

硫酸盐还原菌对多种染料厌氧脱色的特性*

贾省芬 杨惠芳 刘双江

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080 E-mail: yanghf @ sun im. ac. cn)

摘要 研究专性厌氧菌硫酸盐还原菌混合培养物对偶氮染料、三苯甲烷染料、蒽醌染料的脱色作用。在菌的生长过程中, 随着硫化氢的形成, 染料的脱色率不断增长。分别测定了完整细胞和上清液对5种染料的脱色能力。当上清液中含有硫化氢时, 在1h内不同染料(50mg/L)的脱色率可达25.58%—98.8%; 而完整细胞的脱色率则为6.99%—80.60%。由此表明, 在厌氧硫酸盐还原条件下, 硫酸盐还原菌及其产物硫化氢对染料的脱色均有重要作用。完整细胞对10种结构不同的染料(50mg/L)的半脱色时间为0.5—32.6h, 甚至更长, 脱色的最适温度和pH分别为30和8.0, 严格厌氧; 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸对脱色具有促进作用, 粗酶液对酸性红B₂GL脱色比活(染料/蛋白)为0.87 μ g/(mg $\cdot$ min), 米氏常数 K_m 值为14mmol/L。

关键词 硫酸盐还原菌, 染料, 厌氧脱色, 硫化氢。

The Properties of Decolorization of Dyes by Sulfate-Reducing Bacteria

Jia Shengfen Yang Huifang Liu Shuangjiang

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080 E-mail: yanghf @ sun im. ac. cn)

Abstract The decolorization of azo dyes, tribenzic methane dyes and anthracene dyes by anaerobic bacteria, sulfate-reducing bacteria (SRB) were studied in this paper. In the anaerobic growth of SRB, the decolorization rates of dyes increased with the forming of H₂S. The decolorizing abilities of intact cells and supernatant for 5 dyes were also determined, the results showed that the decolorization rates of these dyes (50mg/L) by supernatant containing H₂S were 25.58%—98.8% within reaction for 1h, and those by intact cells were 6.99%—80.60%. It was found that both of cells and H₂S producing from the bacteria acted important roles in the decolorization of dyes. The half decolorization times for 10 different dyes by intact cells lay from 0.5 to 32.6h or more. The optimum temperature and pH were 30 and 8.0, respectively. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) could improve the decolorizing activities. The specific activity and Michaelis-Menten Constant (K_m) value of crude enzyme for Acid Red B₂GL were 0.87 μ g/(mg $\cdot$ min) and 14mmol/L, respectively.

Keywords sulfate-reducing bacteria, dyes, anaerobic decolorization, H₂S.

硫酸盐还原菌(Sulfate-reducing bacteria, SRB)是一群营养广泛的专性严格厌氧菌, 在厌氧环境中可把 SO_4^{2-} 还原成 S^{2-} , 从而获取细胞生长代谢的能量^[1]。近年来, 随着对厌氧环境中难降解有机物的生物降解研究的不断深入, Evans^[2]综述了SRB对苯甲酸、苯乙酸、3-苯丙酸、羟基苯甲酸等多种芳香化合物的降解, 以及其降解芳香化合物的联合代谢作用。最近, Mort^[3]报道了从污染沉积物中分离到的SRB

对酚类化合物的生物降解作用。合成染料是化学结构复杂的化合物, 其微生物脱色和降解已有一些研究, 大多集中在兼性厌氧菌, 如假单胞菌^[4-5]、芽孢杆菌^[6]以及光合细菌^[7]。至今, 国内外鲜见有SRB对多种染料的脱色和降解的研究报道。

* 国家自然科学基金资助项目(Project Supported by National Natural Science Foundation of China): 29577291
贾省芬: 女, 55岁, 副研究员
收稿日期: 1997-12-26

本文分离到3株SRB菌株,研究了他们的混合培养物对偶氮、三苯甲烷、蒽醌等3类不同染料的厌氧脱色能力及其脱色活性.

1 材料和方法

(1)菌种和培养基 硫酸盐还原菌 L1、L2 和 L3由本组从北京市高碑店污水处理厂污泥中分离得到.

培养基成分(g/L): K₂HPO₄, 0.5; NH₄Cl, 1.0; Na₂SO₄, 0.5; CaCl₂•2H₂O, 0.1; MgSO₄•7H₂O, 2.0; C₃H₅O₃Na, 3.5; 酵母浸提物, 1.0; Vc, 0.01; Fe (NH₄)₂ (SO₄)₂ • 6H₂O, 0.1; Na₂S₂O₄, 0.1; 染料, 50mg/L.

(2) 试验所用染料列于表1.

表1 试验所用染料

染料名称	结构类型	最大波长/ nm
酸性红 B ₂ GL	单偶氮	518
活性艳橙 KN-4R	单偶氮	486
酸性媒介棕 RH	单偶氮	440
媒介黄 GG	单偶氮	360
直接耐晒蓝 B ₂ RL	双偶氮	586
直接耐晒黑 G	双偶氮	589
孔雀石绿	三苯甲烷	617
媒介漂蓝 B	三苯甲烷	426
活性艳蓝 X-BR	蒽醌类	620
活性艳蓝 KGR	蒽醌类	600

(3)SRB 的分离 加定量泥样于培养液

中, 30 摇床培养7—14d, 连续富集培养3—4代后采用滚管法分离单菌落并在显微镜下和营养牛肉汁琼脂平板上检查菌的纯度.

(4) 完整细胞悬液和无细胞提取液的制备

取30 、24h 厌氧培养液, 5000 × g 离心收集细胞, 用 pH7.0的磷酸缓冲液洗涤2次, 悬浮于相同缓冲液中即为完整细胞悬液. 将完整细胞悬液用细胞破碎机冷冻破碎, 19000 × g 离心30min, 上清液为无细胞提取液, 以下统称粗酶液.

(5) 脱色活力的测定 在各染料的最大吸收峰处, 测定反应前后的光密度并换算成脱色百分率. 完整细胞脱色活性以染料/ 细胞(μg/ mg) 表示; 无细胞提取液的脱色比活以染料/(蛋白 × 时间) (μg/ (mg•min)) 表示.

(6) 蛋白质含量的测定采用 Bradford 法^[8].

(7) 硫化氢的测定采用比色法^[9].

2 结果和讨论

2.1 SRB 的分离筛选

利用所分离的30余株SRB对5种偶氮染料进行生长脱色试验. 并选取3株脱色能力较高的L1、L2、L3作为试验菌株. 从表2结果中可以看出, 所选出的3株较优菌株对所试5种偶氮染料均有较好脱色效果. 单菌株与混合菌相比, 后者效果更佳. 在以后的试验中均使用3株混合菌种.

表2 分离菌株对5种偶氮染料的脱色率¹⁾/ %

菌号	酸性红 B ₂ GL	活性艳橙 KN-4R	活性艳红 X-3B	酸性媒介棕 RH	直接耐晒蓝 B ₂ RL
L1	99.03	77.01	80.00	68.22	67.02
L2	99.15	80.32	84.55	70.33	70.15
L3	99.38	85.22	86.03	70.99	69.39
混合菌	100.0	88.52	89.77	74.03	73.85

1) 染料浓度为50mg/ L, 30 , 48h 生长脱色结果

2.2 SRB 对染料脱色的特性

(1)SRB 菌体和产物 H₂S 的脱色作用 将3株SRB混合培养48h后, 台式离心机

10000r/ min离心10min, 分别用含50mg/ L 酸性红 B₂GL的溶液测定洗涤过的完整细胞、上清液和赶去H₂S的上清液的脱色率. 表3的结果

表3 SRB 对染料的脱色¹⁾ / %

染料名称	培养液	离心上清液	赶去 H ₂ S 的上清液	完整细胞
酸性红 B ₂ GL	100. 0	98. 80	0. 00	80. 60
活性艳橙 KN-4R	49. 88	40. 22	0. 00	12. 72
活性艳红 X-3B	65. 11	58. 08	0. 00	20. 66
酸性媒介棕 RH	32. 63	26. 06	0. 00	7. 10
直接耐晒蓝 B ₂ RL	30. 62	25. 88	0. 00	6. 99
H ₂ S 含量/ mg·L ⁻¹	68. 80	49. 34	0. 00	

1) 染料浓度为50mg/ L, 细胞浓度为20mg/ ml(湿), 反应1h

表明, 上清液的脱色作用要比完整细胞强, 脱色率约高13%—37. 42%; 而赶去 H₂S 的上清液无脱色作用, 定量测定的结果表明它不含有 H₂S. 由此可见, SRB 菌体和产生的 H₂S 对染料都具有脱色作用.

(2)SRB 生长过程中对染料的脱色 进行 SRB 混合菌在厌氧生长过程中对酸性红 B₂GL 的脱色作用实验. 在厌氧条件下, 硫酸盐作为电子受体. 分别测定 SRB 的菌量、H₂S 含量和染料的脱色率. 图1可见: 菌的生长在24—36h 后基本达到平衡, 在36h 后 H₂S 开始大量形成, 72h 可达112mg/ L. 脱色率的增长与 H₂S 的生成率趋于一致. 此结果进一步证明 SRB 在还原硫酸盐时, 其产物 H₂S 对染料的脱色起着重要作用.

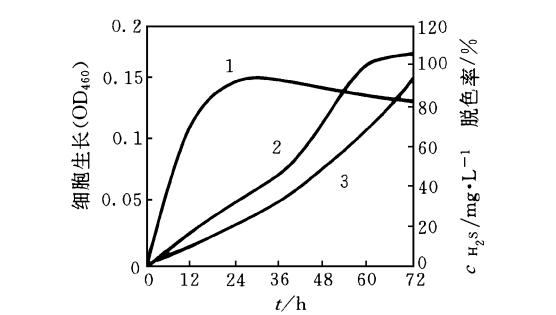


图1 SRB 在生长过程中对酸性红 B₂GL (300mg/ L) 的脱色
1. 菌量 2. H₂S 3. 脱色率

2. 3 SRB 对多种染料的脱色

用完整细胞对10种结构不同、分子量不同的染料进行脱色 试验(结果见表4). 表4表明: SRB 能使不少种类的染料脱色, 单偶氮染料脱色效果较好, 半脱色时间为1. 25—10. 89h, 其

中结构简单的酸性红 B₂GL 为1. 25—1. 98h; 而多偶氮染料与单偶氮染料相比较难脱色, 半脱色时间增至11. 91—26. 91h; 结构较复杂的三苯甲烷类染料增至24. 89—32. 26h; 蒽醌类染料脱色效果更微. 对所试4种不同结构类型的染料看, 其脱色能力的强度排列如下: 单偶氮染料> 多偶氮染料> 三苯甲烷染料> 蒽醌染料. 混合菌与单一菌株相比, 前者脱色效果更佳. 从所试10种染料看, 脱色能力的大小与染料的结构有关, 而与分子量大小无关. 这与已报道的异养菌对染料脱色有着相似的规律^[4].

表4 硫酸盐还原菌对多种染料的脱色¹⁾

染料名称	结构类型	完整细胞半脱色时间/ h			
		L1	L2	L3	混合菌
酸性红 B ₂ GL	单偶氮	1. 25	1. 87	1. 98	0. 50
活性艳橙 KN-4R	单偶氮	9. 80	9. 20	9. 96	7. 00
酸性媒介棕 RH	单偶氮	8. 99	9. 68	10. 89	7. 5
媒介黄 GG	单偶氮	10. 87	10. 60	9. 50	8. 00
直接耐晒蓝 B ₂ RL	双偶氮	12. 23	13. 24	11. 91	9. 50
直接耐晒黑 G	双偶氮	23. 77	25. 86	26. 91	13. 00
孔雀石绿	三苯甲烷	30. 07	28. 55	32. 26	18. 00
媒介漂蓝 B	三苯甲烷	26. 24	24. 89	27. 55	15. 00
活性艳蓝 X-BR	蒽醌	48h 微脱			
活性艳蓝 KGR	蒽醌	48h 微脱			

1) 染料浓度为50mg/ L, 细胞浓度为20mg/ ml(湿)

2. 4 SRB 细胞脱色的条件

(1)细胞浓度 用不同浓度的完整细胞, 在含50mg/ L 酸性红 B₂GL 的 pH7. 0的缓冲液中, 30 ℃保温1. 5h 并通氮气, 测定不同细胞浓度的半脱色时间(见图2). 图2表明, 细胞脱色的最佳细胞浓度为20mg/ ml(湿).

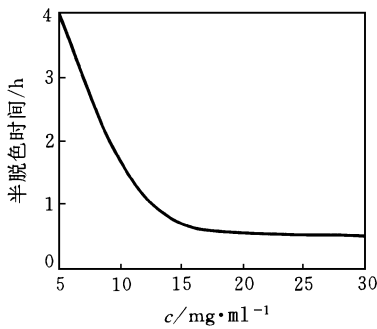


图2 细胞浓度对染料脱色的影响

(2) 最适温度和pH 反应体系中细胞浓度为20mg/ml(湿), 染料(酸性红 B₂GL, 媒介漂蓝 B, 直接耐晒黑 G3种试验染料)浓度为50mg/L, pH7.0, 不同温度; 30 不同 pH 保温并通氮气1.5h, 测其脱色率. 结果表明: SRB 对染料脱色的温度范围在25—37, 最适为30; 脱色最适 pH 为8.0.

(3) 氧和还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NADH)对完整细胞和粗酶液脱色的影响 为进一步测试氧和NADH对混合细胞脱色的影响, 选用酸性红 B₂GL为试验材料, 在最适条件下测定完整细胞和粗酶液在脱色时对氧和NADH的要求. 本试验以通氮气为厌氧反应, 搅拌为好氧反应并分别用加与不加NADH的不同条件; 用完整细胞和粗酶液进行脱色反应的比较. 结果(图3)发现, 氧对完整细胞和粗酶液的脱色表现为明显

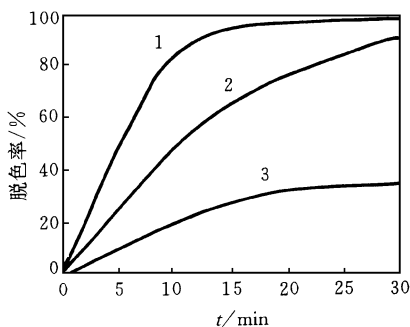


图3 氧和NADH对完整细胞染料脱色的影响

1. 通氮气并加 NADH 2. 通氮气 3. 通氧气

的抑制作用, 而NADH则为促进作用.

2.5 粗酶液对染料脱色的动力学

在最适条件下, 测定了粗酶液对不同浓度的酸性红 B₂GL的脱色初速度与染料浓度的关系, 如图4所示. 并按 Michaelis-Menten 方程计算, 求得 SRB 对染料降解的米氏常数 K_m 值大约为14mmol/L, 说明酸性红 B₂GL是该粗酶液较好的底物, 但与好氧异养脱色菌^[5]相比, 该菌的米氏常数稍低.

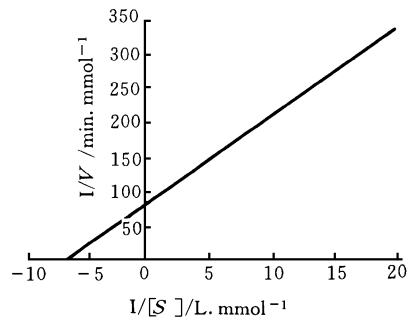


图4 粗酶液对染料脱色的动力学

参 考 文 献

- 1 刘双江, 杨惠芳. 厌氧条件下微生物对芳香化合物分解的研究进展. 城市环境与城市生态, 1993, 6(1): 44—48
- 2 Evans W C. Anaerobic degradation of aromatic compounds. Ann Rev. Microbiol., 1988, 42: 289—317
- 3 Mort S L and D Dean-Ross. Biodegradation of phenolic compounds by sulfate-reducing bacteria from contaminated sediments. Microb. ecol., 1994, 28(1): 67—77
- 4 贾省芬, 杨惠芳. 假单胞菌 S-59对多种染料的脱色和降解. 微生物学通报, 1990, 17(6): 339—342
- 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—426
- 6 韩树琴, 杨惠芳. 蜡状芽孢杆菌45号固定化细胞脱除酸性红 B 的研究. 环境科学学报, 1988, 8(1): 93—97
- 7 吴国庆, 杜恒利, 张琳等. 光合细菌对染料废水脱色的初步研究. 环境科学, 1989, 10(5): 46—50
- 8 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 1976, 72: 248
- 9 北京市环保所编. 水质物理化学分析基本知识. 北京: 中国建筑工业出版社, 1973: 189—191