

海洋产电菌 *Shewanella marisflavi* EP1 的脱色特性

邹聪慧¹ 徐方成^{2*} 陈新华³

(1. 厦门大学海洋与环境学院 福建 厦门 361005)

(2. 厦门大学化学化工学院 福建 厦门 361005)

(3. 国家海洋局第三海洋研究所 海洋生物遗传资源重点实验室 福建 厦门 361005)

摘要: 以一株新筛选得到的海洋产电菌 *Shewanella marisflavi* EP1 作为实验材料, 研究了该菌株关于偶氮、蒽醌、三苯基甲烷等染料的脱色能力及脱色机制。结果表明, 该菌株对这些染料均具有较好的脱色能力, 最高脱色容量达到 925 mg 染料/(g 细胞干重·d)。EP1 能利用葡萄糖、蔗糖、木糖、乳酸、甲酸、柠檬酸等多种碳源将单偶氮染料丽春红 2R 脱色。脱色的 pH、温度和 NaCl 浓度范围分别是: pH 6-10、15 °C-40 °C、0-8%。最优脱色条件: 乳酸, pH 8、35 °C、1%-2% NaCl, 10 h 内脱色率高达 99.95%。分光光谱结果表明, 在 0-8% NaCl 浓度范围内 EP1 脱色机制为降解脱色。

关键词: 产电菌, *Shewanella marisflavi* EP1, 偶氮染料, 生物脱色

Decolorization of dyes by a current-producing bacterium *Shewanella marisflavi* EP1 isolated from sea sediments

ZOU Cong-Hui¹ XU Fang-Cheng^{2*} CHEN Xin-Hua³

(1. College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China)

(2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China)

(3. Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen, Fujian 361005, China)

Abstract: In this study, we investigated a new current-producing strain, *Shewanella marisflavi* EP1 isolated from costal sediments of Xiamen, its decolorization capability and mechanism of several types of dyes such as azo, anthraquinone and triphenyl methane. The results indicated that these dyes could be decolorized efficiently and the maximum capacity was 925 mg/(g cell dry weight·d) of Malachite Green. Strain EP1 could utilize various kinds of carbon sources, such as glucose, sucrose, xylose, lactate, formate and citrate for the decolorization of Xylidine Ponceau 2R. EP1 was active for decolorization in wide ranges of pH (6-10), temperature (15 °C-40 °C), and NaCl concentrations (0-8%). The optimal conditions were pH 8.0, 30 °C, 1%-2% NaCl and lactate as carbon source, with a highest decol-

基金项目: 中国大洋协会项目(No. DYXM-115-02-2-15); 国家海洋局海洋生物遗传重点实验室开放研究基金资助项目(No. HY200904)

* 通讯作者: ✉: fcxu@xmu.edu.cn

收稿日期: 2010-08-21; 接受日期: 2010-10-29

orization rate of 99.95% within 10 h. UV-vis absorption spectra demonstrated that the mechanism of the azo dye was degradation in the range of 0–8% NaCl.

Keywords: Current-producing bacteria, *Shewanella marisflavi* EP1, Azo dye, Biodecolorization

产电菌具有胞外电子代谢途径, 能将代谢产生的一部分电子传递给位于细胞外面的最终电子受体。当最终电子受体为电极时, 则能还原电极, 产生电流, 因此, 这类细菌也叫具有电化学生活性的细菌, 或嗜阳极细菌^[1-2]。近年来的一些研究表明, 产电菌不仅可用于微生物燃料电池产电, 而且在染料的降解脱色等方面有某些优势^[3-5], 因为许多偶氮染料含有磺酸基, 极性大, 分子量大, 不容易转运到细胞内被细菌还原^[6]。产电菌因具有胞外电子传递途径, 可以省略底物转运步骤, 直接在胞外将染料还原脱色。另外, 偶氮染料对细胞有毒性, 会影响细胞的生理和生化, 在胞外还原偶氮染料则能降低染料的毒性。

产电菌主要属于变性菌纲的 β 、 γ 、 δ 几个亚纲的化能异养细菌, 研究比较多的主要有 *Geobacter* 属^[7-8]和 *Shewanella* 属^[9-11]的细菌, 其中前者是严格厌氧菌, 主要以乙酸为碳源; 后者是兼性厌氧菌, 碳源利用比较广, 能利用乳酸、葡萄糖、木糖、蔗糖等碳源。 *Shewanella* 广泛分布于沉积物液固分界面等氧化还原电位变化比较频繁的微型生境中^[12]。鉴于这类微生物容易获得和培养, *Shewanella* 在偶氮染料废水的降解方面有重要的应用价值。但目前国内此类微生物的菌种资源还比较少^[13], 来自于海洋的能产电的 *Shewanella* 菌更少^[11,14]。

Shewanella marisflavi EP1 是本课题组新筛选得到的海洋产电菌^[14], 本研究以该菌株为实验材料, 重点研究了该菌株在厌氧条件下的偶氮染料脱色特性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种来源: *Shewanella marisflavi* EP1 取自厦门白城海域潮间带污泥, 接种于微生物燃料电池的阳极室, 经过2个月富集后用 Hungate 厌氧滚管法分离获得^[14]。

1.1.2 染料和培养基: 单偶氮染料丽春红 2R (XP2R, C.I. 16150)和双偶氮染料刚果红(CR, C.I. 22120)购自梯希爱(上海)化成工业发展有限公司, 蒽醌类染料活性艳蓝 KN-R (RB19, C.I. 61200)购自 Sigma 公司, 三苯基甲烷染料孔雀绿(MG)和直接染料直接黄(DY)购自国药集团化学试剂有限公司。XP2R 的化学结构式如图 1 所示。

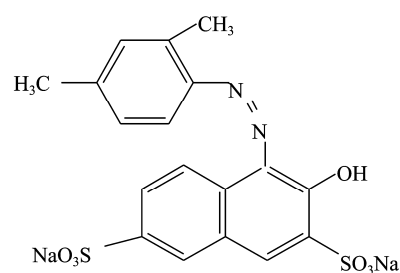


图 1 丽春红 2R 的化学结构式

Fig. 1 Chemical structure of Xylidine Ponceau 2R

S. marisflavi EP1 生长培养基采用改进的 2216E (1 L): 蛋白胨 5 g, 酵母膏 1 g, 海水 1 000 mL, pH 7.0。脱色培养基(RM) (g/L): NaCl 19.89, KCl 0.745, NaH_2PO_4 0.35, Na_2HPO_4 0.44, MgSO_4 0.188, XP2R 0.05, NH_4Cl 1.0, 乳酸钠 20 mmol/L, 延胡索酸 10 mmol/L, 微量元素液 10 mL/L^[15], 调 pH 值至 7.0–7.2。

1.2 实验方法

1.2.1 EP1 对不同染料的脱色能力初步确定: 150 mL 血清瓶(Bellco Glass, Inc., USA)装入经改进的 2216E 培养基 100 mL, 接种 2%过夜培养的 EP1 菌, 通高纯 N_2 (99.999%)除氧后, 用橡胶圈密封, 恒温 20 °C 静置培养一直到瓶内颜色基本不再变化为止(约 4 d)。通过测量初始和最终的染料特征吸收峰的吸光度, 对比标准曲线获得净脱色染料质量。净脱色染料质量除以参加脱色的 EP1 细胞干重得到单位时间单位细胞干重的脱色质量, 即为脱色容量。

1.2.2 EP1 细胞干重测量方法: 将离心管在 105 °C 下烘干(约 2 h), 质量记为 m_1 。取不同 OD_{600} 浓度的细菌培养液 V , 菌液以 8 000 r/min 离心 10 min, 弃

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

掉上清液,用去离子水淋洗菌体后再次离心获得沉淀。将离心管于 105 °C 下烘干至恒重,质量记为 m_2 , $(m_2-m_1)/(V \cdot OD_{600})$ 即为单位菌浊度单位体积的菌体细胞的干重。每个样品取 3 个平行样,得 OD_{600} 与菌体细胞干重的关系曲线。

1.2.3 脱色影响因素研究: 选择温度、pH、碳源以及 NaCl 作为主要考察因素。EP1 细胞先用改进的 2216E 培养基在 250 mL 锥形瓶内好氧培养(35 °C, 120 r/min)至对数期末期(约 1.0 OD_{600})。菌液 7 000 r/min 低温离心 5 min 获得菌泥,菌泥用脱色培养基重新悬浮后再次离心,再次离心后的菌泥用脱色培养基重新悬浮。二次淋洗-离心的目的是为了去除剩余 2216E 对脱色的影响。悬菌液分装至 150 mL 血清瓶(Bellco Glass, Inc., USA)或 15 mL 厌氧管(Bellco Glass, Inc.)中,使整个培养基体系的体积占血清瓶或者厌氧管的 2/3,通入高纯 N_2 (99.999%) 90 s 除氧,用橡胶圈密封,恒温静置培养,观察脱色情况,每隔一定时间取样并测定脱色率。

研究培养基初始 pH 对染料脱色的影响时, RM 中的 pH 实验前用 NaOH 或 HCl 溶液调整为 4.0、6.0、7.0、8.0、10.0、12.0; 设置 4 °C、15 °C、26 °C、35 °C、40 °C、45 °C 和 50 °C 共 7 个温度梯度考察温度对脱色的影响。为了研究不同碳源对 EP1 脱色性能的影响,选取葡萄糖、蔗糖、木糖、甲酸、乳酸、柠檬酸、苹果酸和琥珀酸 8 种碳源作为电子供体,代替 RM 中的乳酸钠,各碳源浓度均为 20 mmol/L。NaCl 对 EP1 脱色影响的实验中更改 RM 中的 NaCl 浓度为 0、1%、2%、4%、6%、8%,共 6 个梯度。

1.2.4 脱色率计算方法: 采用比色法确定脱色能力。从反应瓶中取出 3 mL 反应液,以 10 000 r/min 的转速离心 10 min 去除菌体,所得上层清液再用针头过滤器($\Phi 13$, 0.22 μm)过滤。以未接菌的染料培养液作对照,上清液在 200 nm–800 nm 处进行紫外-可见光谱扫描(UV1800, 日本岛津),根据 XP2R 最大吸收波长 507 nm 处吸光度,按下式计算其脱色能力:

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

式中: A_0 、 A_t 分别为初始时刻和培养 t 时刻后上清液吸光度; r 为脱色率。

2 结果与讨论

2.1 EP1 的广谱性脱色特征

EP1 对 XP2R、CR、RB19、MG 和 DY 有良好的脱色能力(表 1),效果最好的是三苯基甲烷染料 MG,脱色容量高达 925 mg/(g 细胞干重·d),其次是单偶氮染料 XP2R,达到 363 mg/(g 细胞干重·d)。此结果表明菌株 EP1 具有广谱性的脱色能力,可用于含多种染料印染废水的脱色处理。由于偶氮染料在印染行业应用范围广,普通的活性污泥法处理难度大,有些偶氮染料有“三致”毒性,所以选取单偶氮染料 XP2R 进行后续实验,并且分析降解机理。

表 1 EP1 菌株对不同染料的脱色能力比较
Table 1 Decolorization capacity of different dyes by EP1

染料 Dyes	染料分类 Dye classification	脱色容量 Decolorization capacity [mg dye/(g cell·d)]
Xylidine Ponceau 2R (XP2R)	单偶氮类 Mono-azo structure	363
Congo Red (CR)	双偶氮类 Diazo structure	156
Reactive Blue 19 (RB19)	蒽醌类 Anthraquinone dyes	100
Malachite Green (MG)	三苯基甲烷类 Triphenyl methane structure	925
Direct Yellow (DY)	直接染料 Direct dyes	375

2.2 pH 和温度对脱色性能的影响

EP1 菌株在不同 pH 下脱色 XP2R 的实验结果如图 2 所示,结果表明 EP1 在 pH 6–10 的范围内具有良好的脱色能力。最优的 pH 在 7 和 8 之间,10 h 内基本脱色完全,最大脱色率达 98%,说明 EP1 具有很快的脱色能力。实际染料废水的 pH 值波动较大,普通活性污泥法在厌氧条件下脱色较慢,EP1 能够在在一个较宽 pH 范围内快速脱色,使得 EP1 在实际印染废水的脱色处理中有较好的应用潜力。

针对含染料废水的实际水温变化大的特点,本研究试验了 4 °C、15 °C、26 °C、35 °C、40 °C、45 °C、50 °C 共 7 个温度梯度下脱色影响,结果见图 2。EP1

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

脱色XP2R的最适温度为26 °C–35 °C。当环境温度为35 °C时, 10 h内EP1菌株对XP2R的脱色率达99.5%。EP1菌株在15 °C也有较高的脱色率, 这可能是由于EP1来自近海沉积物, 能够适应相对较低的水温环境。EP1菌株在15 °C–40 °C均能够脱色, 进一步说明EP1具备应用于实际染料废水脱色处理的潜力。

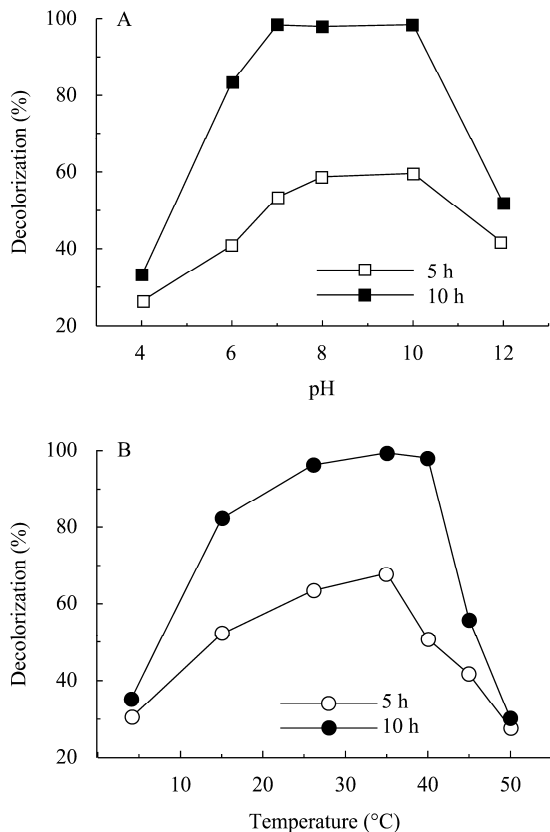


图2 初始pH(A)和温度(B)对EP1脱色性能的影响
Fig. 2 Effects of the initial pH (A) and temperature (B) on decolorization of XP2R by *S. marisflavi* EP1

2.3 不同碳源对脱色性能的影响

由图3可见, EP1菌株能够利用多种碳源将XP2R脱色。对比不同碳源6.25 h的脱色效率, 甲酸或乳酸为最优的脱色电子供体, 脱色率均为90%, 10.00 h后两者脱色率分别达到96%和97%。其次是蔗糖和葡萄糖, 6.25 h内脱色率分别为80%和73%。在10.00 h内, 以蔗糖为碳源时脱色率最高, 达到99.95%, 这是因为蔗糖为双糖, 单位摩尔的蔗糖能提供最多的电子供体。

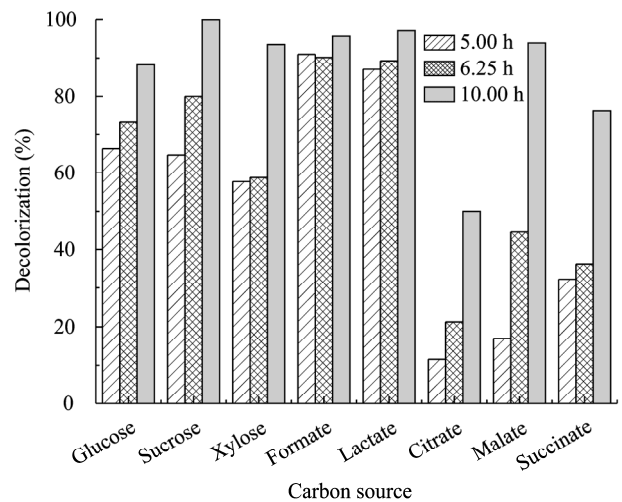


图3 不同碳源对EP1脱色性能的影响
Fig. 3 Effect of carbon sources on decolorization of XP2R by *S. marisflavi* EP1

以甲酸和乳酸为碳源时, 从5.00 h至10.00 h, EP1菌株对XP2R的脱色率只有很小幅度的增长, 说明这两种电子供体的数量不足。可以预测, 如果添加更多的甲酸和乳酸, 脱色率随着时间的延长会继续上升。乳酸既可以作为脱色的电子供体, 也可作为EP1生长的碳源, 但甲酸一般只能作为电子供体, 不适合作为EP1生长的碳源, 因此, 乳酸应该是EP1脱色的最佳碳源。有报道, 在厌氧条件下*Shewanella*细菌没有EMP代谢途径^[12], 不能利用葡萄糖、蔗糖等碳源产电。EP1能利用这些六碳糖脱色, 说明*Shewanella*的偶氮染料脱色与产电可能存在代谢机制上的差别。另外, 实验表明产电菌EP1能利用TCA循环的中间反应物柠檬酸、苹果酸和琥珀酸进行脱色, 说明TCA循环在EP1的厌氧脱色反应中起到重要作用。

2.4 NaCl 浓度对脱色性能的影响

印染废水往往含有一定量的无机盐, 高含量的无机盐会影响细胞的渗透压从而抑制细菌的生长和代谢, 盐含量高是染料废水难以处理的一个重要原因。我们在前面的研究中^[14]报道了EP1能在含盐量高达8%的条件下产电, 由于产电和脱色有着相似的胞外电子传递过程, 因此, 本文研究了NaCl浓度对脱色的影响。由图4可见, EP1在0–8%的NaCl范围内具有较好的脱色能力。脱色率先随着盐度的

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

增加而上升,当 NaCl 含量为 1%~2%时达到最佳的脱色效果,这是由于 EP1 是一株海洋细菌,比较适宜生长在有一定离子强度的环境中。从 2%到 8%,脱色率随盐度的增加而降低,表明 EP1 的脱色活性受到一定程度上的抑制。

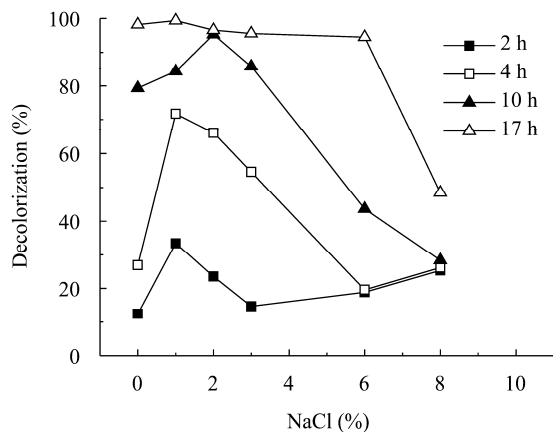


图 4 NaCl 浓度对 EP1 脱色性能的影响

Fig. 4 Effect of NaCl concentration on decolorization of XP2R by *S. marisflavi* EP1

2.5 脱色机理分析

细菌脱色机理主要包括生物吸附和生物降解两种方式。当细菌以生物吸附的方式脱色时,吸附过程中不同时间点的扫描光谱曲线将成比例下降;当

以生物降解的方式脱色,则只有一些特征峰有明显变化。染料原有的特征吸收峰将显著下降直至完全消失,同时,染料降解后产生新的中间产物,这些中间产物有的会产生新的吸收峰。由于染料结构复杂,整个降解过程可能分步进行,初始中间产物有可能又进一步分解为更小的中间产物。在扫描光谱上,表现为不同阶段的光谱会出现不同的特征吸收峰,而且其强度也会变化。由图 5 可见,随着反应的进行,波长 507 nm 处的特征吸收峰逐渐衰减,到 12 h 已经完全消失,表明 XP2R 的发色基团即偶氮键($-N=N-$)已经断裂。接种 2 h 后,213 nm 处有 1 个明显的吸收峰,在 6 h 以后,这个吸收峰基本消失而在 203 nm 出现新的吸收峰。这个吸收峰一直到 17 h 依然存在,表明 XP2R 降解后产生中间产物,但有的中间产物可能不能被 EP1 进一步分解。根据偶氮染料的生物降解原理,偶氮染料的生物氧化必须先将偶氮键断开,这是一个生物还原过程,这个还原过程一般只能在厌氧条件下进行。偶氮键的还原是偶氮染料彻底降解的限速步骤,偶氮还原产生的中间产物一般用普通活性污泥法即可完全氧化分解。EP1 能在高达 8% NaCl 浓度下降解脱色,可能得益于该菌株是一株来自海洋的产电菌。

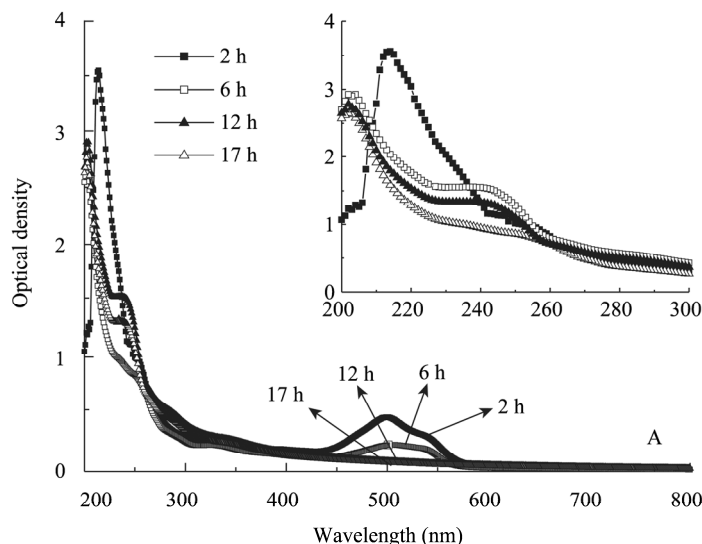


图 5 XP2R 脱色产物光谱扫描图

Fig. 5 UV-visible absorbance spectra of decolorization for XP2R by strain EP1 at 2% NaCl

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

3 结论

从厦门沿海沉积物中新筛选得到的海洋产电菌 *Shewanella marisflavi* EP1 对单偶氮染料、双偶氮染料、蒽醌染料、直接染料和三苯基甲烷染料都具有良好的脱色能力。进一步以单偶氮染料丽春红 2R 为研究对象的实验结果表明, EP1 能在较宽的 pH (6–10)、较宽的温度范围(15 °C–40 °C)和较高的盐度(高达 8% NaCl), 以降解脱色方式分解偶氮染料。因此, EP1 具有很好应用于实际染料废水的潜力。EP1 在高盐度下所显示的优良的降解脱色特性, 可能是因为该菌株是一株来自海洋的产电菌。产电菌 EP1 能利用甲酸、乳酸产电而不能利用葡萄糖、蔗糖产电, 但是本研究表明 EP1 能利用葡萄糖、蔗糖降解脱色, 说明脱色与产电在胞外电子传递机制方面, 既有相似之处又有一些差别, 其详细机理有待今后进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Lovley DR. Extracellular electron transfer: wires, capacitors, iron lungs, and more[J]. *Geobiology*, 2008, 6(3): 225–231.
- [2] Logan BE. Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7(5): 375–381.
- [3] Li ZJ, Zhang XW, Lin J, et al. Azo dye treatment with simultaneous electricity production in an anaerobic-aerobic sequential reactor and microbial fuel cell coupled system[J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101(12): 4440–4445.
- [4] Sun J, Hu YY, Bi Z, et al. Simultaneous decolorization of azo dye and bioelectricity generation using a microfiltration membrane air-cathode single-chamber microbial fuel cell[J]. *Bioresour Technol*, 2009, 100(13): 3185–3192.
- [5] Chen BY, Zhang MM, Chang CT, et al. Assessment upon azo dye decolorization and bioelectricity generation by *Proteus hauseri*[J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101(12): 4737–4741.
- [6] Pearce CI, Guthrie JT, Lloyd JR. Reduction of pigment dispersions by *Shewanella* strain J18 143[J]. *Dyes Pigments*, 2008, 76(3): 696–705.
- [7] Coates JD, Phillips EJ, Lonergan DJ, et al. Isolation of *Geobacter* species from diverse sedimentary environments[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(5): 1531–1536.
- [8] Holmes DE, Nevin KP, Lovley DR. Comparison of 16S rRNA, *nifD*, *recA*, *gyrB*, *rpoB* and *fusA* genes within the family *Geobacteraceae* fam. nov.[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, 54(5): 1591–1599.
- [9] Wu J, Kim KS, Sung NC, et al. Isolation and characterization of *Shewanella oneidensis* WL-7 capable of decolorizing azo dye Reactive Black 5[J]. *J Gen Appl Microbiol*, 2009, 55(1): 51–55.
- [10] Kim HJ, Hyun MS, Chang IS, et al. A microbial fuel cell type lactate biosensor using a metal-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 1999, 9(3): 365–367.
- [11] 王彪, 黄杰勋, 章晓波, 等. 一株海洋产电菌 *Shewanella* sp. S2 的筛选和产电分析[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(3): 342–348.
- [12] Nealson KH, Scott J. Ecophysiology of the genus *Shewanella*[J]. *The prokaryotes*, 2006, 6: 1133–1151.
- [13] 许玫英, 钟小燕, 曹涓, 等. 脱色希瓦氏菌 (*Shewanella decolorationis*) S12^T 的脱色特性[J]. *微生物学通报*, 2005, 32(1): 5–9.
- [14] Huang JX, Sun BL, Zhang XB. Electricity generation at high ionic strength in microbial fuel cell by a newly isolated *Shewanella marisflavi* EP1[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 85(4): 1141–1149.
- [15] Bond DR, Lovley DR. Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(3): 1548–1555.