菌株MP-13降解苯胺蓝的降解评价可知, 偏碱性环境条件下, 该菌对苯胺蓝的降解能力明显优于偏酸环境, 这可能是由于苯胺蓝降解相关酶的适宜pH为碱性环境。

菌株MP-13降解苯胺蓝的中间产物分析表明, 中心碳原子羟基化是三苯甲烷类染料降解的关键步骤。通过GC/MS分析苯胺蓝降解中间产物, 发现了主要降解产物4,4'-二氨基二苯甲酮和2'-氨基苯乙酮等芳香族化合物, 由此可推断苯胺蓝降解是经过一系列氧化还原反应, 如: 侧链断裂、羟

基化反应、羰基化反应、去甲基化反应和芳香族化合物开环等。以上实验结果与 *Aspergillus flavus* 降解孔雀石绿^[25]和 *Rhodococcus qingshengii* JB301^[1] 降解结晶紫的代谢途径具有相似性,但因苯胺蓝的特殊化学结构又存在一定差异,如存在侧链 C-N 键断裂。

综上所述, *Trabulsiella odontotermis* MP-13 可高效降解苯胺蓝,且具有潜在的多种染料脱色降解能力,但该菌对三苯甲烷类染料降解转化过程中的关键酶、降解产物有无毒性和原位降解效果有待进一步深入研究和探讨。

REFERENCES

- [1] Li GH, Peng L, Ding ZY, et al. Decolorization and biodegradation of triphenylmethane dyes by a novel *Rhodococcus qingshengii* JB301 isolated from sawdust[J]. *Annals of Microbiology*, 2014, 64(4): 1575-1586
- [2] Chen SH, Ting ASY. Biodecolorization and biodegradation potential of recalcitrant triphenylmethane dyes by *Corioloopsis* sp. isolated from compost[J]. *Journal of Environmental Management*, 2015, 150: 274-280
- [3] Khataee AR, Dehghan G, Zarei M, et al. Neural network modeling of biotreatment of triphenylmethane dye solution by a green macroalgae[J]. *Chemical Engineering Research and Design*, 2011, 89(2): 172-178
- [4] Yang XT, Zheng JZ, Lu YM, et al. Degradation and detoxification of the triphenylmethane dye malachite green catalyzed by crude manganese peroxidase from *Irpex lacteus* F17[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(10): 9585-9597
- [5] Zhang RJ, Li HX, Zhang JH, et al. On the technical condition and the mechanism of the aniline blue decolorization under the impact of the laccase/HOBT mediator system[J]. *Journal of Safety and Environment*, 2015, 15(6): 233-238 (in Chinese)
张瑞景, 李慧星, 张建华, 等. 漆酶/HOBT 体系对苯胺蓝的脱色条件及机理研究[J]. *安全与环境学报*, 2015, 15(6): 233-238
- [6] Song JL, Mu YC, Ruan ZY, et al. Research advances on metabolic pathways and mechanisms of biodegradation of triphenylmethane dyes[J]. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2017, 7(6): 10-16 (in Chinese)
宋金龙, 穆迎春, 阮志勇, 等. 微生物降解三苯甲烷类染料的研究进展[J]. *中国渔业质量与标准*, 2017, 7(6): 10-16
- [7] Ma YH, Li LJ, Lu MH, et al. Isolation of aniline blue-discoloring *Actinomyces* and its decolorization characteristics[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2016, 36(12): 4361-4366 (in Chinese)
马英辉, 李利军, 卢美欢, 等. 苯胺蓝脱色放线菌的分离及脱除特性研究[J]. *环境科学学报*, 2016, 36(12): 4361-4366
- [8] Wu YM, Xiao X, Xu CC, et al. Decolorization and detoxification of a sulfonated triphenylmethane dye aniline blue by *Shewanella oneidensis* MR-1 under anaerobic conditions[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(16): 7439-7446
- [9] Wu C, Wang H, Zheng TL, et al. Isolation and characterization of aniline blue-degrading bacteria[J]. *Journal of Huaqiao University (Natural Science)*, 2008, 29(1): 38-41 (in Chinese)
吴楚, 王慧, 郑天凌, 等. 一株苯胺蓝降解菌的分离鉴定及其降解特性[J]. *华侨大学学报: 自然科学版*, 2008, 29(1): 38-41
- [10] Shao NN, Zhang C, Gu QY, et al. Research on decolorization of aniline blue by bacteria group EL[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2014, 37(1): 133-137 (in Chinese)
邵娜娜, 张充, 顾青莹, 等. 菌群 EL 对苯胺蓝的脱色研究[J]. *南京农业大学学报*, 2014, 37(1): 133-137
- [11] Yang CX, Wang T, Gao LN, et al. Isolation, identification and characterization of lignin-degrading bacteria from Qinling, China[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2017, 123(6): 1447-1460
- [12] Sun XX, Li JJ, Ning N, et al. Isolation and identification of chitin-degrading bacteria from the hindgut of *Macrotermes barneyi*[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(7): 1649-1654 (in Chinese)
孙新新, 李净净, 宁娜, 等. 黄翅大白蚁后肠几丁质降解微生物的分离与鉴定[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(7): 1649-1654
- [13] Bharagava RN, Mani S, Mulla SI, et al. Degradation and decolorization potential of an ligninolytic enzyme producing *Aeromonas hydrophila* for crystal violet dye and its phytotoxicity evaluation[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 156: 166-175
- [14] Wu Y, Chen M, Liu J, et al. Biodecolorization and biodegradation of malachite green by *Pleurotus eryngii* and degradation products analysis[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2016, 36(8): 2844-2851 (in Chinese)
吴茵, 陈敏, 刘洁, 等. 刺芹侧耳对孔雀石绿的脱色降解及其产物分析[J]. *环境科学学报*, 2016, 36(8): 2844-2851
- [15] Jang MS, Lee YM, Kim CH, et al. Triphenylmethane reductase from *Citrobacter* sp. strain KCTC 18061P: purification, characterization, gene cloning, and overexpression of a functional protein in *Escherichia coli*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(12): 7955-7960
- [16] Zhao NN, Xu JF, Song XX, et al. Screening and phenol-degrading characteristics of a highly efficient

- phenol-degrading halophilic bacterial strain *Halomonas* sp. H17[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2019, 39(2): 318-324 (in Chinese)
- 赵娜娜, 许继飞, 宋晓雪, 等. 嗜盐高效降酚菌株 *Halomonas* sp. H17 的筛选及降解苯酚特性[J]. *环境科学学报*, 2019, 39(2): 318-324
- [17] Ren SZ, Guo J, Zeng GQ, et al. Decolorization of triphenylmethane, azo, and anthraquinone dyes by a newly isolated *Aeromonas hydrophila* strain[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 72(6): 1316-1321
- [18] Deivasigamani C, Das N. Biodegradation of Basic Violet 3 by *Candida krusei* isolated from textile wastewater[J]. *Biodegradation*, 2011, 22(6): 1169-1180
- [19] Chaturvedi V, Bhange K, Bhatt R, et al. Biodegradation of high amounts of malachite green by a multifunctional strain of *Pseudomonas mendocina* and its ability to metabolize dye adsorbed chicken feathers[J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2013, 1(4): 1205-1213
- [20] Ayed L, Chaieb K, Cheref A, et al. Biodegradation of triphenylmethane dye Malachite Green by *Sphingomonas paucimobilis*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 25(4): 705-711
- [21] Shang NJ, Ding MJ, Dai MX, et al. Biodegradation of malachite green by an endophytic bacterium *Klebsiella aerogenes* S27 involving a novel oxidoreductase[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(5): 2141-2153
- [22] Shedbalkar U, Dhanve R, Jadhav J. Biodegradation of triphenylmethane dye cotton blue by *Penicillium ochrochloron* MTCC 517[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 157(2/3): 472-479
- [23] Chou JH, Chen WM, Arun AB, et al. *Trabulsiella odontotermitis* sp. nov., isolated from the gut of the termite *Odontotermes formosanus* Shiraki[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(4): 696-700
- [24] Sapountzis P, Gruntjes T, Otani S, et al. The enterobacterium *Trabulsiella odontotermitis* presents novel adaptations related to its association with fungus-growing termites[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(19): 6577-6588
- [25] Barapatre A, Aadil KR, Jha H. Biodegradation of malachite green by the ligninolytic fungus *Aspergillus flavus*[J]. *CLEAN-Soil, Air, Water*, 2017, 45(4): 1600045



编辑部公告

邀请您关注《微生物学通报》公众微信号

为了更好地与读者、作者、审稿专家和编委朋友们及时沟通、方便服务,《微生物学通报》已开通公众微信服务号。作者通过微信能及时收到稿件各流程通知,第一时间了解稿件进程并及时处理;审稿专家和编委可通过微信及时收到审稿邀请,还可通过手机审稿;读者通过微信可了解《微生物学通报》文章目录,查找阅读感兴趣的文章。

关注办法:

- 1、在微信公众号搜索“微生物学通报”或“wswxtb”;
- 2、用微信扫右边二维码:

