

基因工程菌对偶氮染料脱色及生物强化作用

金若菲*, 周集体, 王 竞, 张爱丽

(大连理工大学 环境与生命学院, 辽宁 大连 116024)

摘要: 研究了基因工程菌 *Escherichia (E.) coli* JM109 (pGEX-AZR) 对偶氮染料的脱色及生物强化能力. 实验表明, 含有 10% *E. coli* JM109 (pGEX-AZR) 的强化体系对酸冲击的承受能力没有提高, 脱色率仅为 80%; 而对碱度及盐度的冲击表现出较强的承受能力, 脱色率超过 90%. 同时在 AnSBRs 中连续运行 42 d, 强化体系耐浓度冲击的能力和脱色率均高于对照体系. 利用 RISA 测定微生物群落结构, *E. coli* JM109 (pGEX-AZR) 在强化体系中始终作为优势菌群存在并保持较高的代谢活性.

关键词: *Escherichia coli* JM109 (pGEX-AZR); 偶氮染料; 生物脱色; 生物强化; RISA

中图分类号: X52 **文献标志码:** A

0 引言

偶氮染料由于具有较好的牢度性能而被广泛应用, 其使用量占有所有染料的 60%~70%^[1]. 用生物法处理偶氮染料废水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, 因此开发了染料废水厌氧处理的生物强化工艺^[2~5], 该工艺稳定且对染料的脱色有很好的效果, 但工艺长期运行的抗冲击能力及这些外源微生物在复杂生态系统中的竞争性、与土著微生物的兼容性等并未考察.

分子生物学的发展为了解生物强化体系中微生物群落的变化及种群变迁提供了技术支持. 其中 RISA (ribosomal intergenic spacer analysis, 核糖体基因间隔序列分析) 以 ITS (16~23S rDNA intergenic transcribed sequences, 核糖体大小亚基基因间隔序列) 为研究对象, 该片段比 16S 和 23S rDNA 表现出更显著的序列尤其是长度特异性^[6,7].

本文以含偶氮还原酶的基因工程菌——*Escherichia (E.) coli* JM109 (pGEX-AZR) 为研

究对象, 研究在厌氧条件下, 该菌对偶氮染料的脱色能力及将该菌投加到厌氧 SBR 反应器中的生物强化作用, 同时用 RISA 方法研究工程菌在系统中的存在及对生物群落的影响.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 基因工程菌 实验用基因工程菌为 *Escherichia coli* JM109 (pGEX-AZR). pGEX-AZR 质粒是由载体质粒 pGEX4T-1 和 AZR 基因连接而成的. 其中载体质粒大小为 4 950 bp; AZR 基因来源于 *Rhodobacter sphaeroides* AS1. 1737 中控制偶氮还原酶的基因, 大小为 537 bp. pGEX-AZR 质粒含有氨苄霉素抗性基因, 整个质粒大小为 5 472 bp^[8].

1.1.2 无机盐培养基 1 g/L 葡萄糖, 3 g/L (NH₄)₂SO₄, 4.26 g/L Na₂HPO₄ · 12H₂O, 2.65 g/L KH₂PO₄ · 12H₂O, 0.002 g/L MnSO₄ · 7H₂O, 0.01 g/L FeSO₄ · 7H₂O, 0.2 g/L MgSO₄ · 7H₂O, 0.02 g/L CaCl₂.

1.1.3 偶氮染料 酸性红 B (单偶氮结构, 相对分子质量 502, 最大吸收波长 515 nm); 酸性大红

GR(双偶氮结构,相对分子质量 556,最大吸收波长 510 nm);直接耐晒黑 BR2L(三偶氮结构,相对分子质量 1 029,最大吸收波长 587 nm)。

1.2 实验方法

1.2.1 脱色实验方法 将培养好的菌体离心收集,洗涤,用无机盐培养基重悬,投加到 250 mL 的血清瓶中,并投加偶氮染料及无机盐培养基。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。放置于 30 ℃ 的恒温培养箱中培养。定时取样。

1.2.2 pH 冲击实验方法 实验装置同上。废水是酸性大红 GR 及无机盐培养基配制的模拟废水, pH=7.5。酸性 pH 冲击实验分 4 组进行,第 1、2 组为对照组,厌氧污泥浓度 2.5 g/L,其中第 1 对照组不调节 pH,第 2 对照组用 HCl 调节 pH 为 5;第 3、4 组为强化组,污泥为 2.5 g/L 的厌氧污泥和 0.25 g/L 的 *E. coli* JM109 (pGEX-AZR),第 3 强化组不调节 pH,第 4 强化组用 HCl 调节 pH 为 5。

碱性 pH 冲击实验的方法同上,只是用 NaOH 调节 pH 为 9。

1.2.3 盐度冲击实验方法 盐度冲击实验的方法同上,只是用 NaCl 调节盐度为 3%。

1.2.4 连续强化实验方法 生物强化反应器投入 2.5 g/L 厌氧污泥和 0.25 g/L *E. coli* JM109 (pGEX-AZR);对照反应器内投加 2.5 g/L 厌氧污泥。废水是酸性大红 GR 及无机盐培养基配制的模拟废水,采用厌氧序批方式运行,运行周期 12 h,其中进水 10 min,反应 11 h,沉淀 40 min,出水 10 min。为了保持厌氧环境,反应器下部通入氮气,顶部用橡胶塞子密封,塞子上留有排气孔。反应器体积均为 2.5 L。

1.2.5 RISA 实验方法 针对 ITS 片段的 PCR 引物由大连宝生物公司合成,碱基序列^[9]为

926F: 5'-CTYAAAKGAATTGACGG-3'

189R: 5'-TACTGAGATGYTTMARTTC-3'

污泥 DNA 提取方法参照文献^[10]。ITS 片段的 PCR 扩增采用 50 μ L 体系:2 μ L Template (Genomic DNA);引物 F 0.5 μ L;引物 R 0.5 μ L; dNTP 4 μ L;10 $\times$ Buffer 5 μ L; Ex-Taq 0.25 μ L;加水直到 50 μ L。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 μ L 进行 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。

1.3 分析方法

染料的浓度用比色法测定。首先,在染料最大吸收波长下,测定染料的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 8 000 r/min 下离心 10 min,取上清液在最大吸收波长处测定吸光度,通过标准曲线计算其浓度。

2 结果与讨论

2.1 *E. coli* JM109 (pGEX-AZR)对偶氮染料的脱色

考察 *E. coli* JM109 (pGEX-AZR)对各种结构偶氮染料的脱色能力。实验中,菌体浓度为 2 g/L,偶氮染料浓度为 200 mg/L。实验结果表明基因工程菌在厌氧条件下,对各种结构的偶氮染料都有较强的脱色能力。对单偶氮的酸性红 B,1.5 h 脱色率就达到 85%以上,2 h 达到了 95%以上。而对结构相对复杂的双偶氮和三偶氮染料的脱色率也可达到 85%以上(图 1)。

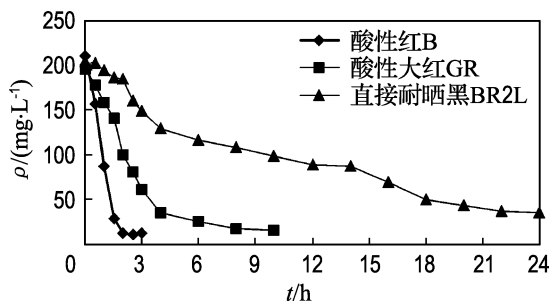


图 1 *E. coli* JM109 (pGEX-AZR)对偶氮染料的脱色

Fig. 1 Azo dye decolorization by *E. coli* JM109 (pGEX-AZR)

E. coli JM109 (pGEX-AZR)对偶氮染料的高效脱色性能表明,该菌作为一种强化菌制剂应用于含偶氮染料的废水处理中是完全可行的。

2.2 pH 冲击实验

pH 对菌体的生长具有重要影响。本实验考察在

酸性或碱性条件下,生物强化体系的抗冲击能力.

2.2.1 pH=5 时的强化效果 如图 2 所示,在 pH=7.5 时,强化组的脱色速率高于对照组. 当 pH=5 时,包括工程菌在内各种菌群的活性都受到一定的抑制,从而影响脱色情况,强化组和对照组的脱色能力均低于正常条件下的脱色率. 结果表明,对于酸性冲击, *E. coli* JM109 (pGEX-AZR) 的加入没有提高厌氧处理系统脱色能力及脱色速率.

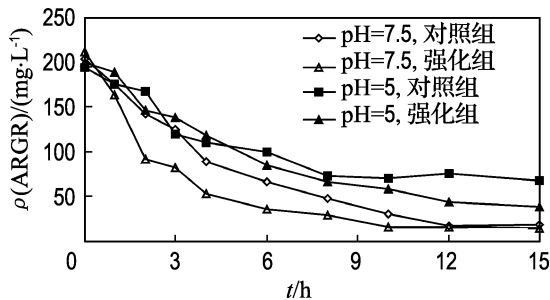


图 2 生物强化系统在酸性条件下对酸性大红 GR 的脱色

Fig.2 Effects of acid shock on Acid Red GR decolorization in bioaugmented systems

2.2.2 pH=9 时的强化效果 如图 3 所示,在对照组中,当 pH=9 时,脱色速率有所降低,说明厌氧污泥在碱性条件下活性受到了抑制. 而无论 pH=9 还是 pH=7.5,加入 *E. coli* JM109 (pGEX-AZR) 的强化组的处理效果均优于对照组,对酸性大红 GR 的脱色速率有一定提高,说明 *E. coli* JM109 (pGEX-AZR) 的加入提高了体系对碱性冲击的耐受能力.

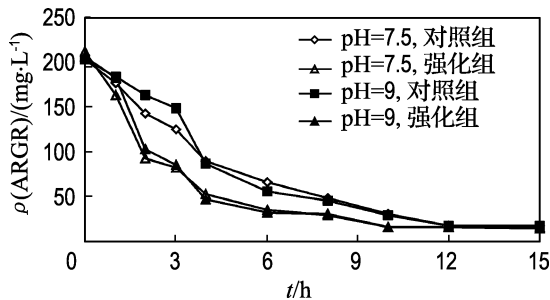


图 3 生物强化系统在碱性条件下对酸性大红 GR 的脱色

Fig.3 Effects of alkali shock on Acid Red GR decolorization in bioaugmented systems

印染废水具有碱度大的特点^[10], pH 往往达到 9 以上,因此该强化体系对碱度的耐受能力对工业应用具有重要意义.

2.3 盐度冲击实验

在染料的生产过程中通常会有盐析过程,因此染料废水的盐度一般高于一般工业废水,要求生物处理系统具有一定的耐盐能力. 如图 4 所示, *E. coli* JM109 (pGEX-AZR) 对高盐度具有较好的耐受能力,强化组的脱色效率高于对照组.

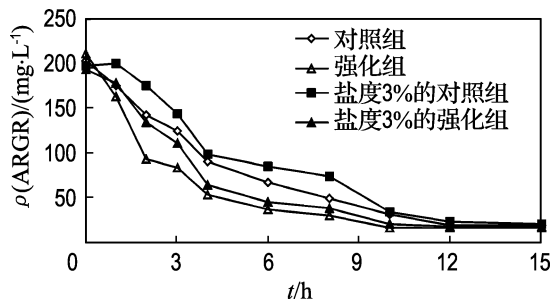


图 4 生物强化系统在高盐度条件下对酸性大红 GR 的脱色

Fig.4 Effects of salt shock on Acid Red GR decolorization in bioaugmented systems

2.4 连续强化实验

在强化和对照反应器中进行酸性大红 GR 模拟废水的脱色实验,观察两体系对染料的脱色能力. 酸性大红 GR 的初始浓度为 50 mg/L,并逐渐提高至 400 mg/L.

由图 5 可知,在进水的初始阶段染料浓度为 50 mg/L,强化和对照体系的脱色效果差别不大,当染料浓度突然升高时,强化系统的耐冲击能力明显高于对照组,说明 *E. coli* JM 109 (pGEX-AZR) 对反应器有一定强化作用. 当进水染料浓

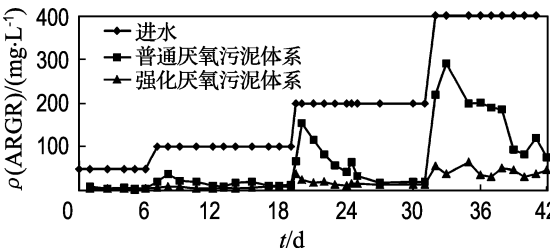


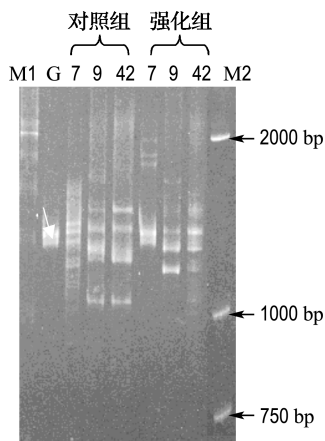
图 5 生物强化体系中 *E. coli* JM109 (pGEX-AZR) 对酸性大红 GR 的脱色

Fig.5 Acid Red GR decolorization by *E. coli* JM109 (pGEX-AZR) in bioaugmented systems

度增高到 200 mg/L,运行 19 d 时,对照系统的耐冲击能力和脱色效果都明显低于强化系统. 系统运行 31 d 时,染料浓度增加到 400 mg/L,发现 *E. coli* JM 109(pGEX-AZR)对系统具有明显的强化作用,脱色率保持在 90%左右,而对照系统的脱色率仅为 80%左右.

2.5 连续强化实验的 RISA 指纹分析

对上述实验运行到第 7、9、42 d 的对照组和强化组的污泥进行取样,采用 RISA 方法分析其系统的群落动态. RISA 图谱见图 6,其中 G 带是菌株 *E. coli* JM 109(pGEX-AZR)的 RIS,约 1.3 kb. 利用 Gel Image System 图像分析软件对 RISA 指纹图谱进行分析,对每条泳道中不同条带的迁移率(P)及强度作图,见图 7、8.



M1:200 bp DNA Ladder Marker; G: *E. coli* JM 109 (pGEX-AZR); 对照组 7、9、42: 对照组 7、9、42 d 时污泥的 RIS; 强化组 7、9、42: 强化组 7、9、42 d 时污泥的 RIS; M2: DNA Marker DL2000

图 6 强化体系中微生物群落的 RISA 指纹解析

Fig. 6 Analysis of RISA fingerprints of microbial communities in bioaugmented systems

如图 7 所示,对照组经过 7 d 的适应,与 *E. coli* JM 109 (pGEX-AZR) 的 RIS 在同样位置形成了优势菌群,并且该菌群丰度较高,对染料具有较强的脱色能力. 但运行到第 9 d 时,由于染料浓度的突然增高,该菌群不能马上适应浓度冲击,丰度降低. 经过一段长时间运行后,到 42 d 时,菌群丰度有所提高,使系统保持一定的处理效果.

在图 8 中,强化组由于 *E. coli* JM 109 (pGEX-AZR) 的投加,该菌群具有较高的丰度. 但运行到第 9 d 时,同样该菌群受到浓度冲击,但丰

度降低较少,说明 *E. coli* JM 109 (pGEX-AZR) 与自然形成的优势菌群相比,具有较高的耐冲击能力. 此后 *E. coli* JM 109 (pGEX-AZR) 始终保持较高的丰度,作为群落的优势菌存在,并保持较高的代谢活性.

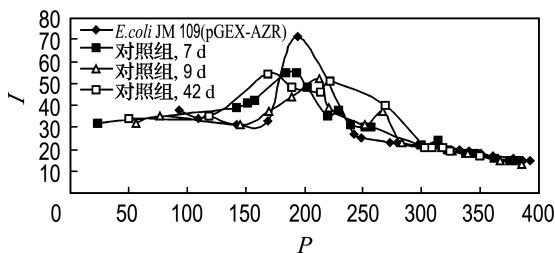


图 7 对照 AnSBR 中微生物群落的 RISA 指纹变化

Fig. 7 Change of RISA fingerprints of microbial communities in control AnSBR

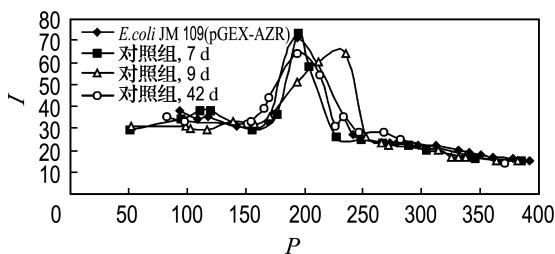


图 8 强化 AnSBR 中微生物群落的 RISA 指纹变化

Fig. 8 Change of RISA fingerprints of microbial communities in bioaugmented AnSBR

整个连续强化实验表明, *E. coli* JM 109 (pGEX-AZR) 强化的厌氧处理系统具有较强的适应性及脱色能力,说明该菌可以在多菌株共存的生物处理系统中稳定存在,具有很强的适应性及生存能力. 因此,可以认为该基因工程菌可以作为菌剂在偶氮染料废水处理中起到重要作用.

3 结 论

(1) 基因工程菌 *E. coli* JM 109 (pGEX-AZR) 对单、双、三偶氮染料都具有脱色性能.

(2) *E. coli* JM 109 (pGEX-AZR) 强化的厌氧处理系统,对酸冲击的耐受能力没有提高,但具有明显的耐受碱及盐度冲击的能力.

(3) 在 AnSBR 中, *E. coli* JM 109 (pGEX-AZR) 强化系统的脱色能力及耐冲击负荷能力均

高于对照组. RISA 指纹分析表明基因工程菌 *E. coli* JM 109 (pGEX-AZR)可以在多菌株共存的生物处理系统中稳定存在,具有很强的适应性及生存能力.

参考文献:

- [1] VAN DER ZEE F P, BISSCHOPS I A E, BLANCHARD V G, *et al.* The contribution of biotic and abiotic processes during azo dye reduction in anaerobic sludge [J]. **Water Research**, 2003, **37**(13):3098-3109
- [2] CHEN B Y, CHEN S Y, LIN M Y, *et al.* Exploring bioaugmentation strategies for azo-dye decolorization using a mixed consortium of *Pseudomonas luteola* and *Escherichia coli* [J]. **Process Biochemistry**, 2006, **41**(7):1574-1581
- [3] 竺建荣,杨艳茹,安虎仁. 厌氧UASB-好氧工艺处理染料废水的研究[J]. 环境科学, 1994, **15**(4):31-34
- [4] 徐向阳,郑 平,俞秀娥. 染化废水厌氧生物处理技术的研究[J]. 环境科学学报, 1998, **18**(2):153-159
- [5] 徐向阳,张明洲,俞秀娥. 高效脱色菌的特性及其在染化废水厌氧处理中的生物强化作用[J]. 中国沼气, 2001, **19** (2):3-7,29
- [6] 田扬捷,杨 虹,吴秀娟,等. 综合应用 ITS 及 16S rDNA 进行环境微生物生态研究[J]. 微生物学通报, 2004, **31**(4):85-88
- [7] YU Z T, MOHN W W. Bioaugmentation with resin acid-degrading bacteria enhances resin acid removal in sequencing batch reactors treating pulp mill effluents [J]. **Water Research**, 2001, **34**(4):883-890
- [8] WANG Jing, YAN Bin, ZHOU Ji-ti, *et al.* Biodegradation of azo dyes by genetically engineered azoreductase [J]. **Journal of Environmental Sciences**, 2005, **17**(4):545-550
- [9] 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
- [10] 高平平,赵立平. 可用于微生物群落分子生态学研究的活性污泥总 DNA 提取方法研究[J]. 生态学报, 2002, **22**(11):2015-2019

Decolorization and bioaugmentation on azo dye using gene engineering strain *Escherichia coli* JM109 (pGEX-AZR)

JIN Ruo-fei*, ZHOU Ji-ti, WANG Jing, ZHANG Ai-li

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

Abstract: Decolorization and bioaugmentation on azo dye are investigated by using gene engineering strain *Escherichia (E.) coli* JM109 (pGEX-AZR). It is shown that the tolerance to acid shock of the bioaugmentation system with 10% *E. coli* JM109 (pGEX-AZR) is not enhanced, and the colorific removal is only 80%. High tolerance is observed to alkali and salt shock. The colorific removal exceeds 90%. Continuous operating in AnSBRs for 42 d, both the tolerance to concentration shock and the colorific removal are higher than that of the control system. Changes in microbial community structures can be detected by RISA, the introduced *E. coli* JM109 (pGEX-AZR) is persistent in the augmented systems and maintains high metabolic activity.

Key words: *Escherichia coli* JM109 (pGEX-AZR); azo dye; bacterial decolorization; bioaugmentation; RISA