

具有广谱偶氮还原能力柠檬酸菌 AzoR-2 的分离鉴定和还原特性研究

洪义国^{1,2,3}, 郭俊², 王敏妮², 许玫英², 孙国萍^{2*}

(1. 中国科学院华南植物园, 广州 510650; 2. 广东省微生物研究所广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广州 510070; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要:从印染活性污泥中分离到 1 株高效广谱偶氮还原菌 AzoR-2, 并对该菌株进行了鉴定和偶氮还原特性分析. 通过细胞形态和 BIOLOG 细菌自动鉴定系统的生理生化特性及 16S rDNA 与 β -内酰胺酶基因相结合的分子生物学特性的分析, 鉴定该菌株为柠檬酸菌属细菌, 定名为 *Citrobacter* sp. AzoR-2. 通过对其偶氮还原特性的研究表明, 菌株 AzoR-2 能够在厌氧条件下利用多种有机物和氢气为电子供体还原多种偶氮化合物, 具有广谱偶氮还原特征. 对电子供体和偶氮键的定量分析表明, 还原过程中偶氮键接受的电子全部来自一级电子供体. 氧气对其偶氮还原具有强烈的抑制作用. 该菌株的偶氮还原系统定位在菌体的细胞膜上, 推测该菌株的偶氮还原与菌体膜上的电子传递过程密切相关. 菌株 AzoR-2 的厌氧偶氮还原在碱性 pH 值范围发生, 其反应的最适 pH 值为 7.5. 菌株偶氮还原要求的温度范围较宽泛, 在 20~40 °C 范围内都显还原活性, 最适作用温度为 35 °C. 具有偶氮还原能力的柠檬酸菌在受偶氮染料污染的环境以及在印染废水的脱色中, 可以发挥重要作用.

关键词:柠檬酸菌; 16S rDNA; β -内酰胺酶基因; 偶氮还原

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)06-1397-07

Isolation, Identification and Characterization of a Broad-Spectrum Azo-reducing *Citrobacter* Strain AzoR-2

HONG Yi-guo^{1,2,3}, GUO Jun², WANG Min-ni², XU Mei-ying², SUN Guo-ping²

(1. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; 2. Guangdong Provincial Key laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China; 3. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: A broad-spectrum azo-reducing bacterial strain, AzoR-2, was isolated from a active-sludge of textile-printing wastewater treatment plant and the strain was identified and characterized. This strain was identified as *Citrobacter* sp. according to its morphological, physiobiochemical characteristics and analysis of its 16S rDNA and β -lactamase gene sequence. Studies showed that strain AzoR-2 was able to reduce various azo dyes with several organic substances and H₂ as electron donor and the electrons for azoreduction came from primary electron donor. The azoreduction by strain AzoR-2 was inhibited strongly by O₂. The enzyme system for azoreduction of strain AzoR-2 was located on cellular membrane, suggesting that the microbial azoreduction is linked to electron transport chain. Azoreduction by strain AzoR-2 was occurred in the range of alkaline pH at the temperature range 20~40 °C with optimum pH 7.5 and 35 °C. Azo-reducing *Citrobacter* bacterium may play important roles in bioremediation of the environment contaminated by azo dyes and in the decolorization of textile-printing wastewater.

Key words: *Citrobacter*; 16S rDNA; β -lactamase gene; azoreduction

随着现代化学工业的发展, 各种染料在多种行业中大量应用. 全球每年 10 000 多种 7×10^5 t 不同的染料广泛用于纺织品、皮革、纸张、塑料、化妆品和食物染色^[1]. 其中, 偶氮染料是使用最广泛的一类染料, 占到总染料的 60%~70%^[2]. 在染料的生产和使用中, 约有 10%~15% 的染料随废水排入环境水体^[3,4], 造成严重的环境污染, 威胁生物多样性及人体健康^[5~7]. 为此很多欧洲国家都在积极制定法律控制有害染料的使用^[8]. 我们国家也是一个印染大国, 染料的污染问题也非常严重, 因此, 近年来偶氮染料的降解研究倍受重视^[9].

面对偶氮染料污染的生态环境问题, 人们积极探索用各种方法解决. 与物理化学方法相比较, 生物方法具有耗费成本较低, 环境友好, 不造成二次污染的特点, 因此更具优势. 近年来, 已分离选育出许多具偶氮还原能力的高效菌株, 主要包括希瓦氏菌、假单胞菌、光合细菌、芽胞杆菌、嗜热鞘氨醇杆菌、专性

收稿日期: 2006-08-24; 修订日期: 2006-10-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(30670020, 3050009); 广东省自然科学基金项目(015017, 05100365); 广东省科技攻关项目(2006B36703001)

作者简介: 洪义国(1974~), 男, 博士研究生, 主要研究方向为环境微生物, E-mail: hongyiguo0708@yahoo.com.cn

* 通讯联系人, E-mail: guopingsun@163.com

厌氧菌硫酸盐还原菌等^[10,11], 但还鲜见有偶氮还原能力的柠檬酸菌的报道. 在 1932 年, 由于 Werkman 等对一群能利用柠檬酸盐和发酵乳糖的大肠杆菌进行了重新分类, 从而最早建立了柠檬酸菌属, 其模式菌株为弗氏柠檬酸 (*Citrobacter freundii*)^[12]. 到目前为止, 根据生理生化 and 分子生物学的鉴定, 柠檬酸菌属共有 13 个种, 其中绝大部分是从人体分离的致病菌^[13~15]. 本研究从印染活性污泥中分离到 1 株具广谱偶氮还原活性的菌株 AzoR-2, 生理生化 and 分子生物学鉴定表明为柠檬酸菌. 菌株 AzoR-2 是到目前为止发现的第 1 个从环境中分离的具偶氮还原能力的柠檬酸菌, 这一菌株对于细菌偶氮还原的研究有重要的理论意义, 对于生物处理在印染废水中的应用具有指导意义.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源

菌株 AzoR-2 从广州某印染厂废水处理系统的活性污泥中分离纯化, 由本实验室保存.

1.1.2 培养基

HXM 培养基 (pH 7.4): 10 mmol/L 琥珀酸钠, 5.7 mmol/L Na₂HPO₄ · 7H₂O, 3.3 mmol/L KH₂PO₄ · 7H₂O, 18.0 mmol/L NH₄Cl, 1.01 mmol/L MgSO₄, 0.01% 的酵母抽提物, 维生素溶液和矿物质溶液按文献[16]的方法加入, 此培养基用于菌株的富集培养和偶氮还原特性的分析.

LB 培养基 (pH7.0): 1% 蛋白胨, 0.5% 酵母抽提物, 1% NaCl, 用于细菌在有氧条件下的培养.

斜面保藏培养基 (pH7.5): 1% 牛肉膏, 1% 鱼蛋白胨, 1% 葡萄糖, 0.5% NaCl, 2% 琼脂, 用于菌株的保存.

1.1.3 偶氮染料

Amaranth 为本研究的模式偶氮染料, 购自 Sigma 公司, 其它偶氮染料购自广州某染料厂, 偶氮染料的化学结构及分类号见图 1 所示.

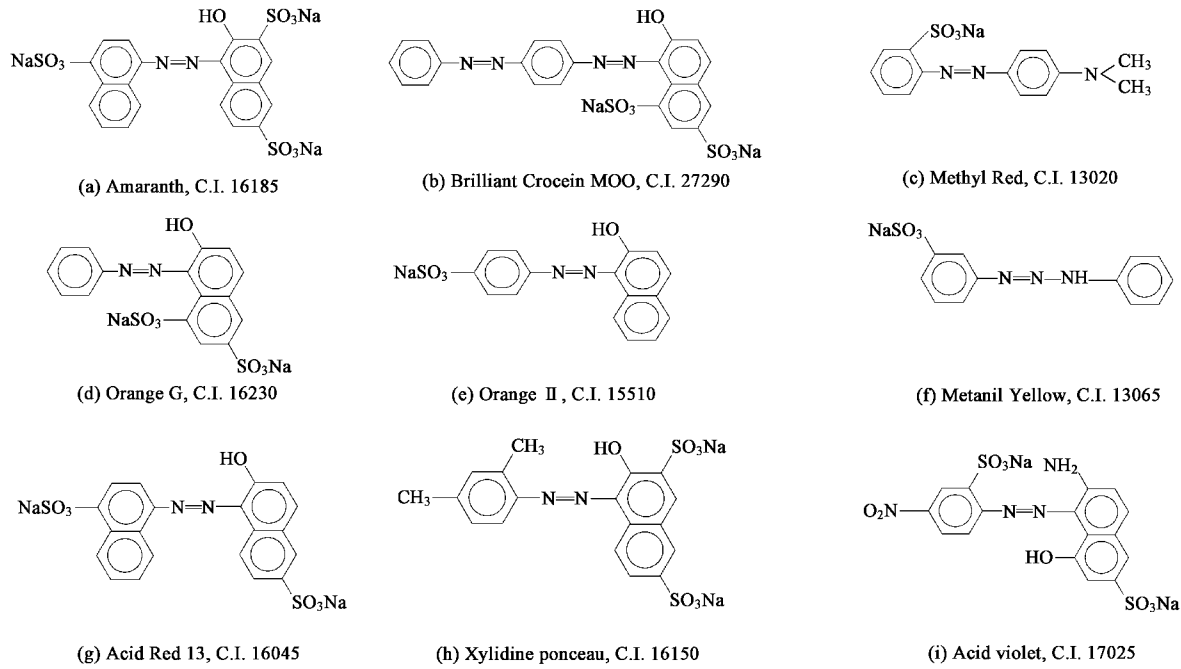


图 1 本研究所用的偶氮染料的化学结构

Fig.1 Chemical structures of azo dyes used in this study

1.1.4 主要试剂和仪器

PCR 扩增试剂盒购自 TaKaRa 公司; 离心柱型 (普通) DNA 产物纯化试剂盒购自 TIANGEN 公司. 细菌 16S rDNA 扩增通用引物对 F₂₇ (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) 和 R₁₅₂₂ (AAGGAGGTGATCCAGCCGCA) 以及 β-内酰胺酶基因的扩增用引物对 LAC-1 (GTTAACCGCACCATCACA

CCGCT) 和 LAC-2 (TAGCTCTTGTTTGCCAGCATCAC) 由赛百胜公司合成. 主要实验仪器包括紫外可见分光光度计 (Beckman DU640)、BIOLOG 自动微生物鉴定系统、Biometra T3000 PCR 仪、LEICA 显微图象分析处理系统、Bugbox 厌氧工作站、J-30I 高速冷冻离心机、OTA-COMBI 超高速冷冻离心机等.

1.2 菌落及菌体形态观察

对分离的固体培养基上的菌落形态进行记述,通过革兰氏染色、透射电镜观察菌株的个体形态、鞭毛及其它结构.

1.3 生理生化特征实验

淀粉水解、明胶液化、氧化酶、催化酶、硝酸盐还原、亚硝酸盐还原及反硝化反应等生化试验参照文献[17],其它生化指标采用 BIOLOG 细菌自动鉴定系统进行鉴定.

1.4 菌株 16S rDNA 和 β -内酰胺酶基因序列测定与系统发育分析

取对数生长期新鲜菌液,离心收集菌体,按文献[18]的方法提取基因组 DNA.采用细菌 16S rDNA 通用引物 F₂₇ 和 R₁₅₂₂ 进行 PCR 扩增菌株的 16S rDNA. β -内酰胺酶基因的扩增采用引物对 LAC-1 和 LAC-2.PCR 反应产物直接进行测序.利用 BLAST 将所测得的序列与 GenBank/EMBL/DBJ 等数据库中已登录的序列进行同源性比较,采用 ClustelW (Version1.8)^[19] 进行比对,并采用邻接法(neighbour joining, NJ)用 MEGA (Version 3.1)^[20] 软件构建系统发育树.

1.5 偶氮还原特性分析

在 HXM 培养基中,分别加入不同的电子供体和不同的偶氮染料,接种纯培养菌株,用标准厌氧技术^[21],33℃下在厌氧工作站中静置培养.每隔一段时间取出培养液于相应染料的最大吸收峰处测定吸光值,并以不加菌的染料培养基为对照,计算还原率.对不同还原阶段的偶氮染料用紫外可见分光光度计进行全波长扫描,根据吸收峰的变化判断还原特征.偶氮还原的定量采用分光光度计测量其在最大可见光处的吸收值的变化来分析.

1.6 菌体膜蛋白的制备

在 LB 培养基中活化菌体,在 30℃,150 r/min 条件下培养 15 h.把培养的菌液转入 50 mL 离心管,4℃条件下在 J-30I 高速离心机上 6 000 r/min 离心 20 min.然后把上清液转入另一离心管中,记为溶液 I (SI),SI 用 0.2 μ m 滤膜过滤除菌后保存于 4℃.沉淀用 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液溶解洗涤 1 次,4℃,6 000 r/min 离心 20 min,弃上清.细胞沉淀再用 20 mL Tris-HCl 缓冲液溶解,成菌悬液.把 20 mL 菌悬液冰浴 30 min,超声波破碎,破碎 1 min,间断 1.5 min,连续 5 次.离心破碎的菌液,4℃,9 000 r/min 离心 20 min,上清转移到另一离心管中,4℃在 OTA-COMBI 超高速离心机上 38 000 r/min 离心 60 min,上清转移

到另一管中,记为溶液 II (S II),为细胞质蛋白.沉淀用 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液溶解,成溶液 III (S III),为膜蛋白.蛋白质的测定采用 Bradford 方法,并以牛血清白蛋白为标准蛋白.

1.7 核酸序列登录号

菌株 AzoR-2 的 16S rRNA 基因和 β -内酰胺酶基因 *amp* 部分基因序列已在 GenBank 中登录,登录号分别为 DQ279749 与 DQ453706.

2 结果与讨论

2.1 形态和培养特征

菌株 AzoR-2 的细胞为革兰氏阴性,短杆近似球状,以端生鞭毛运动,大小约为 (0.4 ~ 0.5) μ m $\times$ (0.7 ~ 1.0) μ m.在营养琼脂固体培养基平板上培养 24 h 后,菌落形态为圆形,表面光滑隆起,边缘整齐,初期无色至淡黄色,后期转变为蓝绿色,半透明,表面有光泽,菌落直径大小为 2 ~ 3 mm (图 2).

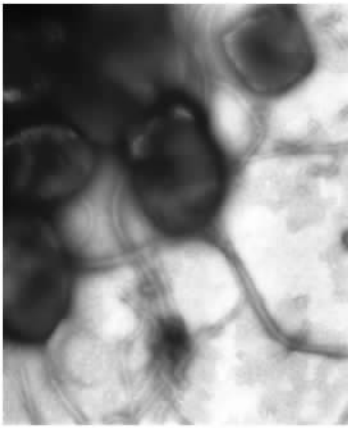


图 2 菌株 AzoR-2 的电镜照片 (20 000 $\times$)
Fig.2 Electron micrograph images (20 000 $\times$) of strain AzoR-2

2.2 生理生化特征

菌株 AzoR-2 能在 5 ~ 40℃ 的温度下生长,其最适生长温度范围为 25 ~ 37℃.其生长 pH 范围为 7.0 ~ 10.0,最适生长 pH 为 8.0.菌株 AzoR-2 具有兼性厌氧生长的能力,氧化酶阴性,接触酶为阳性,不能液化明胶、Tween40 和 Tween80,产生 H₂S,能以 D, L-乳酸钠为电子供体还原硝酸盐、亚硝酸盐、硫代硫酸钠和铁氧化物,不能利用硫酸铵和硝酸铵为唯一氮源生长.BIOLOG 细菌自动鉴定系统进行鉴定的结果发现,菌株 AzoR-2 能发酵葡萄糖,可利用柠檬酸、D-半乳糖、D, L-果糖、 α -D-葡萄糖、蔗糖、糊精、D, L-丝氨酸、L-脯氨酸、肌苷、尿苷、甘油等多种有机物做为碳源.菌株 AzoR-2 与 BIOLOG 系统数据库中

的柠檬酸菌相似性比较表明,与弗氏柠檬酸菌 *C. freundii* 相似性值最高,为 0.42,而与其它柠檬酸菌相似性值较低.从这一结果来看,菌株 AzoR-2 可能为柠檬酸菌属中的 1 个新种.对菌株 AzoR-2 确切鉴定,还需要进一步的研究.

2.3 系统进化分析

采用 BLAST 将菌株 AzoR-2 长 1 434 bp 的 16S rRNA 基因序列与典型柠檬酸种在 GenBank 中已登录的基因序列进行比对,结果发现菌株 AzoR-2 的 16S rDNA 与柠檬酸菌属已鉴定各种同源性较高,其中与 *C. youngae*、*C. werkmanii*、*C. amalonaticus*、*C. braakii*、*C. farmeri*、*C. freundii*、*C. rodentium* 与 *C. sedlakii* 的同源性分别为 99.3%、98.8%、97.6%、99.4%、97.7%、99.4%、97.3% 与 97.3%. 根据菌株 AzoR-2 的 16S rDNA 序列与柠檬酸菌属其它菌株的 16S rDNA 序列做出系统进化树,结果见图 3(a). 结果可见,所选菌株在系统进化树中基本分为 2 大族群,菌株 AzoR-2 处于 *C. freundii*、*C. braakii* 和 *C. werkmanii* 这一类群之中,且位置与 *C. freundii* 关系最近.

从 16S rRNA 基因序列的同源性比较结果来看,菌株 AzoR-2 的 16S rDNA 序列与已鉴定的柠檬酸菌属各种同源性值均较高,而且研究发现柠檬酸菌属内其它各种间 16S rDNA 序列同源性也较高,所以说单纯依靠 16S rDNA 序列同源性这一指标难以得到菌株 AzoR-2 与其它柠檬酸菌各属在分子水平上的差异.要从分子水平上鉴定该菌株,必须寻找其它的靶标基因.研究发现在 16S rDNA 高同源性的柠檬酸菌株间的 β -内酰胺酶基因(*ampC*)存在较大的差异,因此 β -内酰胺酶基因的差异是近年来被广泛认可的鉴定柠檬酸菌的 1 个重要指标^[15,22]. 根据已经发表的柠檬酸菌属各种的 *ampC* 序列,通过同源性比较得到的保守序列设计引物 LAC-1 和 LAC-2,并且通过 PCR 成功扩增出了与预期大小一致的,长为 998 bp 的 DNA 片段.同源性比较结果表明,AzoR-2 的 *ampC* 与 *C. youngae* 相似值为 97.8%,而与 *C. freundii* CDC 621-64^T 的 *ampC* 序列相似值为 84.3%,与 *C. werkmanii* *ampC* 序列相似值为 84.7%,与其它各种差异较大(低于 50%). 根据菌株 AzoR-2 的 *ampC* 序列与柠檬酸菌属 7 个菌种的模式菌株的 *ampC* 序列做出系统进化树,见图 3(b). 结果可见,所选菌株在系统进化树中基本分为 2 大族群,菌株 AzoR-2 处于 *C. freundii*、*C. youngae*、*C. braaki* 和 *C. werkmani* 这一类群之中,且位置与 *C. youngae* 最近.

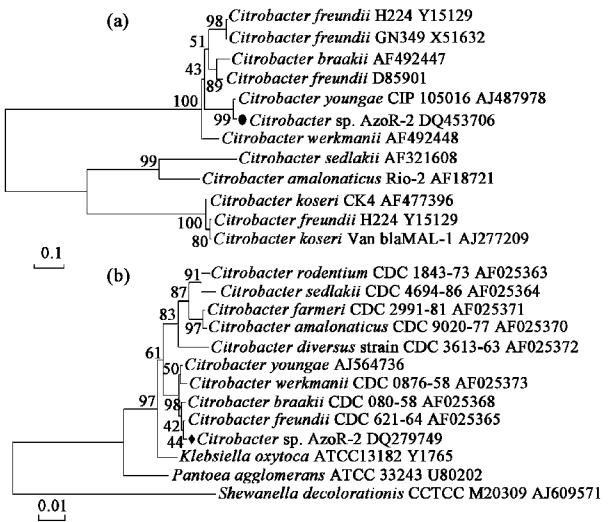


图 3 基于 β -内酰胺酶基因 (a)和 16S rDNA (b)为基础的菌株 AzoR-2 的系统进化分析

Fig.3 Phylogenetic analysis of strains of AzoR-2 based on β -Lactamases gene sequence (a) and 16S rDNA (b)

综合菌株 AzoR-2 的生理生化特征和分子生物学特性,鉴定该菌株为柠檬酸菌属细菌,定名为 *Citrobacter* sp. AzoR-2. 菌株 AzoR-2 在生理生化水平上,与弗氏柠檬酸菌 *C. freundii* 相似程度较大,但是从 β -内酰胺酶基因同源性分析来看,与杨氏柠檬酸菌更接近.对于菌株 AzoR-2 的进一步鉴定还需要做其它的指标分析,例如脂肪酸组成、与其他模式种的 DNA 杂交百分比等等.

2.4 偶氮还原特征分析

2.4.1 偶氮还原与电子供体的氧化相偶联

以苋菜红(Amaranth, AR)为模式偶氮染料研究了菌株 AzoR-2 电子供体的依赖性特征.图 4(a)的结果表明,菌株 AzoR-2 能够以氢气、甲酸纳和乳酸纳为电子供体还原 AR,而在没有电子供体存在的条件下还原基本不能发生,这说明菌株 AzoR-2 的偶氮还原是 1 个依赖电子供体存在的过程.实验中还发现,如果加入通过热杀死的菌体细胞(95℃ 处理 10 min),即使有电子供体的存在,偶氮还原仍然不能发生,这说明菌株 AzoR-2 的偶氮还原是 1 个生物化学反应过程,而不是纯化学反应过程.另外菌株 AzoR-2 的偶氮还原必须在厌氧条件下发生,氧气能完全抑制菌株 AzoR-2 的偶氮还原.

为了研究了菌株 AzoR-2 的偶氮还原与电子供体氧化的定量关系,在过量的 AR(2.0 mmol/L)条件下,加入不同量的电子供体甲酸钠,通过测量反应前后体系中光密度值的变化,计算定量的甲酸钠能够支持的

偶氮还原最大量,结果见图 4(b).定量计算表明,1 mol 的甲酸钠最大能够支持约 0.5 mol AR 的还原,这与预期的理论结果相一致.在理论上,1 mol 的 AR 能

够接受 4 mol 的电子,而 1 mol 的甲酸钠能够提供 2 mol 的电子.因此可以推测,AR 的还原过程中接受的电子都是通过菌体的作用来自电子供体.

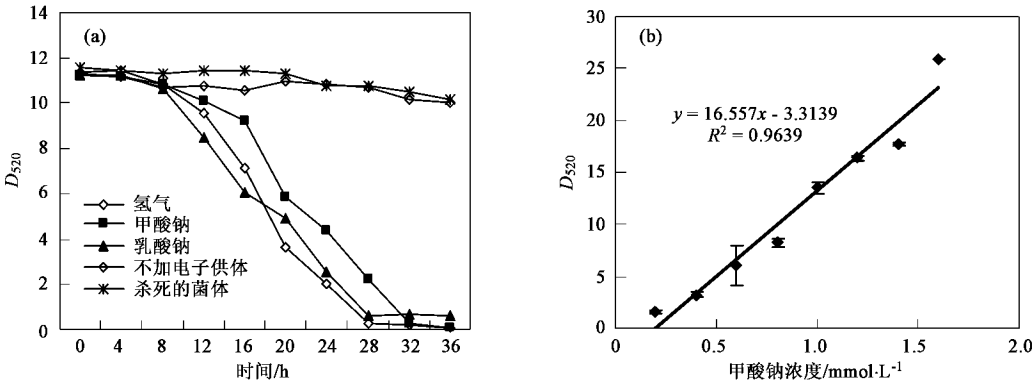


图 4 在不同电子供体存在的条件下菌株 AzoR-2 的偶氮还原(a)及定量关系测定(b)

Fig.4 Azoreduction of AzoR-2 using different electron donor (a) and stoichiometry of azoreduction coupled to the oxidation of electron donor (b)

对不同还原阶段的 AR 进行全波长扫描,结果如图 5 所示.AR 的全波长扫描图中主要有 4 个吸收峰.在可见光区域 520 nm 的吸收峰由偶氮键(—N=N—)所产生,在紫外区域 320、210 和 250 nm 处的 3 个吸收峰有萘环结构产生.随着还原的不断深入,520 nm 的吸收峰在不断下降,表明偶氮键在不断被打开.

基本不能发生.菌株 AzoR-2 的温度范围较宽泛,在 20~40 ℃ 范围内都有还原的发生,最适作用温度为 35 ℃,基本与其菌体生长的温度相一致.

表 1 菌株 AzoR-2 利用不同电子供体对多种偶氮染料的还原
Table 1 Reduction of azo dyes by strain AzoR-2 with different electron donor

偶氮染料 ¹⁾	在不同电子供体条件下的偶氮还原 ²⁾ /%			
	对照	氢气	甲酸钠	乳酸钠
Amaranth	3.6±0.6	92.1±4.5	88.3±4.6	99.3±0.1
Brilliant Crocein	4.2±0.3	76.3±5.7	72.4±6.7	89.7±6.2
Methyl Red	4.7±0.5	98.3±1.4	94.2±5.2	98.3±2.4
Orange G	7.4±1.3	96.0±2.3	87.2±3.3	95.6±1.8
Orange II	4.6±0.8	95.8±3.2	91.2±4.0	95.3±2.2
Metanil Yellow	2.6±0.2	67.2±5.1	50.6±6.8	84.5±4.2
Acid Red 13	3.6±0.4	99.2±0.3	99.2±0.4	97.4±3.6
Xylidine ponceau	2.6±0.4	96.4±2.9	90.5±4.3	94.1±5.3
Acid violet	1.2±0.2	15.4±4.4	17.8±5.4	21.2±2.9

1)染料初始浓度为 1 mmol/L; 2)反应初始菌体浓度为 3.9×10^6 CFU/mL,反应在 35 ℃ 厌氧条件下静置培养 36 h,偶氮还原率=(初始光吸收值-反应后吸收值)/初始光吸收值

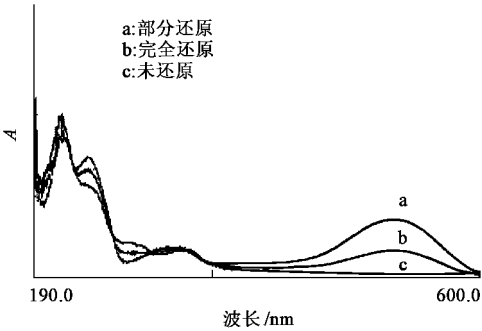


图 5 不同偶氮还原阶段的苋菜红紫外可见全波长扫描

Fig.5 UV-Visible scan of unreduced, partial reduced and reduced amaranth

2.4.2 偶氮还原的广谱性分析

表 1 的结果表明,菌株 AzoR-2 具有广谱的偶氮染料还原特征.在所测试的几种偶氮染料中,除了 Acid violet 的还原率较低外,在 36 h 内,菌株 AzoR-2 利用氢气、甲酸钠和乳酸钠均有较高的还原率.

2.4.3 偶氮还原所需要的温度和 pH 条件

图 6 的结果表明,菌株 AzoR-2 的厌氧偶氮还原在碱性 pH 值范围发生,其反应的最适 pH 值为 7.5.如果反应体系中的 pH 值低于 7.0 或高于 9.0,还原

2.4.4 偶氮还原活性系统的定位

为了研究菌株 AzoR-2 偶氮还原系统在细胞的定位,从菌体细胞中提取了发酵液上清蛋白、细胞质蛋白及膜蛋白.把等量的 3 种蛋白加入磷酸缓冲液(20 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 mmol/L $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$, pH 8.0)中,同时加入过量的电子供体(10 mmol/L)乳酸钠厌氧培养,结果见图 7.可以看出,膜蛋白能够快速将 0.1 mmol/L 的 AR 还原完毕,而发酵液上清蛋白和细胞质蛋白基本没有还原的发生.因此可以得出结论,菌株 AzoR-2 的还原酶系统定位在膜上.一般情况下,带有磺酸基的偶氮染料具有很强的亲水性,

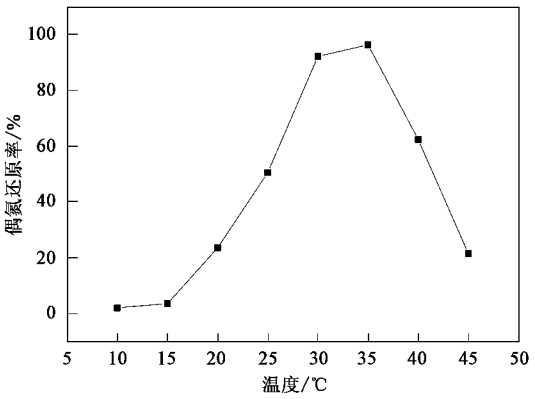
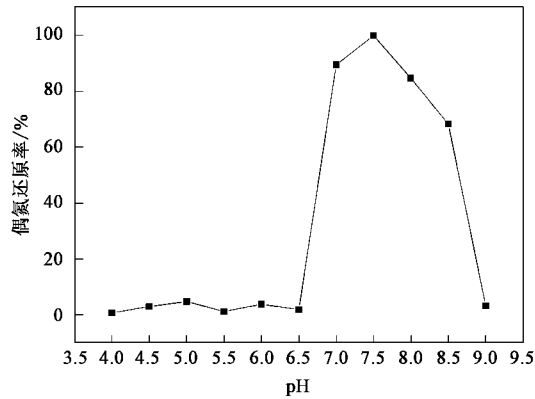
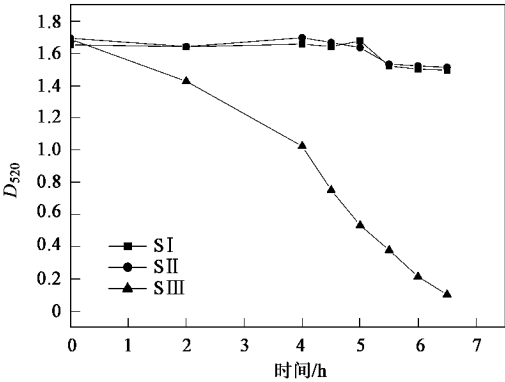


图 6 pH 和温度对菌株 AzoR-2 偶氮还原的影响

Fig. 6 Effects of pH and temperature on azoreduction of strain AzoR-2



S I 为过滤除菌发酵液上清; S II 为细胞质蛋白;
S III 为菌体膜蛋白

图 7 菌株 AzoR-2 偶氮还原活性系统的定位分析

Fig. 7 Location of azoreduction activity system of strain AzoR-2

所以不易透过细胞膜进入细胞内部. 对于完整的菌体细胞, 膜上的电子传递系统更适于在还原偶氮染料中发挥作用.

对于细菌的偶氮还原, 前人已经做了广泛的研究, 分离到多种偶氮还原菌株, 但还鲜见有柠檬酸菌的报道. 菌株 AzoR-2 是首次报道的具有广谱厌氧偶氮还原活性的柠檬酸菌菌株. 由于这一菌株是从活性污泥中分离得到, 可以认为在印染废水的处理中, 柠檬酸菌在偶氮染料的脱色中发挥重要作用. 对于细菌的偶氮还原作用机理前人也做了多方面的探讨, 但仍不十分清楚. 到目前为止, 人们普遍认为, 有氧条件下细菌的偶氮还原是在特异性的偶氮还原酶作用下完成的, 对氧气不敏感. 而厌氧菌和兼性厌氧菌的偶氮还原是由非特性的偶氮还原酶催化形成的一些氧化还原中间体作为电子穿梭体与偶氮化合物作用, 使偶氮键还原. 电子穿梭体与偶氮化合物作用

是一纯化学氧化还原过程, 在这一过程中, 偶氮复合物作为电子受体接受电子^[11]. 结果表明, 菌株 AzoR-2 的偶氮还原过程是与电子供体的氧化相偶联, 而且与还原相关的酶系统定位在膜上, 推测这一还原过程与菌体细胞膜上的电子传递过程密切相关. 这些结果对于认识细菌偶氮还原的机理具有重要的理论意义, 可以认为细菌的偶氮还原与其膜上的电子传递链密切相关. 另外这些认识对于开发以细菌电子传递链为基础的偶氮染料生物降解新技术, 有重要的实践意义.

3 结论

(1) 从处理印染废水厌氧活性污泥中分离到 1 株具有厌氧偶氮还原活性的菌株 AzoR-2. 综合其生理生化特征以及 16S rDNA 与 β -内酰胺酶基因相结合的分子生物学亲缘关系分析, 该菌株为柠檬酸菌属成员, 定名为 *Citrobacter* sp. AzoR-2.

(2) 菌株 AzoR-2 能够在厌氧条件下利用多种有机物和氢气为电子供体还原多种偶氮化合物, 具有广谱性特征. 定量分析表明, 偶氮还原过程中接受的电子全部来自一级电子供体. 氧气对其偶氮还原具有强烈的抑制作用.

(3) 该菌株的偶氮还原系统定位在菌体的细胞膜上, AzoR-2 的厌氧偶氮还原在碱性 pH 值范围发生, 其反应的最适 pH 值为 7.5. 菌株 AzoR-2 的温度范围较宽泛, 在 20 ~ 40 °C 范围内都有还原的发生, 最适作用温度为 35 °C.

参考文献:

[1] Padamavathy S, Sandhya S, Swaminathan K, et al. Comparison of decolorization of reactive azo dyes by microorganisms isolated from

- various source [J]. J Environ Sci, 2003, **15**: 628 ~ 632.
- [2] Stolz A. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, **56**: 69 ~ 80.
- [3] O' Neill C, Hawkes F R, Hawkes D L, *et al.* Colour in textile effluents-sources, measurement, discharge consents and simulation: a review [J]. J Chem Technol Biotechnol, 1999, **74**: 1009 ~ 1018.
- [4] Wesenberg D, Kyriakides I, Agathos S N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents [J]. Biotechnol Adv, 2003, **22**: 161 ~ 187.
- [5] Brown M A, DeVito S C. Predicting azo dye toxicity [J]. Crit Rev Environ Sci Technol, 1993, **23**: 249 ~ 324.
- [6] Chung K T, Cerniglia C E. Mutagenicity of azo dyes: structure-activity relationships [J]. Mutat Res, 1992, **77**: 201 ~ 220.
- [7] Chung K T, Stevens S E J. Degradation of azo dyes by environmental microorganisms and helminths [J]. Environ Toxicol Chem, 1993, **12**: 2121 ~ 2132.
- [8] Vijaya P P, Sandhya S. Decolorization and complete degradation of methyl red by a mixed culture [J]. The Environmentalist, 2003, **23**: 145 ~ 149.
- [9] 贾省芬, 杨惠芳, 刘双江. 硫酸盐还原菌对多种染料厌氧脱色的特性 [J]. 环境科学, 1998, **19**(4): 18 ~ 21.
- [10] 许玫英, 郭俊, 钟小燕, 等. 一个降解染料的希瓦氏菌新种——中国希瓦氏菌 [J]. 微生物学报, 2004, **44**: 561 ~ 565.
- [11] 洪义国, 许玫英, 郭俊, 等. 细菌偶氮还原研究进展 [J]. 应用与环境微生物学报, 2005, **11**: 642 ~ 647.
- [12] Werkman C M, Gillen G F. Bacteria producing trimethyleneglycol [J]. J Bacteriol, 1932, **23**: 167 ~ 182.
- [13] Brenner D J D, Grimont P A, Stigerwalt A G, *et al.* Classification of citrobacteria by DNA hybridization: designation of *Citrobacter farmerii* sp. nov., *Citrobacter youngae* sp. nov., *Citrobacter braakii* sp. nov., *Citrobacter werkmanii* sp. nov., *Citrobacter sedlakii* sp. nov., and three unnamed *Citrobacter* genomospecies [J]. Int J Syst Bacteriol, 1993, **43**: 645 ~ 658.
- [14] Ewing W H, Davis B R. Biochemical characterization of *Citrobacter diversus* (Burkey) Werkman and Gillen and designation of the neotype strain [J]. Int J Syst Bacteriol, 1972, **22**: 12 ~ 18.
- [15] Underwood S, Matthew B A. *Citrobacter koseri* and *Citrobacter amalonaticus* isolates carry highly divergent β -lactamase genes despite having high levels of biochemical similarity and 16S rRNA sequence homology [J]. J Antimicrobial Chemotherapy, 2004, **53**: 1076 ~ 1080.
- [16] Wolin E A, Wolin M J, Wolfe R S. Formation of methane by bacterial extracts [J]. J Biol Chem, 1963, **238**: 2882 ~ 2886.
- [17] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [18] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. (3rd ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [19] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. Nucleic Acids Res, 1994, **22**: 4673 ~ 4680.
- [20] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment [J]. Briefings in Bioinformatics, 2004, **5**: 150 ~ 163.
- [21] Vargas M, Kashefi K, Blunt-Harris E L, *et al.* Microbiological evidence for Fe(III) reduction on early Earth [J]. Nature, 1998, **395**: 65 ~ 67.
- [22] Petrella S, Clermont D, Casin I, *et al.* Novel class A β -lactamase Sed-1 from *Citrobacter sedlakii*: genetic diversity of β -lactamases within the *Citrobacter* genus [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001, **45**: 2287 ~ 2298.