

# 反硝化菌的偶氮染料脱色研究\*

刘志培 杨惠芳 刘双江

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

**摘要** 从活性污泥中分离到几株具有反硝化能力的偶氮染料脱色菌. 它们在合成培养基中能使大多数所试偶氮染料脱色; 而在反硝化条件下很难使偶氮染料脱色, 只有菌株17在培养20d后才有较好的脱色效果. 酵母粉等有机物作为生长因子时, 对菌株17反硝化条件下的偶氮染料脱色有非常明显的促进作用; 该情况下的偶氮染料脱色是在完成反硝化作用之后进行的. 此外, 在反硝化条件下不能分离得到偶氮染料脱色菌.

**关键词** 反硝化, 偶氮染料, 脱色, 脱色菌.

## Study on Decolorization of Azo Dyes by Denitrobacteria

Liu Zhipei Yang Huifang Liu Shuangjiang

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

**Abstract** Several azo dyes-decolorizing bacterial strains which were capable of denitrifying were isolated from activated sludges. They could decolorize most of the azo dyes tested in this experiment in composed medium; but it was much difficult that the bacteril strains decolorize azo dyes under denitrification condition, except for strain 17 which could decolorize Acid Red B effectively after cultivation for more than 20 days. The addition of growth factor such as yeast extract could greatly improve the decolorization of Acid Red B under denitrification condition by strain 17. The result also indicated that the decolorization of azo dyes was taken place after the completion of denitrification. Additionally, it was impossible to isolate azo dye-decolorizing bacteria under denitrification condition.

**Keywords** denitrification, azo dyes, decolorization, decolorizing bacteria.

染料工业废水一般采用厌氧-好氧-生物活性炭方法处理. 有关偶氮染料微生物脱色的条件、机理, 偶氮还原酶的提取纯化和特性、偶氮染料脱色降解代谢产物的检测等都进行了比较深入的研究<sup>[1-5]</sup>. 由于工业废水中还含有 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{NO}_3^-$ 等可以为微生物提供无氧呼吸的氧化性物质, 在以往的工作中有关这些物质对偶氮染料脱色的影响并未进行较深入的研究. 本文拟在硝酸盐还原条件下探讨偶氮染料的微生物脱色情况, 试图阐述硝酸盐和亚硝酸盐对偶氮染料脱色的影响, 以及阐明印染废水生物处理过程中 $\text{NO}_3^-$ 的负荷量.

### 1 材料和方法

(1) 泥样 活性污泥样品采自高碑店污水处理厂浓缩池污泥(A)和北京第二印染厂厌氧池污泥(B).

(2) 染料 活性艳橙 KN-4R, 活性艳红 Z-3B, 酸性红 B, 媒介黄 GG, 酸性黑 10B, 碱性橙粉, 酸性橙, 酸性媒介棕 RH<sup>[5]</sup>.

(3) 培养基 普通牛肉汁培养基、合成培养基<sup>[2]</sup>和反硝化培养基<sup>[6]</sup>.

\* 国家自然科学基金资助项目 (Project Supported by National Natural Science Foundation of China): 29577291  
刘志培: 男, 36岁, 硕士, 副研究员  
收稿日期: 1997-06-30

(4)富集培养 所采样品接种上述培养基,按不同要求培养不同时间,进行驯化富集培养3-4代.

## 2 结果

### 2.1 脱色菌的分离及其反硝化能力的测定

把泥样接种于含有50mg/L 偶氮染料的牛肉汁培养基中进行驯化富集培养3-4代,选脱色效果好的样品在牛肉汁平板上划线分离,共挑取约50个单菌落,然后以合成培养基逐个进行对不同染料的脱色能力测定(表1).结果表明有6株菌的脱色效果较好,其中以菌株17、29、30三株的脱色能力最高.而就染料来说,酸性红 B

比其他染料更易于脱色,所以在以下的实验中选择酸性红 B 为对象.此外,还进行了在反硝化条件下的脱色菌的分离筛选,在样品接种于含有50mg/L 偶氮染料的反硝化培养基中富集驯化培养,经过一个多月的培养,没有发现偶氮染料的脱色,表明在反硝化条件下不能分离得到脱色菌.

为了考查反硝化条件下菌株的脱色作用情况,应选用具有反硝化能力的菌株进行实验,所以对上述6株细菌按标准方法进行了反硝化能力的检测,表2的结果表明,这6株菌都具有反硝化作用,而以菌株17、29和30的反硝化作用能力最强.

表1 不同菌株对偶氮染料的脱色率/%

菌 株	17	18	20	26	29	30
分离来源	A	A	A	B	A	A
酸性红 B	65.7	97.6	89.7		66.9	68.2
活性艳橙 KN-4R	89.5				23.1	93.6
活性艳红 Z-3B	70.8				69.9	73.2
媒介黄 GG	63	23.2			68.8	96.1
碱性橙粉	92.6			46.8	90.6	93.5
酸性媒介棕 RH	77.2			62.8	83.8	91.8
酸性橙	40.3			-	50.8	33.5
酸性黑10B	34.7			22.5	39.6	32.7

表2 分离菌株的反硝化能力

菌株	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	产气	反硝化能力
CK	+++	-	-	
17	-	-	+++	很强
18	++	+	++	一般
20	++	+	++	一般
26	++	+	++	一般
29	-	-	+++	很强
30	-	-	+++	很强

### 2.2 反硝化条件下分离菌株对偶氮染料的脱色

将上述6株具有反硝化作用的细菌分别接种于含50mg/L 不同偶氮染料的反硝化培养基中,在培养10d、20d 和30d 后观察偶氮染料的脱色情况.结果表明,在培养10d 时所有菌株对所试染料均无脱色作用,在培养20d 时只有菌株17、29和30对酸性红 B 有一些脱色作用,对

其他染料没有脱色作用,在培养30d 时也还只有其中的菌株17、29和30对酸性红 B 有较好的脱色作用,对其他染料没有脱色作用;此结果与在合成培养基中的偶氮染料脱色情况有很大的差别,说明在反硝化条件下偶氮染料很难被微生物脱色.

### 2.3 添加有机物对反硝化条件下偶氮染料脱色的影响

反硝化培养基中添加0.05% 的酵母粉或蛋白胨或牛肉膏作为生长刺激因子,观察分离菌株在这样的条件下对酸性红 B 的脱色情况(表3).表3表明,添加有机物对菌株17的酸性红 B 的脱色有明显的促进作用,不论添加哪种有机物,在培养6d 后,酸性红 B 的脱色率都可以达到90% 以上,这比不添加有机物时快了许多;而对其他菌株的酸性红 B 脱色则没有明显的促进作用.

表3 有机物对反硝化条件下偶氮染料脱色的影响<sup>1)</sup>

菌株	酸性红 B 的脱色率/ %		
	酵母粉	蛋白胨	牛肉膏
17	90.6	95.2	95.6
19	0	0	0
20	0	0	0
26	0	0	0
29	0	0	0
30	0	0	0

1) 30℃, 培养6d

## 2.4 菌株17在添加有机物的反硝化条件下对酸性红 B 的脱色

从以上实验可以看出, 菌株17在添加有机物的反硝化条件下对酸性红 B 具有脱色作用。在培养过程中定期测定了其中的硝酸盐还原情况和酸性红 B 脱色情况(表4), 表4表明, 偶氮染料的脱色是在完成反硝化作用之后进行的。

表4 菌株17在添加酵母粉的反硝化培养基中对酸性红 B 的脱色

培养时间/d	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	产气	脱色率/ %
1	+++	-	-	0
2	+++	±	-	0
3	++	+	++	0
4	+	++	+++	0
5	-	+	+++	0
6	-	-	++	0
7	-	-	-	30
9	-	-	-	98

## 3 讨论

偶氮染料的微生物脱色及其降解代谢, 首先要求在厌氧条件下完成偶氮染料的脱色<sup>[1-5]</sup>, 在此过程中需要微生物氧化其他有机物产生还原性的 NADH 或 NADPH 作为辅酶, 通过偶氮还原酶的还原作用而使偶氮双键打开<sup>[5]</sup>, 形成苯胺类或萘胺类产物, 然后才能进行脱色产物的开环等微生物降解代谢作用, 直至达到完全的矿化作用, 形成二氧化碳、氨等无机物; 同时厌氧条件也是微生物进行无氧呼吸的条件<sup>[7]</sup>, 例如硫酸盐还原和硝酸盐还原等, 在上述2个条件下, 微生物以 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 或 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 等为最终电子受体氧化有机物产生 ATP 而获得能

量, 在此过程中微生物首先是氧化有机物产生还原性物质如 NADH 和 NADPH 等, 然后通过呼吸链把电子传递给 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 或 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. 由于 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 或 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 等氧还电势要比偶氮染料高得多, 所以在它们和偶氮染料同时存在的条件下, 微生物要首先以它们为最终电子受体进行无氧呼吸, 只有当 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 或 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 等不存在或完全消耗以后, 微生物才能以 NADH 或 NADPH 为辅酶还原偶氮染料, 又由于偶氮染料的微生物脱色降解代谢是以偶氮双键的还原裂解而开始的, 在偶氮双键的还原裂解之前, 偶氮染料是微生物所不能利用的; 此外, 由于许多偶氮染料脱色菌也具有反硝化作用的功能, 在硝酸盐存在的情况下它们优先进行反硝化作用, 因而在反硝化条件下偶氮染料不能被微生物脱色, 只有当培养基中的 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 等能为微生物提供无氧呼吸的物质完全消耗以后, 偶氮染料才能被微生物所脱色。本实验的结果说明, 在印染废水等含有偶氮染料的工业废水的生物处理过程中, 最好不含有 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 或 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 等能为微生物提供无氧呼吸的物质存在, 亦即硝酸盐的负荷越低越好。

## 参 考 文 献

- 1 Meyer U, Leisinger T et al Ed. Microbial Degradation of Xenobiotics and Recalcitrant Compounds. London: Academic Press Inc., 1983: 371- 386
- 2 Kulla H G et al. Interference of Aromatic Sulfo Groups in Microbial Degradation of the Azo Dyes Orange I and Orange. Arch. Microbiol., 1983, 135: 1- 7
- 3 Zimmermann T et al. Properties of Purified Orange azoreductase, the Enzyme Initiating Azo Dyes Degradation by *Pseudomonas* KF46. Eur. J. Biochem., 1982, 129: 197- 203
- 4 Wahrmann K et al. Investigation on Rate-Determining Factors in the Microbial Reduction of Azo Dyes. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1980, 9: 325- 348
- 5 刘志培, 杨惠芳. 假单胞菌 S-42 对偶氮染料的脱色和降解代谢. 微生物学报, 1989, 29(6): 418- 425
- 6 俞毓馨, 吴国庆, 孟宪庭主编. 环境微生物检验手册. 北京: 中国环境科学出版社, 1990: 356
- 7 陆文娟, 杨颐康等编. 微生物学. 北京: 高等教育出版社, 1995: 112- 114