

固定化工程菌对偶氮染料脱色及强化作用

金若菲, 周集体, 王竞, 曹同川

(大连理工大学环境与生命学院, 大连 116024)

摘要: 利用聚亚胺酯大孔泡沫吸附固定基因工程菌 *Escherichia coli* JM109 (pGEX-AZR), 研究其对偶氮染料的脱色动力学及生物强化作用。实验表明, 固定的 *E. coli* JM109(pGEX-AZR) 对酸性大红 GR 的脱色动力学符合 Andrews 方程, 动力学常数为 $\mu_{\max, c}$ 、 K_c 、 K_{ic} 分别为 $49.2 \text{ mg} \cdot (\text{g} \cdot \text{h})^{-1}$ 、 $710.43 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $681.62 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, R^2 为 0.995。将固定的 *E. coli* JM109(pGEX-AZR) 按 10% 的比例投加到厌氧序批式活性污泥反应器中连续运行 32 d, 含有固定化工程菌的强化体系耐浓度冲击的能力和脱色率均高于对照体系, 脱色率可以稳定在 90% 以上。利用 RISA 对其微生物群落结构进行分析, *E. coli* JM109(pGEX-AZR) 及降解酸性大红 GR 的优势菌群可以在污泥体系中稳定存在。

关键词: 基因工程菌; 固定化细胞; 偶氮染料; 动力学; 生物强化; RISA

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3301(2007)11-2598-05

Decoloration and Bioaugmentation on Azo Dye by Immobilized Genetically Engineered Strain

JIN Ruo-fei, ZHOU Ji-ti, Wang Jing, CAO Tong-chuan

(School of Environmental and Biological Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: Decoloration and bioaugmentation on azo dye are investigated by using immobilized genetically engineered strain *Escherichia coli* JM109 (pGEX-AZR) on macroporous foam carriers. The kinetics of the acid red GR decolorization by the immobilized *E. coli* JM109 (pGEX-AZR) accords with Andrews model proved by our experiments, and the kinetic parameters, $\mu_{\max, c}$, K_c and K_{ic} , are found to be $49.2 \text{ mg} \cdot (\text{g} \cdot \text{h})^{-1}$, $710.43 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $681.62 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively. For continuous operating in the anaerobic SBRs with 10% inoculation of *Escherichia coli* JM109 (pGEX-AZR) on macroporous foam carriers for 32 d, both the tolerance to red GR concentration shock and the colorific removal in the bioaugmented anaerobic SBRs are higher than the control system, and the acid red GR decoloration rate reached 90%. Changes in microbial community have been detected by the RISA, in which the introduced immobilized GEM and preponderant mixed culture were subsisted steadily in sludge systems.

Key words: genetically engineered strain; immobilized cell; azo dye; kinetics; bioaugmentation; RISA

生物强化处理技术是为了提高生物系统的处理能力, 而向该系统中投加从自然界中筛选的优势菌种或通过基因工程技术产生的高效菌种^[1~4]。利用基因工程技术构建的工程菌可含有几十甚至上百个目标基因的拷贝(而普通方法筛选的微生物一般只含有一个目标基因拷贝), 具有目标性强, 处理效率高的特点。但基因工程菌对环境条件要求苛刻, 而且释放到环境中存在一定的潜在生态风险^[5,6]。而采用固定化技术, 可以增强了工程菌的竞争性、避免了原生动物的捕食, 防止菌体的流失, 是一种有效的生物强化手段^[7]。

偶氮染料作为应用最为广泛的一种染料, 其生物法处理的关键是在厌氧条件下使其分解成为小分子的苯胺类物质, 而苯胺类物质可以在好氧条件下进一步被微生物分解利用。研究表明, 某些厌氧微生物具有偶氮还原作用^[8~11], 因此可以利用这些微生物中的偶氮还原酶基因构建基因工程菌^[12~15]。

本试验以含偶氮还原酶基因的工程菌为对象, 研究固定态的工程菌对偶氮染料的脱色能力及生物强化作用, 同时考察工程菌在污泥系统中的存在及对生物群落的影响。

1 材料与方法

1.1 基因工程菌及菌体固定

基因工程菌(GEM)为 *Escherichia coli* JM109 (pGEX-AZR), 具有很高的偶氮还原酶活性, 由大连理工大学环境生物工程实验室构建并保存于该实验室^[15]。

菌体用聚亚胺酯大孔泡沫固定, 大孔泡沫比表面积为 $0.72 \times 10^5 \sim 4.2 \times 10^5 \text{ m}^2/\text{m}^3$ 。固定化前载体先剪成长度为 10 mm 的立方体, 用蒸馏水清洗数次, 灭

收稿日期: 2006-12-31; 修订日期: 2007-03-17

基金项目: 辽宁省自然科学基金项目(20032122)

作者简介: 金若菲(1975~), 女, 博士研究生, 讲师, 主要研究方向为环境生物技术, E-mail: jruofei@dlut.edu.cn

菌 30 min, 烘干. 菌体固定采用吸附法, 将培养好离心得到的湿菌体悬浮于磷酸缓冲液 (pH = 8.0) 中, 加入预处理过的载体, 在常温下轻微振荡 12 h 后取出, 用磷酸缓冲液清洗固定化载体 2~3 次, 得到固定化菌体, 待用. 菌体的测定采用干重法, 将已知重量的固定化载体和吸附在其上的细胞 105℃ 烘干至恒重, 减去载体重量, 即为菌体重量^[16].

1.2 偶氮染料废水组成及分析方法

实验用偶氮染料为酸性大红 GR, 为双偶氮结构, 最大吸收波长为 510 nm, 结构如图 1 所示.

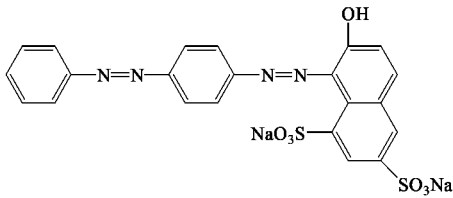


图 1 酸性大红 GR 的结构
Fig.1 Structure of acid red GR

实验用偶氮染料废水为人工配制的模拟废水, 包括: 无机盐培养基^[17]、酸性大红 GR (25~1 000 mg·L⁻¹)、葡萄糖 (500 mg·L⁻¹)、乳糖 (200 mg·L⁻¹). 其中葡萄糖作为共代谢的生长基质, 而乳糖作为诱导剂使 *E. coli* JM109 (pGEX-AZR) 中的偶氮还原酶表达.

酸性大红 GR 的浓度用比色法测定. 首先, 在 510 nm 下, 测定不同浓度与其吸光度之间的关系, 绘制标准曲线. 对于实验过程中染料浓度的测定, 首先取样在 8 000 r/min 下离心 10 min, 取上清液在 510 nm 下测定吸光度, 通过标准曲线计算其浓度.

1.3 脱色动力学实验

在无菌 250 mL 血清瓶中, 将固定好的 *E. coli* JM109 (pGEX-AZR) 溶于不同浓度的染料废水中, 使菌体终浓度达到 2 g·L⁻¹. 为了获得厌氧条件, 先用高纯氮气吹脱置换血清瓶中的微量氧气, 后迅速用橡胶盖密封瓶口, 外缠聚四氟乙烯. 放置在 30℃ 恒温培养箱中反应. 间隔一定时间取样, 测定残留的酸性大红 GR 浓度.

1.4 生物强化实验

实验在 2.5 L 反应器内进行, 为了维持厌氧环境, 在反应器底部引入氮气, 瓶口用橡胶盖密封, 外缠聚四氟乙烯, 并留有排气孔, 反应温度维持在 (30 ± 2)℃. 生物强化反应器 I 投入 2.5 g·L⁻¹ 厌氧污泥和 0.25 g·L⁻¹ 固定的 *E. coli* JM109 (pGEX-AZR), 投

加比例为 10%; 对照反应器 II 内投加 2.5 g·L⁻¹ 厌氧污泥. 采用 SBR 方式运行, 运行周期 12 h, 其中进水 10 min, 反应 11 h, 沉淀 40 min, 出水 10 min. 每 12 h 取样, 测定残留的酸性大红 GR 浓度.

1.5 指纹分析实验

用核糖体基因间隔序列分析法 (ribosomal intergenic spacer analysis, RISA) 监测污泥群落结构的变化. 针对 ITS 片段的 PCR 引物由大连宝生物公司合成, 碱基序列^[18,19] 为 926F: 5'-CTYAAAKGAATTGACGG-3'; 189R: 5'-TACTGAGATGYTTMARTTC-3'.

从悬浮污泥中提取基因组 DNA, 方法见文献 [20]. ITS 片段的 PCR 扩增采用 50 μL 体系: 2 μL Template (Genomic DNA); 引物 F 0.5 μL; 引物 R 0.5 μL; dNTP: 4 μL; 10 × Buffer 5 μL; Ex-Taq: 0.25 μL; 加 dH₂O 补充到 50 μL. PCR 条件: 94℃ 预变性 1.5 min; 然后进入 30 个循环: 94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 1 min; 最后 72℃ 延伸 5 min. 取 5 μL 进行 3% 的琼脂糖和 5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 得到相应的 RISA 指纹图谱. 对图谱利用 Gel Image System 图像分析软件 (天能科技公司, 中国) 进行分析.

2 结果与讨论

2.1 固定化菌体的微观结构

图 2 为聚亚胺酯大孔泡沫固定菌体的表面形态, *E. coli* JM109 (pGEX-AZR) 随机分布在载体表面及内部.

2.2 固定化菌体的脱色动力学

考察固定化的 *Escherichia coli* JM109 (pGEX-AZR) 对不同浓度酸性大红 GR 的脱色情况, 实验结果如图 3 所示.

由图 3 可知, 固定化 *E. coli* JM109 (pGEX-AZR) 对 ARGR 脱色范围很广, 从 32.3~983.9 mg·L⁻¹. 用比脱色速率对酸性大红 GR 初始浓度作图, 如图 4 所示, 可知当溴氨酸初始浓度 < 353.5 mg·L⁻¹ 时, 比降解速率随酸性大红 GR 初始浓度的增加而增加, 在 353.5~791.7 mg·L⁻¹ 之间时, 比降解速率随初始酸性大红 GR 浓度增加变化不大, 当初始酸性大红 GR 浓度 > 791.7 mg·L⁻¹ 时, 比降解速率随酸性大红 GR 初始浓度增加而下降, 表现出底物抑制现象. 因此, 采用 Andrews 方程模拟:

$$\mu_c = \frac{\mu_{\max} \cdot c_c}{K_c + c_c + \frac{c_c^2}{K_{ic}}}$$

式中, μ_c 为比脱色速率 [mg·(g·h)⁻¹]; c_c 为酸性大

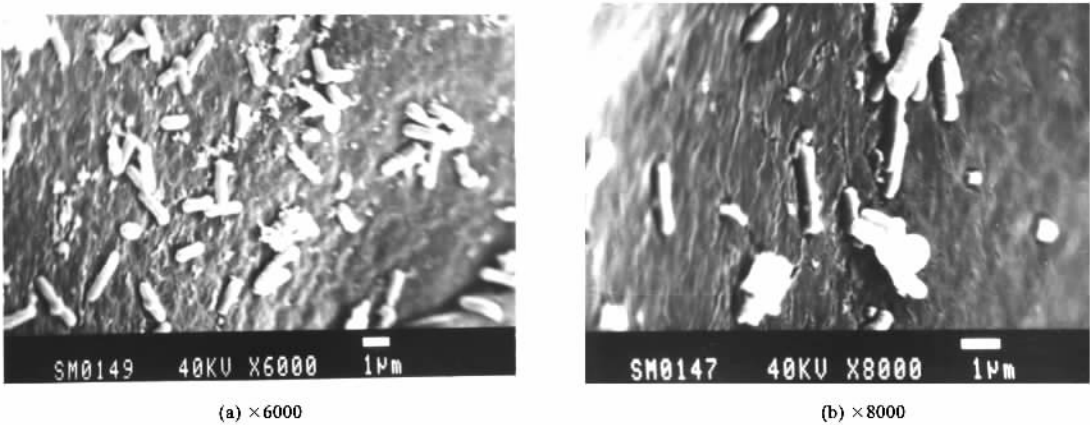


图 2 大孔泡沫固定的菌体形态

Fig.2 Morphology of immobilized cells on macroporous foam carriers

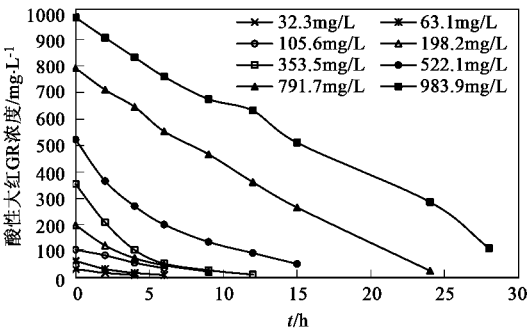


图 3 固定化 *E. coli* JM109 (pGEX-AZR) 对不同浓度酸性大红 GR 的脱色

Fig.3 Aid red GR decoloration by *E. coli* JM109 (pGEX-AZR) on macroporous foam carriers

红 GR 浓度 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); $\mu_{\text{max},c}$ 为最大比脱色速率 [$\text{mg}\cdot(\text{g}\cdot\text{h})^{-1}$]; K_c 为半饱和系数 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); K_{ic} 为抑制系数 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

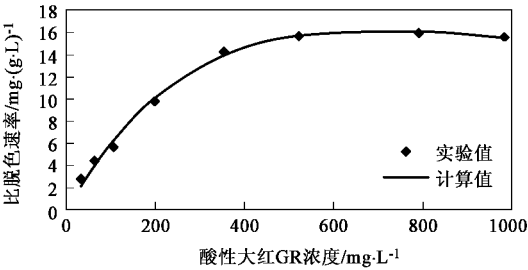


图 4 不同初始酸性大红 GR 对比脱色速率的影响

Fig.4 Dependence of specific decolorization rate to the concentration of acid red GR by GEM

对图 4 的数据进行非线性最小二乘分析, $\mu_{\text{max},c}$ 为 $49.2\text{ mg}\cdot(\text{g}\cdot\text{h})^{-1}$, K_c 为 $710.43\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, K_{ic} 为

$681.62\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, R^2 为 0.995.

2.3 固定化菌体的生物强化

在强化反应中,投加的高效菌能否有效地在反应器中截留和增殖,是强化能否成功的关键因素.而投加固定化的菌体可以有效地防止菌体流失,可以提高启动期反应器的性能及有机负荷.考察固定化 *Escherichia coli* JM109 (pGEX-AZR) 强化的反应器中酸性大红 GR 的去除效果.实验分 4 个阶段进行,第 1 阶段为 1~10 d,为系统的驯化阶段;第 2 阶段为 11~23 d,考察系统对突然的浓度冲击的耐受能力;第 3 阶段为 24~30 d,在此阶段不加入酸性大红 GR,而只加入葡萄糖,考察基因工程菌在体系中的生存能力;第 4 阶段为 31~35 d,考察系统的重新启动能力.结果见图 5.

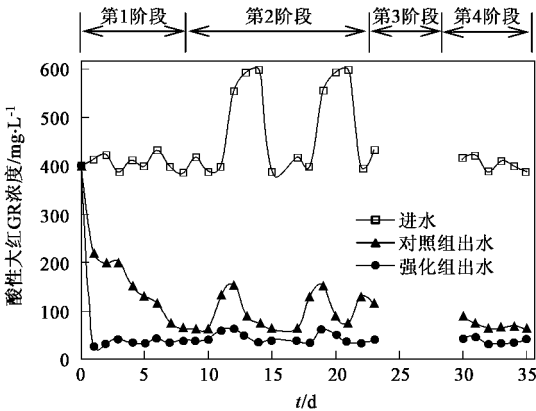


图 5 在生物强化系统中固定化 *E. coli* JM109(pGEX-AZR) 对酸性大红 GR 的脱色

Fig.5 Aid red GR decoloration by *E. coli* JM109 (pGEX-AZR) on macroporous foam carriers in bioaugmented AnSBRs

由图 5 可知,在第 1 阶段,强化系统的启动期明

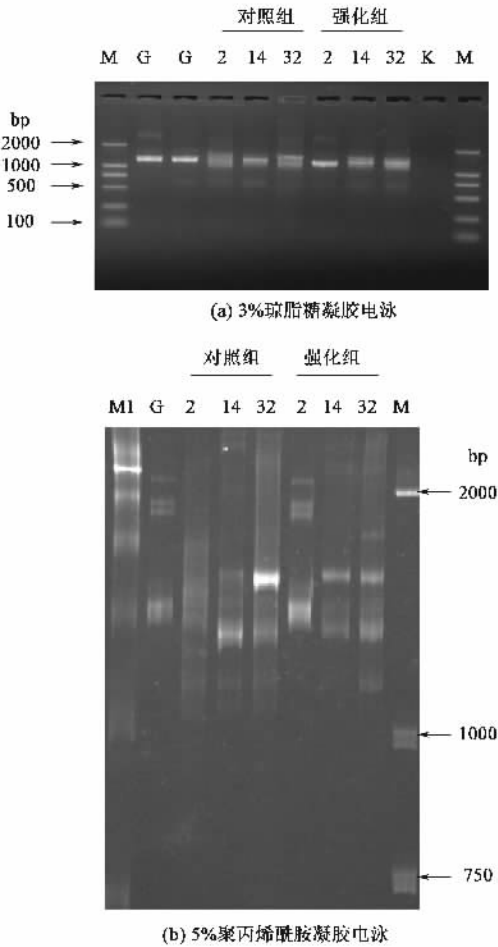
显低于对照系统, 强化系统在第 1 d 脱色率就可以达到 95% 以上, 这主要是载体吸附的结果, 之后一直保持在 90% 以上的脱色率, 这主要是生物降解的作用; 而对于对照组, 经过 6 d 的适应后, 系统的脱色率达到 85% 左右. 第 2 阶段, 2 次突然把进水酸性大红 GR 的浓度提高到 $600\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右, 可以看出, 强化系统具有很强的适应能力, 进水浓度突然提高之后, 出水脱色率变化很小, 还保持在 90% 以上, 而对照组的适应能力较差, 当进水浓度提高到 $600\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 出水浓度为 $154.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 经过 2 d 的适应后, 出水浓度才降低到 $74.6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. 在第 3 阶段中, 进水中不添加酸性大红 GR, 考察固定化的 *E. coli* JM109 (pGEX-AZR) 及经过长期驯化后所形成的降解酸性大红 GR 的优势菌群的生存能力. 第 4 阶段, 进水中重新加入 $400\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右的酸性大红 GR, 对照组和强化组都具有较高的脱色效果, 说明固定态的 *E. coli* JM109 (pGEX-AZR) 及经过长期驯化后, 所形成的降解酸性大红 GR 的优势菌群可以在系统中较稳定地存在.

2.4 生物强化体系的污泥群落解析

对上述系统运行到 2、14、32 d 时的悬浮污泥的基因组 DNA 扩增样品的 RIS 基因, 将得到的 PCR 产物各取 5 μL 进行 3% 琼脂糖凝胶电泳和 5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(图 6).

从图 6(a)可以看出, 所得到的 RIS 指纹在 1~2 kb 之间, 但是分离效果不理想, 不能满足多态性分析的要求. 进一步利用上述 PCR 产物进行 5% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳, 得到相应的 RIS 指纹图谱[图 6(b)]. 再利用 Gel Image System 图像分析软件分析同一泳道中不同条带的迁移率与强度的关系, 来表示在不同运行时间强化组与对照组的污泥群落变化情况(图 7).

由图 7 看出, *E. coli* JM109 (pGEX-AZR) 的 RIS 迁移率在 177 pix 附近. 在对照组中, 当系统运行了 2 d 后, 优势菌群的位置在 167 pix 附近; 运行到 14 d 时, 在 153 pix 附近形成了降解酸性大红 GR 的优势菌群; 在第 32 d 时, 153 pix 附近的优势菌群强度很高, 系统对酸性大红 GR 具有很高的脱色能力, 说明在第 3 阶段中, 在没有酸性大红 GR 存在的条件下, 优势菌群仍能保持其优势地位, 并且大量繁殖. 对于强化系统, 在第 2 d 时, 基因工程菌的 RIS 强度很高, 说明可能有部分被载体固定的工程菌从载体中进入污泥体系中, 而随着反应的进行, 基因工程菌的 RIS 强度逐渐降低, 说明在污泥体系中的工程菌的



M: DNA Marker DL2000; M1: 200 bp DNA Ladder Marker;
G: *E. coli* JM109(pGEX-AZR); K: 空白对照;
2、14、32: 运行天数

图 6 污泥群落结构变的 RISA 电泳图

Fig.6 Electrophoresis of the microbial community structures
RISA in the AnSBRs systems

增殖能力不如土著微生物; 但强化体系始终保持比对照体系高的脱色率, 一方面由于强化体系也可以在 153 pix 附近形成降解酸性大红 GR 的优势菌群, 另一方面也由于还有部分工程菌可以被载体固定, 而固定的菌体具有较高的稳定性和代谢活性, 提高了系统的脱色效果.

3 结论

- (1) 固定化的 *E. coli* JM109 (pGEX-AZR) 对酸性大红 GR 的脱色符合底物抑制方程 Andrews.
- (2) 投加固定化菌的强化 SBR 系统较不固定化菌的对照系统具有启动时间短, 耐冲击负荷能力强的特点.
- (3) 对照组的 SBR 系统通过一定时间的驯化,

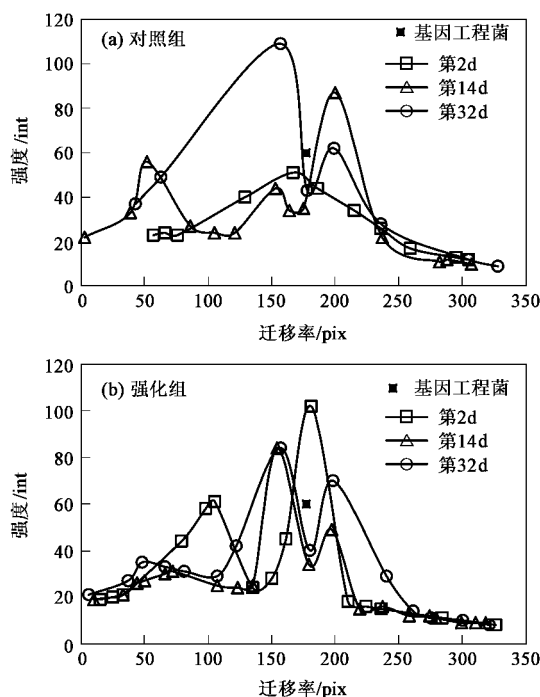


图7 在 AnSBRs 中微生物群落的 RISA 指纹分析

Fig.7 Analysis of RISA fingerprints of microbial communities in bioaugmented AnSBRs

可以形成降解酸性大红 GR 的优势菌群,并且该菌群在进水中不含有降解的目标物时也能稳定存在,当进水中重新含有酸性大红 GR,系统可以马上具有很高的脱色率,而投加固定化菌的强化 SBR 系统的脱色率始终高于对照组,这是降解酸性大红 GR 的优势菌群和固定化的 *E. coli* JM109 (pGEX-AZR) 共同作用的结果。

参考文献:

- [1] Limbergen H V, Top E M, Verstrate W. Bioaugmentation in activated sludge: current features and future perspectives [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1998, **50**(1): 16 ~ 23.
- [2] 秦华明, 朱明军, 梁世中. 分子生物学在生物强化处理环境污染物中的应用 [J]. 上海环境科学, 2003, **22**(6): 435 ~ 438.
- [3] Qu Y Y, Zhou J T, Wang J, *et al.* Microbial community dynamics in bioaugmented sequencing batch reactors for bromoamine acid removal [J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, **246**(1): 143 ~ 149.
- [4] Watanabe K, Teramoto M, Harayana S. Stable augmentation of activated sludge with foreign catabolic genes harboured by an indigenous dominant bacterium [J]. Environmental Microbiology, 2002, **4**(10): 577 ~ 583.
- [5] Watanabe K, Baker P W. Environmentally Relevant Microorganisms

- [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2000, **89**(1): 1 ~ 11.
- [6] Nicholas C M, John C F, Andrew J W. Survival and catabolic activity of natural and genetically engineered bacteria in a laboratory-scale activated-sludge [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, **57**(2): 366 ~ 373.
- [7] 全向春, 施汉昌, 王建龙, 等. 固定化细胞降解 2,4-二氯酚的动力学及其对 SBR 系统强化效果的研究 [J]. 环境科学, 2002, **23**(增刊): 36 ~ 39.
- [8] Isik M, Sponza D T. Effect of oxygen on decolorization of zao dyes by *Escherichia coli* and *Pseudomonas* sp. and fate of aromatic amines [J]. Process Biochemistry, 2003, **38**(8): 1183 ~ 1192.
- [9] Lucas M S, Amaral C, Sampaio A, *et al.* Biodegradation of the diazo dye Reactive Black 5 by a wild isolate of *Candida oleophila* [J]. Enzyme Microbiology Technology, 2006, **39**(1): 51 ~ 55.
- [10] Chen B Y. Understanding decolorization characteristics of reactive azo dyes by *Pseudomonas luteola*: toxicity and kinetics [J]. Process Biochemistry, 2002, **38**(3): 437 ~ 446.
- [11] Jurgen M, Andreas K, Angelika E, *et al.* A New Alkali-Thermostable Azoreductase from *Bacillus* sp. Strain SF [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, **70**(2): 837 ~ 844.
- [12] Blumel S, Knackmuss H J, Stolz A. Molecular cloning and characterization of the gene coding for the aerobic azoreductase from *Xenophilus azovorans* KF46F [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, **68**(8): 3948 ~ 3955.
- [13] Suzuki Y, Yoda T, Ruhul A, *et al.* Molecular Cloning and Characterization of the Gene Coding for Azoreductase from *Bacillus* sp. OY1-2 Isolated from Soil [J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, **276**(12): 9059 ~ 9065.
- [14] Nakanishi M, Yatome C, Ishida N, *et al.* Putative ACP Phosphodiesterase Gene (*acpD*) Encodes an Azoreductase [J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, **276**(49): 46394 ~ 46399.
- [15] 严滨. 球形红细菌偶氮还原酶的表达与特性研究 [D]. 大连: 大连理工大学, 2004. 56 ~ 69.
- [16] 刘幽燕, 李青云, 覃益民, 等. 聚氨酯泡沫固定化产碱杆菌细胞生物转化氰化物 [J]. 环境科学, 2006, **27**(3): 586 ~ 589.
- [17] 金玉洁. 基因工程菌对偶氮染料脱色研究 [M]. 大连: 大连理工大学, 2005. 26 ~ 27.
- [18] Yu Z T, Mohn W W. Bacterial diversity and community structure in an aerated lagoon revealed by ribosomal intergenic spacer analyses and 16S ribosomal DNA sequencing [J]. Applied Environmental Microbiology, 2001, **67**(4): 1565 ~ 1574.
- [19] Quan X C, Shi H C, Liu H, *et al.* Enhancement of 2, 4-dichlorophenol degradation in conventional activated sludge systems bioaugmented with mixed special culture [J]. Water Research, 2004, **38**(1): 245 ~ 253.
- [20] 曲媛媛. 鞘氨醇单胞菌降解溴氨酸及强化体系指纹解析 [D]. 大连: 大连理工大学, 2005. 75 ~ 76.