



嗜盐菌群对酸性金黄 G 的脱色特性和机理

谢静¹, 郭光^{1*}, 田芳¹, 周思懿¹, 丁克强¹, 杨凤¹, 周旺¹, 刘翀^{2*}

¹南京工程学院环境工程学院, 江苏 南京 211167

²中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所, 北京 100081

摘要:【目的】为了获得能够在高盐环境下脱色偶氮染料的嗜盐菌群及其降解机理。【方法】采用富集驯化的方法获得一个嗜盐菌群, 采用 Illumina HiSeq2500 测序平台对其群落结构进行测定; 采用分光光度法测定了其降解特性; 采用 GC-MS 和红外图谱分析了其降解机理; 采用微核实验的方法比较了偶氮染料降解前后的毒性。【结果】该菌群在 10% 的盐度下, 使 100 mg/L 的酸性金黄 G 在 8 h 内脱色。菌群主要由 *Zobellella*、*Rheinheimera*、*Exiguobacterium* 和 *Marinobacterium* 组成。最适宜的脱色条件是: pH=6, 酵母粉为碳源, 蛋白胨或硝酸钾作为氮源, 盐度为 1%–10%。酸性金黄 G 降解产物的毒性比降解前降低。酸性金黄 G 主要的降解产物是对氨基二苯胺和二苯胺。此外, 该菌群还能使酸性大红 GR 和直接湖蓝 5B 等多种偶氮染料脱色, 具有较好的脱色广谱性。【结论】获得了快速降解偶氮染料的嗜盐菌群及降解机理, 为该嗜盐菌群应用于高盐印染废水的处理提供菌种资源和理论支持。

关键词: 偶氮染料, 酸性金黄 G, 嗜盐菌群, 脱色

随着印染技术的发展, 人工合成染料被广泛应用于各行各业。据统计, 我国每年约有 6×10^8 – 7×10^8 t 印染废水排入环境中, 占工业废水总排放量的 1/10。除排放量大以外, 印染废水还具有以下特点: 有机物含量高, 色度深, 组成成分复杂, 化学需氧量(COD_{Cr})高, 而生化需氧量(BOD₅)相对较低。在各种合成染料中, 偶氮染料应用最为广泛, 占有有机染料总量的 80%^[1]。由于

其自身结构, 偶氮染料的脱色产物具有致癌、致畸、致突变和难以生物降解的特点^[2]。酸性金黄 G 属于偶氮染料, 因其色泽鲜艳、着色稳定和成本低等特点被广泛使用。

印染废水的处理技术有物理法、化学法和生物法。物理和化学法费用较高, 且易产生二次污染。相比较而言, 生物法具有成本低、能耗低、环境友好等优点, 被广泛应用于印染废水

基金项目: 国家自然科学基金(31600091, 51608257); 中国科学院饮用水科学与技术重点实验室开放基金(17K01KLDWST); 环境模拟与污染控制国家重点联合实验室开放基金(18K01ESPCT)

*通信作者。Tel: +86-10-62736913; E-mail: guo Guang007007@163.com

收稿日期: 2018-06-15; 修回日期: 2018-09-02; 网络出版日期: 2018-09-12

处理中^[3]。偶氮染料分子的发色基团是偶氮键，微生物通过断裂偶氮键使偶氮染料脱色。通常情况下，微生物通过合成特定的酶类(偶氮还原酶和漆酶等)将偶氮键断裂，形成苯胺等^[4]。由于微生物对环境条件的要求较高，不同菌株的降解条件和底物范围不同，因此筛选高效的降解菌株或菌群尤为重要。

由于在印染过程会加入无机盐(NaNO_3 、 Na_2SO_4 、 NaCl 和 NaOH 等)以及为了提高染料 pH 而添加 NaOH ，导致印染废水含盐量较高，有些甚至可达 15%–20%。高盐限制了非嗜盐微生物对偶氮染料的降解，而耐(嗜)盐微生物可在不经稀释的条件下降解染料^[5]。目前，主要的研究方向就是筛选分离出高效降解染料的菌株^[6]或是驯化出高效降解染料的菌群^[5]。但在实际条件下，菌群比单一的菌株能够更好地适应复杂的废水环境并能将染料彻底降解^[7]。嗜盐菌群 VN.1 能够在 7% 盐度下脱色偶氮染料活性蓝 220^[7]。本课题组曾富集的嗜盐菌群，在 10% 盐度下使 100 mg/L 的酸性大红 GR 在 12 h 内完全脱色，证明混合菌群对偶氮染料的脱色效果很好^[8]。因此，驯化出能够高效降解偶氮染料的混合菌群并研究其降解机理具有巨大的理论价值和广阔应用前景。

基于此，本实验在 10% 盐度下，富集了能高效使酸性金黄 G 脱色的嗜盐菌群，并对其群落结构、脱色条件、降解产物和产物毒性进行研究，为印染废水的生物强化处理提供菌种资源和实验依据。

1 材料和方法

1.1 培养基和菌群的富集方法

10% 盐度培养基(g/L)^[9]: Na_2SO_4 0.5; NH_4Cl 0.3; CaCl_2 0.1; KH_2PO_4 0.2; KCl 0.5; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

12; NaCl 80.0, 酵母粉 1.0, pH 7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

模拟印染废水: 10% 盐度培养基加入酸性金黄 G。

嗜盐菌群: 从江苏某印染废水的剩余活性污泥中取 10 mL 到 100 mL 的 10% 盐度培养基(含有 100 mg/L 的酸性金黄 G)中，待脱色率达到 80%，取 10 mL 的悬浊液加入到新鲜的 100 mL 的 10% 盐度培养基(含有 100 mg/L 的酸性金黄 G)中，如此循环 8 代，富集培养结束。

1.2 菌群的群落结构分析

采用试剂盒提取微生物基因组 DNA(Fast DNA Spin Kit)。高通量测序通过 Illumina Miseq PE250 测序仪测序(上海美吉生物医药科技有限公司)，数据序列经过筛选和拼接，通过 OTU 分析和聚类分析^[10]，最后用 Silva 数据库(<http://www.arb-silva.de/>)对代表序列进行注释。基因序列已经上传到 NCBI 数据库(SRP154345)。

1.3 菌群降解酸性金黄 G 的影响因素

将菌群置入 10% 盐度培养基(含有 100 mg/L 的酸性金黄 G)中培养，8 h 后可将菌液接种(接菌量按体积比为 10%)到不同碳源、氮源、盐度、pH 和酸性金黄 G 浓度的新鲜 10% 盐度培养基(染料浓度为 100 mg/L)中。碳源和氮源分别替换 10% 盐度培养基中的酵母粉和 NH_4Cl 。

1.4 菌株对其他染料的降解

按上述 1.3 的接菌方式，将菌液接种到含不同偶氮染料的 10% 盐度培养基中，染料浓度均为 100 mg/L。染料包括酸性金黄 G (425 nm) (DFB-G)、直接黑 G (646 nm) (DFB-G)、酸性大红 GR (510 nm) (ABS-GR)、酸性橙(484 nm) (AOA)、直接湖蓝 5B (598 nm) (DB-5B)和酸性黑(636 nm)。

1.5 染料浓度的测定和脱色率的计算

定时取脱色液在 12000 r/min 下离心 5 min, 取上清液, 以未加染料的培养基作空白, 在染料的相应波长下测量吸光度。脱色率的计算按照公式(1)进行。

$$q = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100\% \quad \text{公式(1)}$$

式中 A_0 为初始时刻染料的吸光度; A_t 为 t 时刻染料的吸光度。实验设置 3 组重复。

1.6 中间产物的确定

红外扫描光谱法(Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR)测定。收集降解后(培养 8 h 后)的混合培养物, 并在 10000 r/min 条件下离心 10 min, 取上清, 分别在 pH 7、2 和 10 下用 100 mL 的乙酸乙酯萃取, 合并萃取液, 加入无水硫酸钠吸取水分, 旋干。用 Bruker VERTEX 70 红外光谱仪进行红外扫描分析, 扫描波长范围为 500–4000 cm^{-1} 。

取旋干的降解产物用于气相质谱分析(Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS)。采用赛默飞 ISQ LT GC-MS 对降解产物进行分析。GC-MS 柱为 TG-35ms 的石英毛细管柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm), 升温程序: 50 $^{\circ}\text{C}$, 5 min, 8 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 280 $^{\circ}\text{C}$, 保持 10 min。载气(氦气)流速为 1 mL/min, 注射器和检测器温度为 250 $^{\circ}\text{C}$ 。降解产物的质谱分析在 EI 模式 70 eV 条件下扫描。

1.7 产物毒性

毒性测试以洋葱为材料, 用微核实验的方法测定降解前后的毒性^[11]。

将完全降解的染料采用上述 1.6 中的方法得到固体, 然后溶于蒸馏水中, 经 TOC 测定, 稀释

得到 100 mg/L 的水溶液(TOC 测定)。将洋葱根(2–3 cm)分别浸泡在酸性金黄 G 的水溶液和降解产物的水溶液中(100 mg/L) 12 h。用蒸馏水冲洗根部, 蒸馏水浸泡恢复培养 24 h。取下根尖处约 1 cm 的根尖, 卡诺试剂中固定 3 h。将根尖用蒸馏水冲洗干净, 浸泡到 5 mol/L 的 HCl 中, 在 28 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中解离 25 min。然后用 Schiff 试剂浸泡染色 30 min。取用 1 mm 左右的根尖, 压片, 在 40 倍物镜下观察微核并计数至少 1000 个细胞。设立 3 组平行试验。微核千分率按照公式(2)计算。

微核千分率(MCN)=(观察细胞中有微核的细胞数/所有观察的细胞数) × 1000‰ 公式(2)

水质的评价标准: MCN 在 10‰ 以下时, 基本没有污染; 在 10‰–18‰ 时, 为轻度污染; 在 18‰–30‰ 时, 为中度污染; 30‰ 以上时, 为重度污染。

2 结果和讨论

2.1 菌群的富集

本研究经过 8 次富集获得了一个能够在高盐环境下使酸性金黄 G 脱色的嗜盐菌群。该菌群能够在 10% 盐度下, 8 h 内将 100 mg/L 酸性金黄 G 脱色(94.68%)。在染料脱色初期, 微生物有染色现象, 但在降解完全后微生物的染色消失, 说明微生物主要通过降解作用将染料脱色, 这和其他的研究结果相似^[13]。和摇床条件下相比, 静置培养条件下, 嗜盐菌群的脱色效率更高(结果没有显示), 可能是因为氧气比偶氮染料更容易成为电子受体, 这和他人的研究结果相同^[12]。从运行成本和脱色效率两方面考虑, 后续实验均采用静置的方法研究其他参数对脱色效率的影响。

2.2 嗜盐菌群的群落结构

高通量测序结果表明(图 1), 该菌群主要由 *Zobellella*、*Rheinheimera*、*Exiguobacterium* 和 *Marinobacterium* 等组成。它们分别占全部序列的 64.39%、23.65%、5.28% 和 3.65%。*Zobellella* 是菌群中最主要的菌属, 含量为 64.39%, *Zobellella* 适应盐度范围较广, 目前只有 *Zobellella taiwanensis*、*Zobellella aerophila*、*Zobellella denitrificans* 这 3 个种^[14], 在生物脱氮方面有更多的应用^[15]。李小义^[16]等发现 *Zobellella* sp. F13-1 具有高效好氧反硝化能力, 嗜盐为 0–12%, 但还没有其参与染料脱色的报道。*Exiguobacterium* spp. 是一类革兰氏阳性、无芽孢、兼性厌氧菌, 多数菌种具有嗜极性, 能够耐受印染废水的高盐环境^[17]。有很多研究表明, *Exiguobacterium* 属在偶氮染料的降解上有广泛的应用。Tan 等^[18]从制药厂的表层土中分离出 *Exiguobacterium* sp. TL 菌株, 是一种耐盐偶氮还原菌; Rhishikesh 等从受纺织工业废水污染的土壤中分离出 *Exiguobacterium* sp. RD3 菌, 能有效降解 7 种活性染料, 48 h 内对 50 mg/L 活性亮蓝 172 去除率高达 91.2%^[19]。*Marinobacterium* 属可降解 PAHs, 在很多含油废水中发现此菌属的存在, 目前也没有发现 *Marinobacterium* 属参与染料脱色的研究。*Rheinheimera* 属有很多发现于深海和极地, 能够耐受高盐环境, 之前并未有研究显示 *Rheinheimera* 属参与染料的脱色, 对于如何参与偶氮染料的脱色, 还需进一步的研究。

2.3 碳和氮源对菌群脱色效率的影响

碳源对菌群脱色酸性金黄 G 的影响如图 2 所示。从图中可以看出, 8 h 后, 酵母粉促进嗜盐菌群脱色的效率最好, 为 94.68%, 其次为葡萄糖, 为 56.01%, 远高于其他碳源(淀粉为 30.29%, 蔗

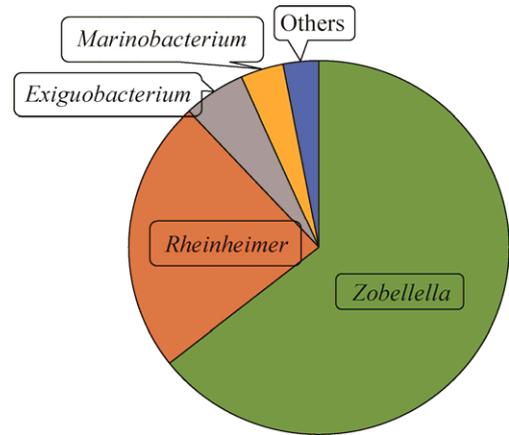


图 1. 微生物菌群的群落结构

Figure 1. Community structure of the bacterial consortium.

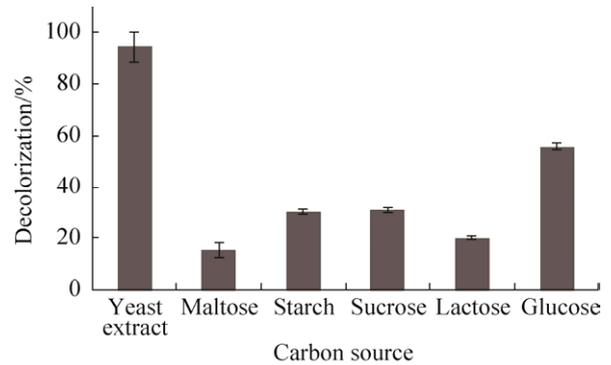


图 2. 碳源对嗜盐菌群脱色效率的影响

Figure 2. Effects of carbon source on decolorization of methanil yellow G by the halophilic bacterial consortium. Data points represents the mean of three independent replicates, stand error of mean is indicated by error bars.

糖为 30.92%, 乳糖为 20.14%, 麦芽糖为 15.31%)。很多研究结果也发现, 酵母粉可以显著促进微生物脱色偶氮染料, 主要是因为酵母粉可以作为微生物碳源、电子传递体和提高偶氮还原酶的活性^[20]。为使后续实验脱色效率更高, 后续实验均使用酵母粉作为碳源。

在供试氮源中, 有机氮源(蛋白胨)和无机氮源(尿素)对脱色的影响最大, 其中, 蛋白胨对脱色促

进效果最优, 无机氮源(硝酸钾)和有机氮(牛肉膏)对脱色的影响较小。如图 3 所示, 8 h 后, 蛋白胨和硝酸钾的脱色率分别为 96.65% 和 94.01%, 牛肉膏为 82.11%, 尿素为 65.74%。因此, 蛋白胨和硝酸钾为此菌群最适氮源。碳源中的还原当量传递到染料中将偶氮键断裂。另外, 碳源的促进效果低于氮源, 可能是微生物可以利用染料为碳源; 同时, 氮源可以促进 NADH 的再生, 而 NADH 是微生物还原偶氮键的电子直接供体^[21]。

2.4 pH 对菌群脱色效率的影响

pH 值对嗜盐菌群降解酸性金黄 G 的效果如图 4 所示, 8 h 后, pH 6 的脱色率最高, 为 96.26%, 然后向两边递减, pH 5、7 时, 脱色率分别为 89.58% 和 95.26%。pH 8 时, 脱色率为 66.20%。当 pH 4、9 和 10 时, 脱色率较低, 分别是 19.18%、21.56% 和 15.22%。pH 会对微生物脱色偶氮染料有很大影响, 通常来说, 微生物脱色的 pH 为 6–10,

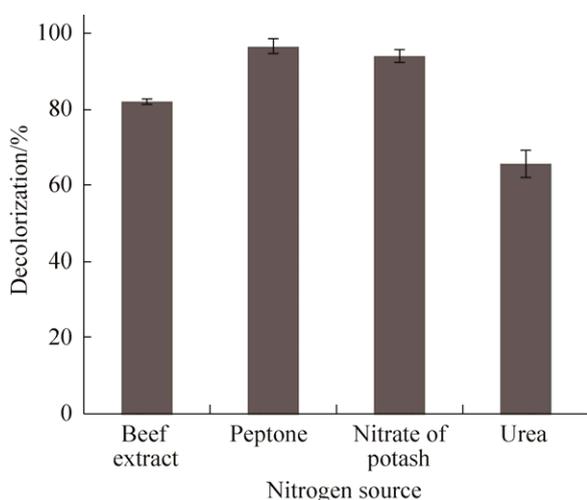


图 3. 氮源对嗜盐菌群脱色效率的影响

Figure 3. Effects of nitrogen source on decolorization of methanil yellow G by the halophilic bacterial consortium. Data points represents the mean of three independent replicates, stand error of mean is indicated by error bars.

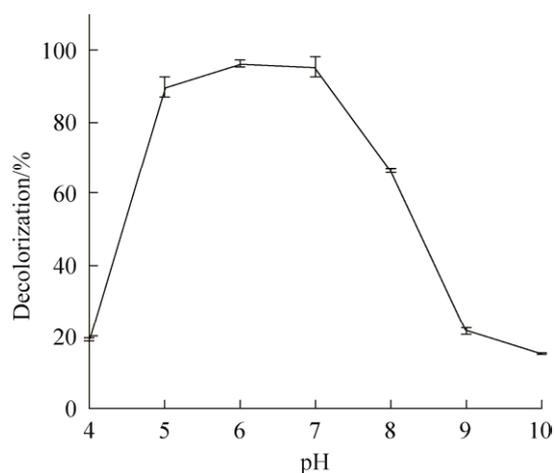


图 4. pH 对嗜盐菌群脱色效率的影响

Figure 4. Effects of pH on decolorization of methanil yellow G by the halophilic bacterial consortium. Data points represents the mean of three independent replicates, stand error of mean is indicated by error bars.

过酸或者过碱, 微生物的生长和功能都会受到抑制。有研究表明, 染料的跨膜运输是微生物脱色的限制步骤, pH 会影响染料分子的转运跨膜, 从而影响微生物的脱色效率^[22]。此外, 每种酶在最适 pH 值时才会表现出最高的活性, pH 会影响微生物酶的活性和染料的溶解度。染料废水或者偏酸或者偏碱, 此菌群在 pH 6 时, 脱色效率最高, 所以在处理偏酸性印染废水中具有深远前景。

2.5 染料浓度对菌群脱色效率的影响

染料浓度对嗜盐菌群脱色酸性金黄 G 的影响如图 5 所示, 随着酸性金黄 G 浓度的增加, 脱色率逐渐降低, 6 h 后, 100 mg/L 酸性金黄 G 的脱色率达到 95.56%, 而 300 mg/L 的只有 22.54%。可能是由于染料浓度过高, 对微生物有毒害作用或者是抑制微生物数量的增长。后续实验中发现, 10 h 后, 200 mg/L 的脱色率为 94.88%; 20 h 后, 300 mg/L 的脱色率达到 96.22%; 35 h 后,

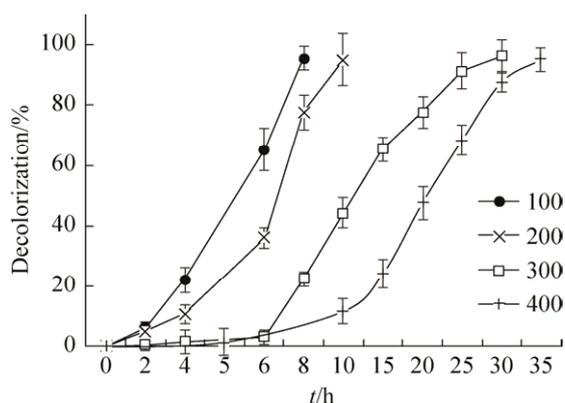


图 5. 染料浓度对嗜盐菌群脱色效率的影响

Figure 5. Effects of dye concentration on the decolorization of methanil yellow G by the halophilic bacterial consortium. Data points represents the mean of three independent replicates, stand error of mean is indicated by error bars.

400 mg/L 的脱色率为 95.12%。此嗜盐菌群可以降解高浓度的酸性金黄 G, 并且在 200 mg/L 的染料浓度时脱色效率依旧较高。对耐盐菌 GTY 的研究表明, 当污染物浓度过高时, 该菌的脱色时间会明显延长^[23]。

2.6 盐度对菌群脱色效率的影响

印染过程中添加了大量的无机盐来提高染料的着色效果, 有时含量高达 15%–20%, 因此, 微生物对盐度的耐受性是影响脱色效率的重要因素之一。从图 6 可以看出, 当盐度相对较低, 分别为 1%、5% 和 10% 时, 8 h 后的脱色效率都很高, 依次是 93.77%、95.89% 和 95.64%。但是, 当盐度再升高, 达到 15% 时, 脱色率急速下降, 只有 22.63%。当盐度再升高到 20% 时, 几乎完全抑制了菌的活性, 脱色率为 10.52%。可能是盐度过高会使微生物质壁分离, 抑制细菌的活性, 从而使脱色效率下降。本实验室前期富集的能在 10% 盐度下降解酸性大红 GR 的菌群, 在 15% 盐度下还能高效降解偶氮染料^[8]。盐度的变化会带来渗透

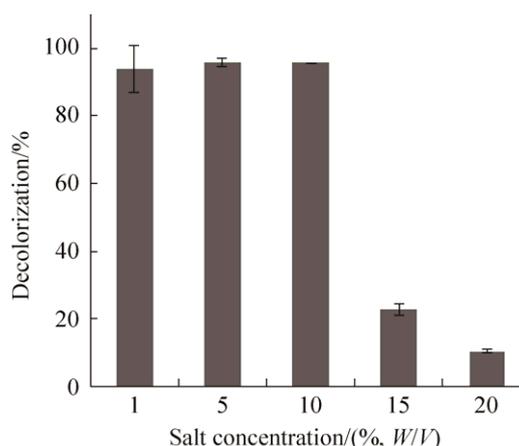


图 6. 盐度对嗜盐菌群脱色效率的影响

Figure 6. Effects of NaCl concentration on decolorization of methanil yellow G by the halophilic bacterial consortium. Data points represents the mean of three independent replicates, stand error of mean is indicated by error bars.

压的变化, 从而影响细菌的生长。高盐度会抑制微生物的生长, 普通微生物的活性下降, 而嗜盐微生物即便在高盐的环境下仍能有较好的脱色效果^[5]。高盐可以导致微生物体内的代谢产物发生变化, 比如产生渗透调节物质和胞外聚合物; 也可以破坏微生物体内酶的结构和影响微生物的呼吸, 导致生物降解的活性下降^[5]。

2.7 菌群对不同偶氮染料的脱色

不同的偶氮染料具有不同的化学结构, 可能影响到嗜盐菌的脱色性能。从图 7 可以看出, 8 h 后, 酸性大红 GR 几乎完全脱色(脱色率为 96.69%), 其次是酸性黑 ATT (80.74%)、酸性橙(64.26%)、直接湖蓝 5B (13.37%) 和直接耐晒黑 G (0%)。一般而言, 结构简单、分子量较小的染料更容易被分解。另外, 戴树桂等^[24]发现若偶氮染料芳香环中存在羟基(-OH)和氨基(-NH₂)时能促进脱色效率; 但是当存在甲氧基(-OCH₃)、磺酸基(-SO₃H)、硝基(-NO₂)、甲基(-CH₃)和羧基(-COOH)时会降

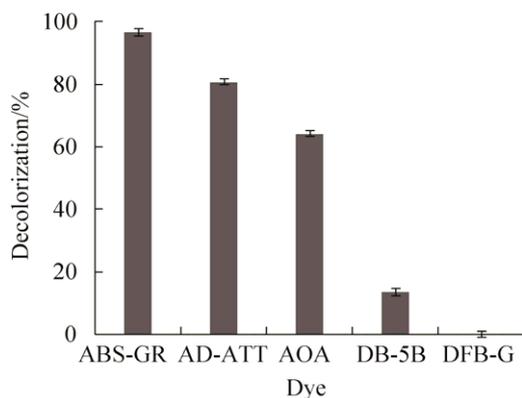


图 7. 嗜盐菌群对不同偶氮染料的降解效果

Figure 7. Decolorization of different azo dyes by the halophilic bacterial consortium. Data points represents the mean of three independent replicates, stand error of mean is indicated by error bars.

低脱色效率, 并且促进基团和抑制基团可以相互抵消。酸性大红 GR 结构较为简单, 分子量小, 偶氮键(-N=N-)只有 2 个, 且只含有 2 个抑制基团(-SO₃H)和 1 个促进基团(-OH), 所以脱色较快。而直接耐晒黑 G 结构复杂, 相对分子质量大, 4 个偶氮键(-N=N-), 所以脱色率极低。此嗜盐菌群对酸性大红 GR 及酸性黑 ATT 的降解效果较好, 且 35 h 后, 直接耐晒黑 G 的降解率为 58.62%, 直接湖蓝 5B 为 84.84%, 酸性橙降解率为 72.34%, 酸性黑 ATT 为 81.91% (结果没有显示)。该菌群具有降解多种染料的能力, 有很好的实际应用价值。

2.8 染料降解前后的毒性

微核实验的结果表明(表 1), 经过嗜盐菌群的降解, 毒性有明显的降低, 可能是酸性金黄 G 的

偶氮键断裂, 微生物脱去氨基, 苯环断裂。有些生物不能将胺类物质彻底降解, 苯胺类物质积累, 使偶氮染料降解前的毒性小于降解后; 相反有些微生物能够使苯胺彻底降解, 使降解后的毒性降低^[15]。本研究获得的嗜盐菌群能脱去氨基, 使得毒性降低。

2.9 降解产物的红外谱图和 GC-MS 分析

比较酸性金黄 G 在 0 h 和降解后 8 h 的 FTIR 的图谱发现(图 8), 偶氮染料中的偶氮键的特征伸缩振动频率为 1630–1575 cm⁻¹, 在降解前的红外谱图中, 存在 1604 cm⁻¹ 的吸收峰, 说明此物含有偶氮键, 而降解后消失, 说明偶氮键断裂, 偶氮染料降解。Arun Prasad 等^[25]FTIR 的结果也发现偶氮键的吸收峰在降解后消失。500–1000 cm⁻¹ 出现的吸收峰表示苯或萘存在, 尤其是 640 cm⁻¹ 表示芳香化合物中 C–C 共振峰, 降解后该范围的吸收峰消失。1051–1189 cm⁻¹ 出现的吸收峰表示–SO₃, 降解后该峰消失说明已经脱去–SO₃。1404 cm⁻¹ 是 C=C 的吸收峰, 降解后该峰还存在说明此物质中苯环的存在。3300–3500 cm⁻¹ 的吸收峰表示的是仲胺, 降解前 3412 cm⁻¹ 的吸收峰表示酸性金黄 G 中存在–NH–。降解后, 在 1406 cm⁻¹ 处的吸收峰表示降解产物存在苯环, 图 8 中 3440 cm⁻¹ 的吸收峰表示降解产物中存在–NH–, 在 3157 cm⁻¹ 处表示存在伯胺(–NH₂)。因此, 酸性金黄 G 在微生物的作用下偶氮键断裂, 形成的降解产物中含有基团–NH–和–NH₂, 这和 GC–MS 的研究结果相同。

表 1. 酸性金黄 G 脱色前后洋葱根尖细胞的微核细胞数

Table 1. The number of micronuclei in cells

Group	Cell number	Micronuclei cells	Micronucleus rate(MCN)/‰	Pollution degree
Methanil yellow G	1007	29	28.8	Middle
Degradation product	1103	17	15.4	Moderate

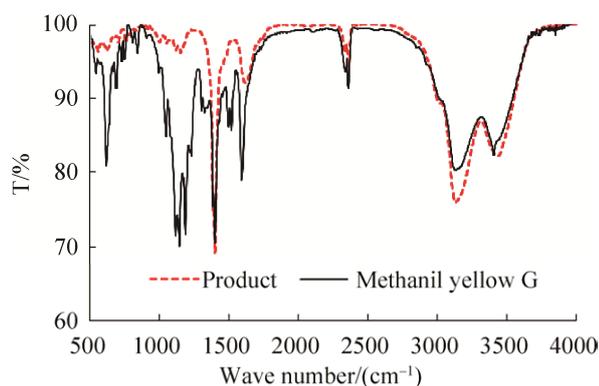


图 8. 酸性金黄 G 脱色前后的 FTIR 图谱

Figure 8. FTIR spectra of methanil yellow G and degraded sample.

降解后(8 h)的 GC-MS 分析结果表明(图 9), 酸性金黄 G 主要的降解产物是对氨基二苯胺(保留时间为 21.11)和二苯胺(保留时间为 17.58 min)。氨基二苯胺的特征碎片为 184, 与 GC-MS NIST 数据库中标准物的相似度为 77.13%。在厌氧或缺氧条件下, 微生物降解偶氮染料的第一步是偶氮键在酶的作用下还原断裂, 形成无色的苯胺类代谢产物, 而这些产物的彻底降解需要氧气的参与^[26]。通过降解产物分析, 酸性金黄 G 在厌氧条件下, 偶氮键断裂生成伯胺, 对 N-苯基苯乙胺在进一步脱去苯环上的伯胺, 转化为二苯胺。

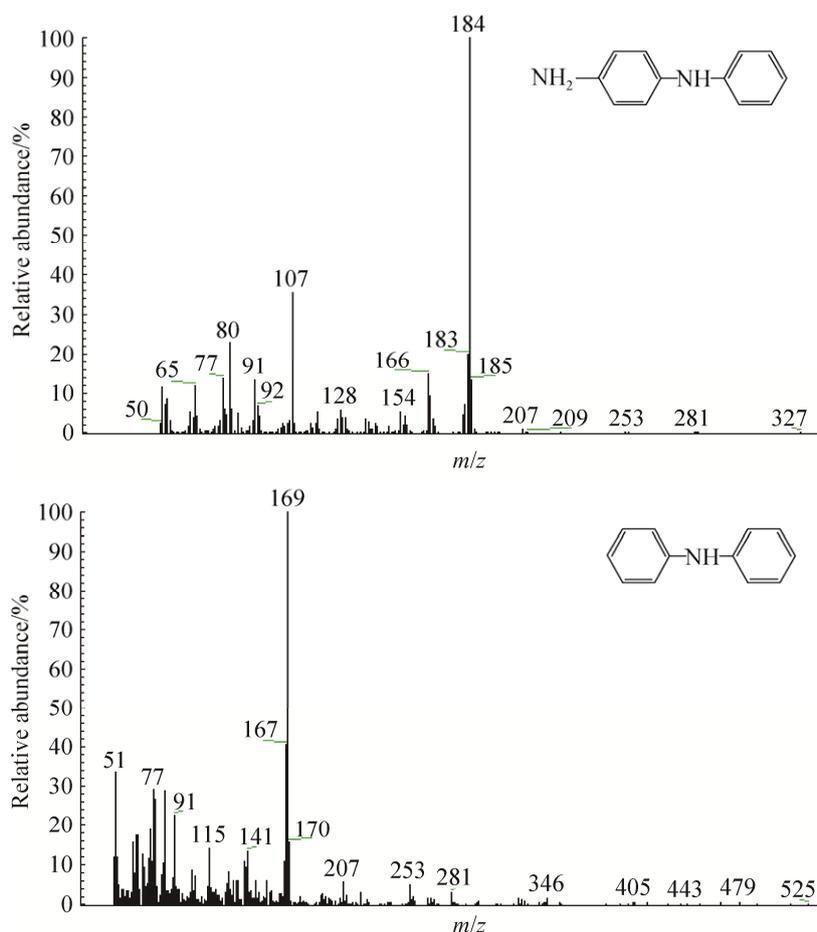


图 9. 嗜盐菌群脱色酸性金黄 G 产物的 GC-MS 质谱图

Figure 9. GC-MS spectral information of metabolites obtained after decolorization of methanil yellow G by the halophilic bacterial consortium.

3 结论

采用富集的方法, 从印染废水的活性污泥中富集了一个能够使酸性金黄 G 脱色的嗜盐菌群, 该菌群主要由 *Zobellella*、*Rheinheimera*、*Exiguobacterium* 和 *Marinobacterium* 等 4 个属组成, 可以在 1%–10% 盐度范围内快速脱色酸性金黄 G, 当酸性金黄 G 的浓度为 100–400 mg/L 时, 该菌群都有较好的脱色效果。该菌群还可以脱色酸性大红 GR, 酸性黑 ATT 和直接湖蓝 5B 等偶氮染料; 最佳碳源为酵母粉, 最佳氮源为蛋白胨和硝酸钾, 最适宜的 pH 为 6。酸性金黄 G 的降解产物为对氨基二苯胺和二苯胺。降解产物的毒性比降解前降低。

参考文献

- [1] Hua L, Xie JK, Zhu C, Ma HR, Peng XY. Advance in microbial decolorization and degradation of azo dyes. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2015, 43(10): 103–113. (in Chinese)
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. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2015, 43(10): 103–113.
- [2] Lu J, Yu ZS, Zhang HX. Research progress in the microbial degradation of azo dyes. *Industrial Water Treatment*, 2013, 33(1): 15–19. (in Chinese)
卢婧, 余志晟, 张洪勋. 微生物降解偶氮染料的研究进展. 工业水处理, 2013, 33(1): 15–19.
- [3] Bhatia D, Sharma NR, Singh J, Kanwar RS. Biological methods for textile dye removal from wastewater: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2017, 47(19): 1836–1876.
- [4] Vikrant K, Giri BS, Raza N, Roy K, Kim KH, Rai BN, Singh RS. Recent advancements in bioremediation of dye: Current status and challenges. *Bioresource Technology*, 2018, 253: 355–367.
- [5] He HJ, Chen YJ, Li X, Cheng Y, Yang CP, Zeng GM. Influence of salinity on microorganisms in activated sludge processes: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2017, 119: 520–527.
- [6] Wei N, Zhang QQ, Du ZJ, Zhang DM. Isolation and identification of halophilic bacteria strain *Halomonas elongata* and its application on degradation of an azo dye Reactive Blue BRF. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2012, 32(9): 2091–2096. (in Chinese)
韦娜, 张前前, 杜宗军, 张栋梅. 极端嗜盐菌 *Halomonas elongata* 的分离鉴定及其降解偶氮染料活性兰 BRF 的条件优化研究. 环境科学学报, 2012, 32(9): 2091–2096.
- [7] Patel VR, Bhatt N. Isolation, development and identification of salt-tolerant bacterial consortium from crude-oil-contaminated soil for degradation of di-azo dye Reactive Blue 220. *Water Science and Technology*, 2015, 72(2): 311–321.
- [8] Guo G, Wang YH, Tian F, Ding KQ, Xu Y, Chai J, Liu T, Jia YS, Zhang L. Enrichment and decoloring capability of an acid brilliant scarlet GR decoloring halophilic bacterial consortium. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2016, 10(2): 631–636. (in Chinese)
郭光, 王艳华, 田芳, 丁克强, 徐瑶, 柴晋, 刘婷, 贾永胜, 张丽. 酸性大红嗜盐菌群的富集及脱色效果. 环境工程学报, 2016, 10(2): 631–636.
- [9] Guo G, He F, Tian F, Huang Y, Wang H. Effect of salt contents on enzymatic activities and halophilic microbial community structure during phenanthrene degradation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2016, 110: 8–15.
- [10] Guo G, Tian F, Liu Y, Liu TF, Ding KQ, Liu C. Decoloring acid scarlet GR by a moderately halophilic bacterial consortium. *Microbiology China*, 2017, 44(11): 2567–2574. (in Chinese)
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. 微生物学通报, 2017, 44(11): 2567–2574.
- [11] Xu XT, Lu P, Wu D, Li XK. Isolation, characterization and toxicity of a malachite green degradation bacterial strain. *Microbiology China*, 2017, 44(8): 1817–1824. (in Chinese)
徐晓婷, 卢平, 吴丹, 李旭凯. 孔雀石绿脱色菌的分离鉴定及染料脱色后毒性研究. 微生物学通报, 2017, 44(8): 1817–1824.
- [12] Xie XH, Fan FX, Yuan XW, Liu N, Liu JS. Isolation of high performance bacterial consortium FF and its decolorization effects on reactive black 5. *Journal of Donghua University (Natural Science)*, 2013, 39(6): 802–813. (in Chinese)
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. 东华大学学报(自然科学版), 2013, 39(6): 802–813.
- [13] Song L, Shao YF, Ning SX, Tan L. Performance of a newly

- isolated salt-tolerant yeast strain *Pichia occidentalis* G1 for degrading and detoxifying azo dyes. *Bioresource Technology*, 2017, 233: 21–29
- [14] Bai J, Chen L, Huang X, Hu CH, Zhao YG, Li KR. Isolation and nitrogen removal characteristics of salt-tolerant heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacteria *Zobellella* sp. B307. *Environmental Science*, 2018, 39(10): 4793–4801. (in Chinese)
白洁, 陈琳, 黄潇, 胡春辉, 赵阳国, 李岿然. 1株耐盐异养硝化-好氧反硝化菌 *Zobellella* sp. B307 的分离及脱氮特性. *环境科学*, 2018, 39(10): 4793–4801.
- [15] Lee DW, Lee H, Kwon BO, Khim JS, Yim UH, Park H, Park B, Choi IG, Kim BS, Kim JJ. *Zobellella maritima* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium, isolated from beach sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2018, 68(7): 2279–2284.
- [16] Li XY, Wang LP, Lai QL, Li DF, Shao ZZ. Preliminary study on aerobic denitrification characteristics of *Zobellella* sp. F13-1. *Journal of Applied Oceanography*, 2016, 35(1): 122–129. (in Chinese)
李小义, 王丽萍, 赖其良, 李登峰, 邵宗泽. 一株卓贝尔氏菌 F13-1 好氧反硝化特性及其反硝化基因的初步研究. *应用海洋学学报*, 2016, 35(1): 122–129.
- [17] Zhang Y, Shi P, Ma J. *Exiguobacterium* spp. and their applications in environmental remediation. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2013, 19(5): 898–904. (in Chinese)
张莹, 石萍, 马炯. 微小杆菌 *Exiguobacterium* spp. 及其环境应用研究进展. *应用与环境生物学报*, 2013, 19(5): 898–904.
- [18] Tan L, Qu YY, Zhou JT, Li A. Decolorization of azo dyes by a newly isolated *Exiguobacterium* sp. strain TL under high salt condition. *Journal of Biotechnology*, 2008, 136 Suppl: S688.
- [19] Dhanve RS, Shedbalkar UU, Jadhav JP. Biodegradation of diazo reactive dye Navy blue HE2R (Reactive blue 172) by an isolated *Exiguobacterium* sp. RD3. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2008, 13(1): 53–60.
- [20] Imran M, Arshad M, Negm F, Khalid A, Shaharoon B, Hussain S, Nadeem SM, Crowley DE. Yeast extract promotes decolorization of azo dyes by stimulating azoreductase activity in *Shewanella* sp. strain IFN4. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2016, 124: 42–49.
- [21] Khan R, Bhawana P, Fulekar MH. Microbial decolorization and degradation of synthetic dyes: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 2013, 12(1): 75–97.
- [22] Saratale RG, Saratale GD, Chang JS, Govindwar SP. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2011, 42(1): 138–157.
- [23] Xiang XM, Wang XK, Zhou JT, Wang R, Qu BC. Decolorization of reactive X-3B red dye by salt-tolerant bacterium GTY. *Environmental Science & Technology*, 2010, 33(2): 31–34. (in Chinese)
项学敏, 王晓坤, 周集体, 王刃, 曲宝成. 耐盐菌 GTY 对偶氮染料活性艳红 X-3B 的脱色研究. *环境科学与技术*, 2010, 33(2): 31–34.
- [24] Dai SG, Song WH, Li T, Zhuang YY. Study on azo dyes structure-biodegradability relationships. *Advances in Environmental Science*, 1996, 4(6): 1–9. (in Chinese)
戴树桂, 宋文华, 李彤, 庄源益. 偶氮染料结构与其生物降解性关系研究进展. *环境科学进展*, 1996, 4(6): 1–9.
- [25] Arun Prasad AS, Satyanarayana VSV, Bhaskara Rao KV. Biotransformation of Direct Blue 1 by a moderately halophilic bacterium *Marinobacter* sp. strain HBRA and toxicity assessment of degraded metabolites. *Journal of Hazardous Materials*, 2013, 262: 674–684.
- [26] 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. *Bioresource Technology*, 2018, 250: 650–657.

Decolorization of methanil yellow G by a halophilic bacterial consortium

Jing Xie¹, Guang Guo^{1*}, Fang Tian¹, Siyi Zhou¹, Keqiang Ding¹, Feng Yang¹, Wang Zhou¹, Chong Liu^{2*}

¹College of Environmental Engineering, Nanjing Institute of Technology, Nanjing 211167, Jiangsu Province, China

²Institute of Environment and Sustainable Development in Agriculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: [Objective] In order to obtain highly efficient bacterial consortium that can rapidly decolorize azo dyes in high salinity environment. [Methods] A halophilic bacterial consortium was obtained by enrichment, and its community structure was determined by Illumina HiSeq2500 sequencing platform. The degradation characteristics were determined by spectrophotometry. The degradation mechanism was analyzed by GC-MS and Fourier Transform infrared spectroscopy. The toxicity of azo dye and degradation product were compared by micronuclear test. [Results] At 10% salinity, the bacterial consortium decolorizes methanil yellow G completely in 8 h. The bacterial consortium was composed of *Zobellella*, *Rheinheimera*, *Exiguobacterium* and *Marinobacterium*. At pH 6.0, with yeast powder as carbon sources, peptone or potassium nitrate as nitrogen sources and 1% NaCl were the optimal decolorization conditions. Decolorization metabolites of methanil yellow G were less toxic than original dye. The main degradation products of methanil yellow G were *p*-aminodiphenylamine and diphenylamine. In addition, the bacterial consortium also decolorized various azo dyes, such as acid magenta GR and direct lake blue 5B. [Conclusion] A halophilic bacterial consortium for fast degradation of azo dyes was obtained, with the application potential to treat high-salt printing and dyeing wastewater.

Keywords: azo dye, methanil yellow G, halophilic bacterial consortium, decolorization

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31600091, 51608257), by the Special Fund of State Key Joint Laboratory of Environment Simulation and Pollution Control (18K01ESPCT) and by the Open Project of Key Laboratory of Drinking Water Science and Technology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences (17K01KLDWST)

*Corresponding author. Tel: +86-10-62736913; E-mail: guoguang007007@163.com

Received: 15 June 2018; Revised: 2 September 2018; Published online: 12 September 2018