

# 藻对偶氮染料降解作用的研究

刘金齐 刘厚田

(中国环境科学研究院, 北京 100012)

## 提 要

本实验系统地研究了藻对偶氮染料的降解作用。实验结果表明,藻对多种偶氮染料具有一定的降解作用,其降解程度与染料的结构和藻的种类等因素有关。通过降解机理的研究表明,藻能够利用偶氮还原酶,作用于偶氮染料的偶氮双键,使其断裂,形成芳香胺类中间产物。藻还可以进一步利用芳香胺类物质。

本研究结果启示,应重新评价藻在氧化塘降解有机物质过程中所起的作用,即在氧化塘中,藻不仅起供氧作用,还能够直接参与有机物质的降解。

**关键词** 藻,偶氮染料,降解,偶氮还原酶,芳香胺

近年来,随着染料的数量和品种不断增多,印染废水造成的环境污染日趋严重。目前,全世界投放市场的染料品种多达30000种,每年以废弃物排放到环境中的染料约有 $6 \times 10^3$ kg。染料种类繁多,在各类染料中,偶氮染料占80%以上,它们在印染工业及其它一些行业中,应用广泛。由于其可生物降解性较低,在环境中不断积累,严重污染环境,特别是水环境,进而对各类生物乃至人类的健康造成危害<sup>[7,9]</sup>。因此,染料废水的净化日益得到广泛重视,并相继发展了各种处理方法<sup>[2]</sup>,其中生物法具有操作简单,成本低的特点,所以应用比较普遍。

有关偶氮染料的生物降解,研究较多的是细菌的降解作用。到目前为止,国内外已经分离出许多具高效降解活性的菌株,它们在印染废水的净化中起着重要作用<sup>[1,4]</sup>。

关于偶氮染料的细菌降解机理,国外已有人做过系统的探讨<sup>[5,6,12]</sup>。提出了偶氮化合物→芳香胺类物质→简单化合物的细菌降解途径,其中在偶氮化合物转变成芳香胺的过程中,需要偶氮还原酶的参与。

本工作研究藻对偶氮染料的降解作用,旨在为利用藻净化染料废水提供科学依据。

## 材 料 与 方 法

### (一) 藻种

选用蛋白核小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa*), 小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 以及小

颤藻 (*Oscillatoria tenuis*) 作为实验藻种。藻种系由中国科学院水生生物研究所藻种库提供。

## (二) 藻的培养与驯化

选用朱氏 10 号培养基, 进行纯种无菌培养。培养液中加入一定浓度的染料, 接入纯种藻液, 在 pH7.5, 温度 25℃, 光强 6000lx 条件下进行驯化培养, 光暗周期为 14:10h。

## (三) 染料

选择偶氮染料三十余种(表 1), 进行脱色试验。选取其中两种脱色效果较好的染料(铬黑 T 和铬蓝 SE) 进行深入研究。染料系由北京化学试剂商店及北京市毛纺研究所提供。

## (四) 藻对偶氮染料脱色能力的测定

将藻种接入含染料的培养液中, 接种密度为  $10^5$  个/ml, 染料浓度为 20ppm, 无菌培养 96h。将培养液在 5000r.p.m 下离心 15min, 用分光光度法测其上清液的光密度, 将未加藻的染料液做空白, 计算脱色率。

## (五) 藻对染料脱色作用的条件实验

选取三种与藻生理活动关系密切的环境因子 (pH、温度及光照强度) 进行测试。其中 pH 系列为 4.0, 6.8, 7.5, 9.0 和 10.0; 温度系列为 10, 20, 25, 30 和 35℃; 光照强度系列为 2000, 4000, 6000, 8000 和 10,000lx。利用正交试验方法, 选用  $L_{25}(5^6)$  表, 进行各种组合试验。染料浓度为 10ppm。培养 96h, 观测脱色结果, 确定脱色率。

## (六) 藻对染料的利用试验

在培养液中不加碳、氮源或将碳、氮源含量减至正常含量的 1/2 或 1/5, 加入铬蓝 SE 或铬黑 T(10ppm), 接入藻种, 培养后观测脱色效果, 计算藻对染料的脱色活性。

## (七) 染料脱色产物的测定

将经藻作用后的含染料培养液, 离心, 对一部分上清液用 UV-240 分光光度计测定紫外吸收光谱。对另一部分上清液通过 G. D. X-104 柱处理, 然后利用傅立叶红外光谱分析仪 (NICOLET, FT-IR) 测定红外吸收光谱, 进而确定降解产物的结构。

## (八) 藻偶氮还原酶的制备和活性测定

偶氮还原酶粗制剂的制备按 Eiichi Idaka 等的方法<sup>[10]</sup>, 稍加改进。

酶反应系统包括: 液液 3ml, 铬蓝 SE(10ppm) 1ml, NADH 或 NADPH (0.01mmol) 0.5ml, 37℃ 下保温 60min。在 530nm 处测定光密度变化, 计算脱色率及脱色活性。

## (九) 藻对芳香胺的利用

在含 5ppm 苯胺的培养液中, 接入藻种, 培养 96h, 将培养液离心, 取上清液用高压液

相色谱 (Varian 5500) 进行测定。柱型为 Micropak spc-13, 柱形为 4.6mm×150mm, 填料为 5 $\mu$ m, 流动相为 35% 水和 65% 甲醇→0% 水和 100% 甲醇, 梯度为 2%·分<sup>-1</sup>, 检测器为 UV-200。

## 结 果

### (一) 藻对染料的脱色作用

利用小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 对 33 种偶氮化合物进行脱色试验。结果见表 1。可以看出, 藻对其中大部分染料具有一定的脱色能力。难脱色的 (脱色率 < 20%) 有 12

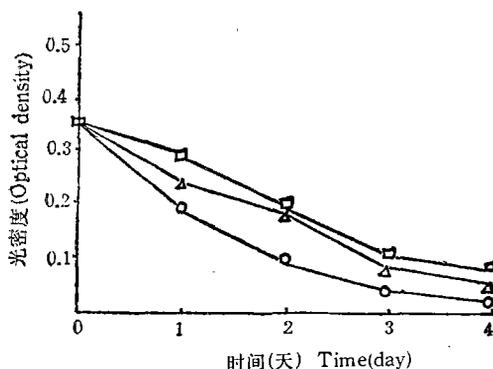


图 1 藻对铬蓝 SE 的脱色作用

Fig. 1 The decolorization of ERIOCHROME blue SE by algae

○—○ *Oscillatoria tenuis*;  
 △—△ *Chlorella vulgaris*;  
 □—□ *Chlorella pyrenoidosa*

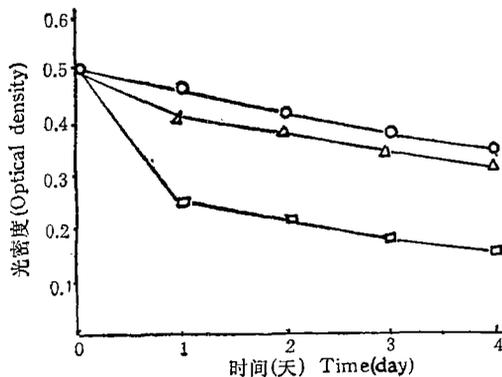


图 2 藻对铬黑 T 的脱色作用

Fig. 2 The decolorization of ERIOCHROME black T by algae.

○—○ *Chlorella pyrenoidosa*;  
 △—△ *Chlorella vulgaris*;  
 □—□ *Oscillatoria tenuis*

表 1 藻对偶氮化合物的降解作用  
Tab. 1 Algae degradability of azo compounds

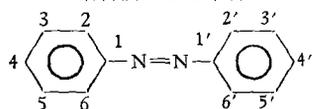
序号 No.	偶氮化合物 Azo compounds	结构特征 Characteristics of structure	测定波长 Observed wave length (nm)	脱色率 Percent degradation (%)
1	$\alpha$ -萘红	4-NH <sub>2</sub>	445	63
2	2,4-二氨基偶氮苯 盐酸盐	2,4-(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	447	50
3	对氨基偶氮苯	4-NH <sub>2</sub>	374	48
4	4-羟基偶氮苯	4-OH	347	55
5	试镁剂 II	4-OH	477	67
6	苏丹 III	2''-OH	348	41
7	苏丹 II	2',4'-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	485	5
8	对甲基红	4'-N-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	466	0
9	甲基红	4'-N-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	430	0
10	甲基黄	4-N-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	446	18
11	对甲氧基偶氮苯	4'-O-CH <sub>3</sub>	350	20
12	苯胺偶氮苯磺酸	4'-SO <sub>3</sub> Na, 4-NH <sub>2</sub>	470	40
13	铬黑 T	4-SO <sub>3</sub> Na, 2-OH, 2'-OH	527	76
14	铬蓝 SE	6'-SO <sub>3</sub> Na, 9'-SO <sub>3</sub> Na 2-OH, 2',7'-(OH) <sub>2</sub>	530	95
15	橙黄 I	4'-SO <sub>3</sub> Na, 4-OH	475	62
16	直接耐晒蓝 B <sub>2</sub> RL	6',9'-(SO <sub>3</sub> Na) <sub>2</sub> , 9''-SO <sub>3</sub> Na 2'''-OH, 9''''-NH <sub>2</sub>	587	100
17	直接耐酸大红 4BS	1'-SO <sub>3</sub> Na, 8''-SO <sub>3</sub> Na 6'-OH, 10'-OH	507	88
18	直接橙 S	6'-SO <sub>3</sub> Na, 9''-SO <sub>3</sub> Na 2'-OH, 7'''-OH	494	80
19	直接耐晒黑 G	6'',9''-(SO <sub>3</sub> Na) <sub>2</sub> , 2'-NH <sub>2</sub> , 2'''-NH <sub>2</sub> , 7'-OH, 2''''', 4''''-(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	514	79
20	直接深棕 NM	6''-SO <sub>3</sub> Na, 2''-NH <sub>2</sub> 4-OH, 2''-OH	391	65
21	铬黑 PV	5-SO <sub>3</sub> Na, 2-OH 2',10'-(OH) <sub>2</sub>	533	60

续表 1

序号 No.	偶氮化合物 Azo compounds	结构特征 Characteristics of structure	测定波长 Observed wave length (nm)	脱色率 Percent degradation (%)
22	苋菜红	4-SO <sub>3</sub> Na, 3', 9'-(SO <sub>3</sub> Na) <sub>2</sub>	522	20
23	苜橙	4-SO <sub>3</sub> K	441	7
24	茜素黄 GG	5-NO <sub>2</sub>	354	17
25	酸性黄 GG	/	402	19
26	酸性红 G	/	531	25
27	酸性蓝 GBA	/	623	30
28	媒介黄 GG	/	358	24
29	媒介宝蓝 BFT	/	428	17
30	媒介红 B	/	510	35
31	普拉黄 GG	/	438	40
32	普拉红 B	/	526	64
33	普拉蓝 BANL	/	580	20

[注] 1.(/): 结构不详 (Structure is not known)

2.表中结构按 原则命名 Nomenclature of the structures in this table is based on:



种,可部分脱色的(脱色率 20—70%)有 16 种,易脱色的(脱色率 >70%)有 6 种。

从表 1 可以看出,藻对偶氮染料的脱色程度与染料本身的结构有关。带有一OH, 一NH<sub>2</sub>的偶氮化合物脱色率较高,如 1—6 号染料;而带有一CH<sub>3</sub>, 一O—CH<sub>3</sub>, 一NO<sub>2</sub> 和一SO<sub>3</sub>的偶氮化合物脱色效果较差,如 7—11 号及 23—24 号染料。某些偶氮化合物由于氨基或羟基的存在,可以抵消磺酸基对脱色的抑制作用,如 12—21 号染料。

利用脱色效果较好的两种偶氮染料(铬蓝 SE 和铬黑 T),进行不同藻对偶氮染料脱色作用的比较试验,结果如图 1 和图 2 所示。可以看出,这三种藻对两种染料均有较强的脱色作用,但脱色程度有所差异。对铬蓝 SE 的脱色效果均高于铬黑 T,并且蓝藻(小颤藻)的脱色能力大于两种绿藻(小球藻及蛋白核小球藻)。

## (二) 环境条件对藻脱色作用的影响

选取影响藻生理活动的三种重要环境因子(温度、光强、pH)进行研究。将一种蓝藻和两种绿藻作为试验藻种,采用  $L_{25}(5^6)$  正交表,对两种染料进行脱色试验。将所有脱色率数据进行统计分析,表明在试验条件范围内,pH、温度及光照强度对藻脱色能力产生影响的顺序为  $\text{pH} > \text{温度} > \text{光强}$ ,即 pH 起主导作用。

通过统计分析,可以确定三种藻降解铬蓝 SE 及铬黑 T 的最佳条件,如表 2 所示。

表 2 藻降解偶氮染料的最佳条件

Tab. 2 The optimum conditions for azo-dye decolorization by algae

藻 Algae	Chlorella vulgaris		Chlorella pyrenoidosa		Oscillatoria tenuis	
	染料 Dye					
	blueSE	blackT	blueSE	blackT	blueSE	blackT
条件 Condition						
pH	9.0	7.5	6.8	9.0	6.8	7.5
温度(°C) Temperature	30	30	25	25	35	30
光强 (lx) Intensity of illumination	10,000	8000	8000	6000	10,000	8000

注: blueSE; ERIOCHROME blue SE; blackT; ERIOCHROME blackT。

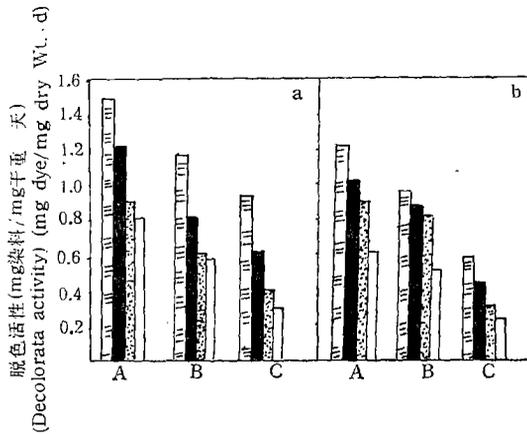


图 3 藻对染料的利用

Fig. 3 Utilization of azo-dye by algae

A: *Oscillatoria tenuis*, B: *Chlorella vulgaris*

C: *Chlorella pyrenoidosa*

▨ 不加 C,N (No inorganic C,N); ■ 加 1/5 C,N (1/5C,N of normal content);

▤ 加 1/2 C,N (1/2C,N of normal content); □ 正常 C,N (Normal C,N)

a 铬蓝 SE (ERIOCHROME blueSE); b 铬黑 T (ERIOCHROME blackT)

将各组数据进行方差分析。结果表明，上述三种藻在降解铬蓝 SE 及铬黑 T 的过程中，对 pH、温度及光强的适应范围较宽，在 pH6.8—10，温度 20—35℃，光强 4000—6000 lx 范围内，脱色效果并无显著差异。

(三) 作为碳、氮源，藻类对染料的利用

在无机碳、氮源含量不同的各组培养液中，藻对染料的脱色活性如图 3 所示。可见在不加无机碳、氮源的培养液中，藻对染料的脱色活性最大。说明三种藻均能以铬蓝 SE 及铬黑 T 作为唯一碳源及氮源，也表明藻对染料的脱色作用与藻本身的生理代谢过程有关。

(四) 染料降解的产物

将经过颤藻和小球藻作用之后的偶氮染料

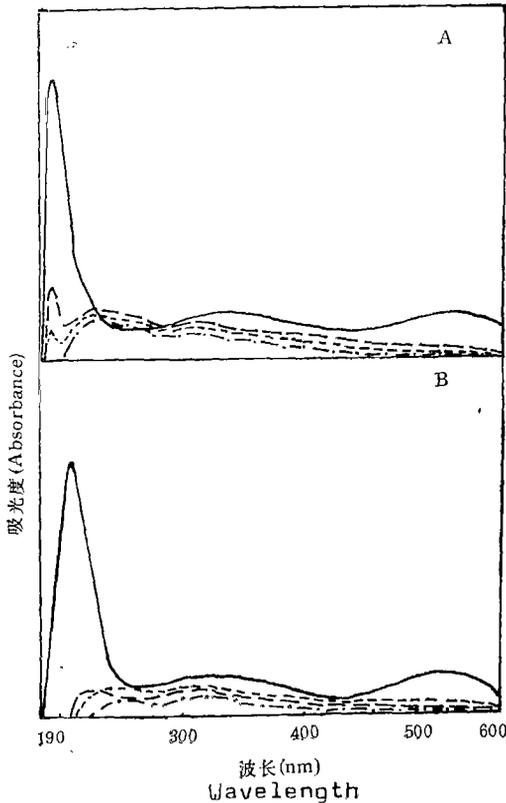


图 4 偶氮染料经藻作用前后的紫外图谱  
 Fig. 4 UV-spectra of azo-dye before and after algae treatment  
 A 铬黑 T (ERIOCHROME blackT); B 铬蓝 SE (ERIOCHROME blueSE)  
 —对照 (Control) --- *Chlorella vulgaris* --- *Chlorella pyrenoidosa* -- *Oscillatoria tenuis*

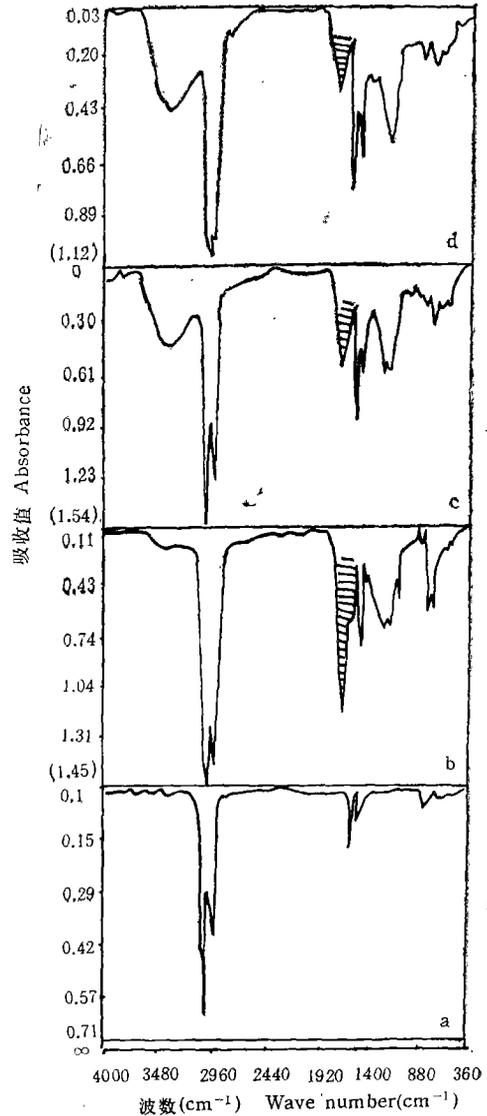


图 5 偶氮染料经藻作用前后的红外光谱  
 Fig. 5 Infrared spectra of azo-dye before and after algae treatment

料培养液进行紫外分光光度法分析,结果如图 4。染料经过藻作用后,在紫外-可见光范围内的吸收光谱产生了明显变化,表明染料分子结构已发生重大改变。

利用红外光谱进一步分析反应产物的结构(图 5)。采用石蜡油作为测试介质。a 即为石蜡油的本底红外图谱, c、d 分别为铬蓝 SE 经颤藻及小球藻作用后的红外图谱。与 b 相比,在 c、d 谱图上,3500—3100nm 波长范围内新出现一明显宽峰,此峰代表芳香伯胺的-N-H 的伸缩振动峰,并且在 1630—1575nm 波长范围内的偶氮双键的伸缩振动峰明显减小(图中阴影部分),这表明铬蓝 SE 经藻作用后,原来的偶氮双键发生断裂,形成芳香胺类化合物。

### (五) 偶氮还原酶的作用

利用小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 和铬蓝 SE 进行偶氮还原酶活性研究。结果见表 3。酶粗制剂本身具有较高的偶氮还原活性。在加入外源辅酶 NADH 或 NADPH 后,这种活性明显提高。说明藻类偶氮还原酶能以 NADPH 或 NADH 作为电子供体,裂解偶氮键。并且 NADPH 的作用要强于 NADH 的作用。

未经驯化的藻其偶氮还原酶活性较低(图 6)。表明小球藻的偶氮还原酶是一种诱导酶。底物可以作为酶的诱导物,经过诱导后,酶的活性明显提高。

### (六) 藻对芳香胺的利用

将经过蓝藻及绿藻作用前后的苯胺进行高压液相色谱分析,结果见图 7。经藻作用后,苯胺的色谱峰面积接近或等于零,并且未检出其它有机物的存在,说明这三种藻均可以有效地降解苯胺,使其形成简单的无机物。

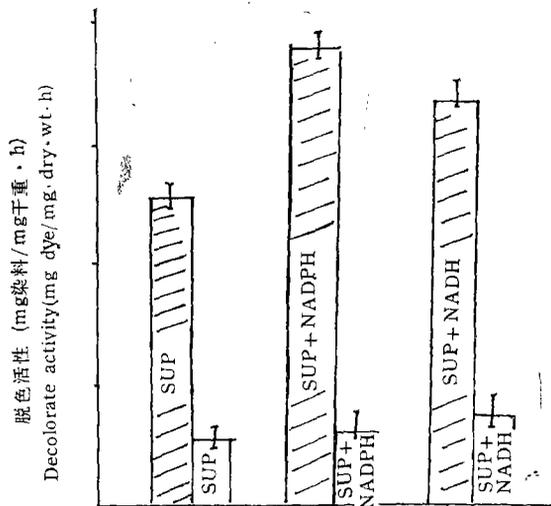


图 6 驯化前后偶氮还原酶活性变化

Fig. 6 The change of azo reductase activity before and after acclimation

▨ 驯化后 (After acclimation) □ 驯化前 (Before acclimation)

表 3 藻偶氮还原酶对染料的脱色活性

Tab. 3 The decolorization activity of alga-azoreductase

偶氮还原酶 Azoreductase	脱色率 (%) Percent decolorization	活性(mg 染料/mg 干重·h) Activity (mg dye/mg dry wt·hr)
酶液 Enzyme solution	50	2.6
酶液+NADPH (0.01nmol) Enzyme solution	94	3.8
酶液+NADH (0.01nmol) Enzyme solution	85	3.4
NADPH (0.01nmol)	0	0
NADH (0.01nmol)	8	0.25

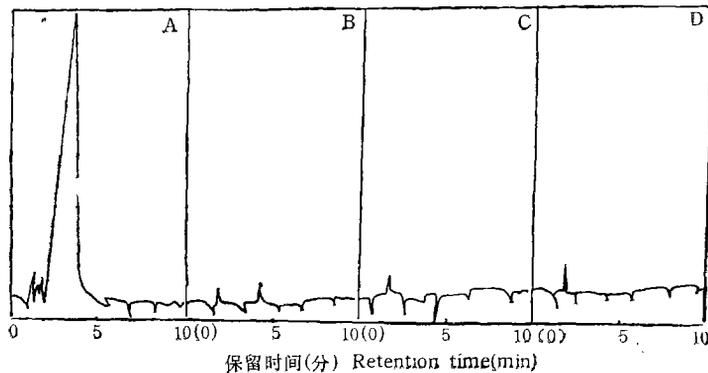


图 7 苯胺经藻作用前后的高压液相色谱

Fig. 7 HPLC of aniline before and after algae treatment

- A 接种前 (Before inoculation);  
 B *Chlorella pyrenoidosa*;  
 C *Chlorella vulgaris*;  
 D *Oscillatoria tenuis*

## 讨 论

关于藻能否净化偶氮染料废水,研究得很多。曾有人利用颤藻来降低染料废水的色度,取得了一定的效果<sup>[2]</sup>。祝玉柯等曾尝试利用三种颤藻制成藻类转盘<sup>[3]</sup>,进行印染废水的处理,发现这种装置对于废水的 BOD<sub>5</sub> 及 COD 的去除均能取得令人满意的效果。但上述工作均未在无菌条件下进行,所以不能判定是否仅是藻对染料的作用。而有关藻对偶氮染料降解的深入研究工作尚未见报道。

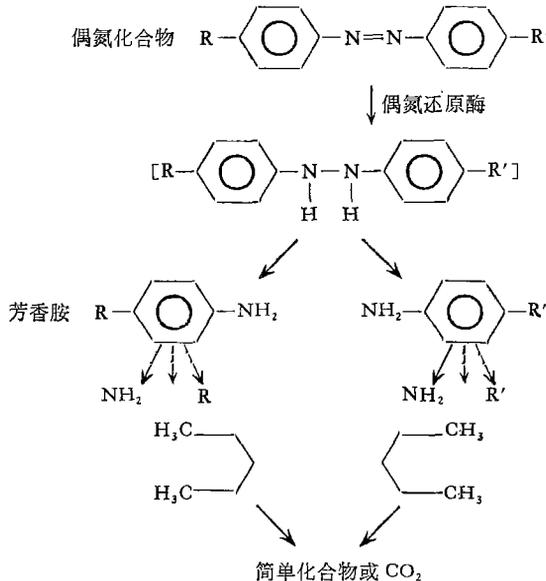
藻对偶氮染料的降解受三方面因素的制约:1)染料可降解性,主要决定于其分子结构特征;2)藻对染料的利用能力,主要取决于其代谢特点;3)环境条件的影响。本研究分别从这三方面进行了较系统的研究,发现在诸多方面都类似于偶氮染料的细菌降解过程。

有关染料结构对其可生物降解性的影响,前人已经做过细菌学方面的工作。Urushigawa 等人观测了细菌对不同结构的染料脱色效果的差异<sup>[13]</sup>,发现带有羟基和氨基的偶氮化合物较易被脱色,而带有甲基、甲氧基、磺酸基和硝基的衍生物则不易被脱色。本工作利用小球藻对 30 余种偶氮化合物进行脱色试验,所得结果与上述结论一致。

有许多研究证实,细菌对偶氮染料的降解速率取决于其细胞对染料的透性。细菌对染料的脱色过程可能包括两个步骤<sup>[14]</sup>: 1)染料从外部介质穿过细胞壁到达质膜的移动,这种移动的强度取决于胞壁对染料的吸附-解吸附的动态平衡;2)跨膜运输,这种运输与染料分子的结构特征有关。磺化染料能阻碍膜运输,因而其脱色效果较差<sup>[14]</sup>。本研究发现,藻对磺化染料的降解能力较低,这可能与磺化染料较难通过藻细胞膜有关。

本研究发现,藻可以利用某些偶氮化合物作为唯一的碳源和氮源。藻对偶氮染料的作用,首先是通过偶氮还原酶使偶氮双键断裂,形成芳香胺类化合物。藻还能进一步使芳香胺得到降解。这一系列过程都与细菌对偶氮化合物的降解机制相类似<sup>[11,13]</sup>。

有关芳香胺生物降解的最终产物,许多研究者进行了探索性工作。Kulla 以几种不同位置的 <sup>14</sup>C 标记的偶氮染料为底物,利用假单胞菌 KF<sub>46</sub> 和 KF<sub>22</sub> 进行降解试验<sup>[11]</sup>。结果表明,有些芳香胺可以被彻底降解生成 CO<sub>2</sub>,但更多的是形成其它中间产物。关于藻对芳香胺作用的最终产物,尚有待深入研究。本工作证明,藻能使苯胺降解成简单无机物。根据本研究结果,可将藻降解偶氮染料的过程图解如下,其中某些细节尚有待证实。



应用氧化塘处理印染废水,已取得一定成效<sup>[13]</sup>。长期以来,普遍接受的观点是,在氧化塘藻菌共生系统中,有机物的降解是由菌类完成的,而藻主要通过光合作用,增加水体的溶解氧,为好气微生物的降解活动提供条件<sup>[18]</sup>。

本研究结果发现,藻本身能直接参与偶氮染料的降解,这启示我们,应该重新评价藻类在氧化塘净化有机物质过程中的作用。

印染厂排放废水的 pH 值等因素变化很大,这就需要参与印染废水净化的生物对环

境条件的胁迫具较强的适应能力。本研究的结果表明,藻在降解偶氮染料的过程中,对pH,光强及温度均有较宽的适应范围。因此,在一定条件下,藻能保持较高的降解偶氮化合物的活性。这为有效利用藻菌共生系统降解印染废水提供了科学依据。

### 参 考 文 献

- [1] 刘志培、杨惠芳,1987。偶氮染料的微生物降解。环境污染与防治,9(2): 2—5。
- [2] 顾鼎言,1985。印染废水处理。中国建筑工业出版社。P28—216。
- [3] 祝玉柯、谢淑琦、董建国,1979。藻类转盘处理印染废水的初步试验。环境科学,6: 37—41。
- [4] 鲜海军、杨惠芳,1988。多种染料的微生物脱色研究。环境科学学报,8(3): 266—274。
- [5] Brown D. and Hamburger B., 1987. The degradation of dyestuff: Part3-Investigation of their ultimate degradability. *Chemosphere*, 16(17): 1539—1553.
- [6] Brown D., 1983. The degradation of dyestuff part I: Primary biodegradation under anaerobic conditions. *Chemosphere*, 12(3): 397—404, 404—414.
- [7] Brown D., 1987. Effects of colorants in the aquatic environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 13: 139—147.
- [8] Govidan V. S., 1979. Studies on the treatment of textile mill wastewaters by stabilization pond method. *Indian J. Environ. Health*, 21(4): 321—331.
- [9] Hitz H. R., 1978. Publication sponsored by ETAD, The adsorption of dyes on activated sludge, JSDC, 71—76.
- [10] Idaka E., Horitsu H. and Ogawa T., 1987. Some properties of azoreductase produced by *Pseudomonas cepacia*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 39: 982—989.
- [11] Kulla, H. G., 1983. Interference of aromatic sulfo groups in the microbial degradation of the azo dyes Orange I and Orange II. *Arch. Microbiol.*, 135: 1—7.
- [12] Pagga U. and Brown D., 1986. The degradation of dyestuff: part II: Behavior of dyestuff in aerobic biodegradation tests. *Chemosphere*, 15(4): 479—491.
- [13] Urushigawa Y. and Yonezawa Y., 1977. Chemo-biological interaction in biological purification system II. Biodegradation of azo compound by activated sludge. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 17: 214—218.
- [14] Wuhrmann K., 1980. Investigation on rate-determining factors in the microbial reduction of azo dyes. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 9: 325—333.

## A STUDY OF THE DEGRADATION OF AZO DYES BY ALGAE

Liu Jinqi and Liu Houtian

(Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012)

### Abstract

This paper systematically studied the decolorization of azo-dye by algae.

It was observed that algae can decolorize most azo-dyes to some extent, and the decolorization is dependent on several factors such as the structure of dye and species of algae.

It was shown that the azo reductase of algae can act on the nitrogen-nitrogen double bond of azo-dye, and degrade it into aromatic amine. The breakdown products of aromatic amine can be further utilized by algae.

The results suggested that it is necessary to re-estimate the role of algae in the elimination of organic matters in the lagoon. The algae can not only provide oxygen, but also directly participate in the degradation of organic matters.

**Key words** Algae, Azo-dye, Degradation, Azo-reductase, Aromatic amine