

共固定化醌还原菌群与蒽醌促进偶氮染料生物脱色

王 竞*, 苏妍彦, 李丽华, 吕 红, 金若菲, 周集体

(大连理工大学 环境学院, 辽宁 大连 116024)

摘要: 水溶性氧化还原介体可加速偶氮染料厌氧生物脱色, 但会随出水而流失, 造成二次污染. 将醌还原菌群与非水溶性介体——蒽醌共固定化, 考察了其对偶氮染料生物脱色的影响. 克隆和 RIS 片段测序结果表明, 醌还原菌群主要包括乳杆菌科 (*Lactobacillaceae*)、肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*) 和拟杆菌科 (*Bacteroidaceae*); 共固定化醌还原菌群与蒽醌对 10 种不同结构偶氮染料的生物脱色速率提高 1.3~2.1 倍; 共固定化菌球经 10 次循环使用后, 对活性艳红 KE-3B 脱色率仍保持在 85% 以上.

关键词: 醌还原菌群; 蒽醌; 共固定化; 偶氮染料; 生物脱色

中图分类号: X172 **文献标志码:** A

0 引 言

偶氮染料广泛应用于纺织品、皮革、纸张、塑料、化妆品和食品染色. 在染料的生产和使用中, 有 10%~15% 的染料随废水排入环境水体, 加之偶氮染料的前体及其降解产物的致癌、致畸、致突变的“三致”作用, 可引起严重的公众健康和环境问题^[1]. 目前, 偶氮染料废水的处理有物理法、化学法、生物法及这些方法的组合. 由于生物法具有操作简单、运行成本低、无二次污染的优点, 是上述废水的首选处理技术, 其中厌氧-好氧工艺 (A/O) 是处理这类废水的最有效方法^[2]. 虽然厌氧处理可提高后续好氧生化性, 但厌氧微生物代谢速率慢, 是偶氮染料完全生物降解的瓶颈^[3].

许多研究表明, 2,6-二磺酸蒽醌 (AQDS) 等醌类化合物可以作为氧化还原介体, 加速电子从最初电子供体向电子受体的传递, 从而加速偶氮染料的厌氧脱色^[3~6]. 但 AQDS 等一些水溶性介体在水处理体系中会随出水而流失, 造成二次污染.

Van der Zee 等发现活性炭可被生物还原并可作为氧化还原介体, 其活性基团被认为是醌/羰基. 但活性炭接受电子的能力比小分子化合物 AQDS 低得多, 后者是前者的 6.1 倍^[7]. 而且活性

炭本身具有的以及氧化改性生成的醌/羰基大多位于孔径小于 2 nm 的微孔处^[8], 而微生物通常大于 0.2 μm , 难以接触到微孔, 因此, 其中的醌/羰基起到的催化作用有限. 本实验室曾使用海藻酸钙固定化蒽醌作为介体, 发现它可使几种偶氮染料的生物脱色速率提高 0.5~1.0 倍^[9]. 但由于菌体与介体的接触限制, 该固定化蒽醌的催化活性有待于进一步提高. 本文将醌还原菌群与蒽醌共固定化, 以解决上述问题.

1 材料与方法

1.1 醌还原菌群

醌还原菌群由本实验室从多种厌氧污泥中以 AQDS 为电子受体富集获得^[10].

1.2 培养基

生长培养基 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 组成为 NH_4Cl 1.0, KH_2PO_4 0.5, K_2HPO_4 0.6, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.2, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05, AQDS 0.15, 葡萄糖 0.5; $\text{pH}=7.0$. 无机盐培养基为不含葡萄糖和 AQDS 的生长培养基.

1.3 引 物

实验所用引物如下.

926F: 5'-CTYAAAKGAATTGACGG-3';

189R: 5'-TACTGAGATGYTTMARTTC-3';

RV-M: 5'-GAGCGGATAACAATTTCA-CACAGG-3';

M13-47: 5'-CGACGTTGTAAAACGACG-GCCAGT-3'

上述引物均由大连宝生物公司合成。

1.4 菌群培养

醌还原菌群接种于生长培养基中,于30℃厌氧培养箱中静置培养。当达到对数生长期时在8000 r·min⁻¹下离心10 min,弃去上清液,用0.1 mol/L pH 7.0的磷酸盐缓冲溶液洗涤,再次离心,如此反复洗涤3次,最后将离心后的菌体用磷酸盐缓冲溶液配制成为约10 g·L⁻¹菌悬液。

1.5 文库构建及测序

以醌还原菌群基因组DNA为模板,采用引物926F和189R扩增得到的RIS片段用TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Version 2.0 (Code No. DV805A)切胶回收后,分别与pMD18-T载体进行16℃连接后,热转化至*E. coli* Competent Cell JM109 (Code No. D9052)中,涂布平板,过夜培养菌体。从转化平板中分别随机选取单克隆,采用菌体PCR法鉴定阳性克隆。首先用无菌牙签挑取单菌落,加入到装有11.5 μL ddH₂O的离心管中,作为模板。PCR采用25 μL体系:含模板的ddH₂O 11.5 μL, TaKaRa Premix Taq™ (Ex Taq™ Version) 12.5 μL,引物F(10 pmol·μL⁻¹) 0.5 μL,引物R(10 pmol·μL⁻¹) 0.5 μL。PCR条件:94℃预变性10 min,然后进入30个循环(94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 90 s),最后在4℃下延伸99 min 99 s。反应完毕后,取6 μL PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳检测。

随机挑选20个阳性克隆,提取质粒后,分别采用BcaBEST™ Primer RV-M或M13-47测序。

1.6 共固定化方法

(1)将1.1 g海藻酸钠加热溶于20 mL去离子水中,并冷却至30℃;

(2)将(1)中的海藻酸钠-水混合物与同体积的菌悬液混合,并加入0.2 g蒽醌粉末,搅拌均匀;

(3)用注射器将(2)中混合物滴入5% CaCl₂

溶液中,制成小球,用生理盐水冲洗2次,于4℃冰箱中交联4 h,备用。

1.7 偶氮染料脱色

脱色在135 mL血清瓶中进行。在厌氧培养箱中,将共固定化菌球或固定化菌球、葡萄糖、偶氮染料加入到血清瓶中,以无机盐培养基充满。最终的菌球浓度为120 g·L⁻¹,葡萄糖浓度为0~1.0 g·L⁻¹,偶氮染料浓度为180 mg·L⁻¹。使用橡胶塞密封瓶口,30℃厌氧培养箱中静置培养12 h,均为3个平行样。

1.8 染料脱色率测定

取培养液离心后(9000 r/min, 10 min)的上清液,以去离子水为参比,利用JASCO V-560紫外可见分光光度计,在染料相应的最大吸收波长处测量其吸光度。

$$r = (A_0 - A_t) / A_0 \times 100\%$$

式中: A_0 、 A_t 分别为初始时刻和培养 t 时刻上清液的吸光度; r 为脱色率, %。

2 结果与讨论

2.1 醌还原菌群的特征

醌还原菌群在深层琼脂生长培养基中培养时,接近表面生长相对旺盛,中部生长较均匀,底部基质被还原成橙黄色。因此,醌还原菌群可能由兼氧菌、厌氧菌构成。在有氧的情况下,菌群倾向于以氧作为氢受体,在缺氧情况下,菌群以醌化合物为电子受体。图1给出了醌还原菌群在生长培养基中培养时紫外-可见光谱的变化,可见,随着时间的推移,329 nm处的特征吸收峰逐渐减弱直至完全消失,而在385和405 nm处则出现新的特

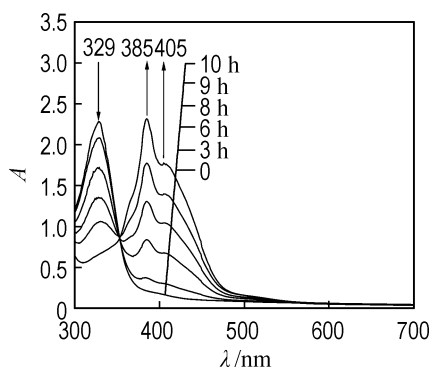


图1 醌还原菌群对AQDS还原过程的波谱

Fig. 1 Spectra during reduction process of AQDS by quinone-reducing consortium

征吸收峰,并且强度不断增大;同时生长培养基的颜色也发生了显著变化,由培养前的无色逐渐转变为橙黄色.表明 AQDS 被还原为 AH₂QDS,由醌式结构转变为二酚型结构(氢醌).该菌群仅 10 h 就可使 150 mg · L⁻¹ AQDS 完全还原.

醌还原菌群的 RIS (ribosomal intergenic spacer)指纹解析表明,该菌群富集过程中群落结构发生了显著变化^[10].在本研究中,对醌还原菌群 RIS 片段切胶回收后克隆,将随机挑选的 20 个阳性克隆进行测序,然后与已知的 16S rDNA

序列进行同源性比较,结果如表 1 所示.可见,醌还原菌群归属于乳杆菌科 (*Lactobacillaceae*) (65%)、肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*) (30%) 和拟杆菌科 (*Bacteroidaceae*) (5%).研究发现,在自然环境和活性污泥中醌还原菌广泛分布,如发酵性细菌 *Propionibacterium freudenreichii*、硫酸盐还原菌 *Desulfitobacterium dehalogenans*、产甲烷菌 *Methanospirillum hungatei*、三价铁还原菌 *Pantoea agglomerans*、*Geobacter metallireducens*、*Shewanella putrefaciens* 等^[11~13].

表 1 克隆测序结果
Tab.1 Sequencing results of clones

克隆名称	Genbank 登录号	最相似菌种	相似性/%	科
1-1	EU014852	<i>Enterobacter aerogenes</i>	99	<i>Enterobacteriaceae</i>
1-2	EU014853	<i>Klebsiella sp.</i>	99	<i>Enterobacteriaceae</i>
1-3	EU014854	<i>Klebsiella sp.</i>	99	<i>Enterobacteriaceae</i>
1-4	EU014855	<i>Lactococcus sp.</i>	99	<i>Lactobacillaceae</i>
1-5	EU014856	<i>Klebsiella sp.</i>	99	<i>Enterobacteriaceae</i>
1-6	EU014857	<i>Trichococcus flocculiformis</i>	99	<i>Lactobacillaceae</i>
1-7	EU014858	<i>Trichococcus flocculiformis</i>	99	<i>Lactobacillaceae</i>
1-8	EU014859	<i>Trichococcus flocculiformis</i>	99	<i>Lactobacillaceae</i>
1-9	EU014860	<i>Klebsiella sp.</i>	99	<i>Enterobacteriaceae</i>
1-10	EU014861	<i>Trichococcus flocculiformis</i>	99	<i>Lactobacillaceae</i>
1-11	EU014862	<i>Lactococcus sp.</i>	99	<i>Lactobacillaceae</i>
1-12	EU014863	<i>Trichococcus flocculiformis</i>	99	<i>Lactobacillaceae</i>
1-13	EU014864	<i>Trichococcus flocculiformis</i>	99	<i>Lactobacillaceae</i>
1-14	EU014865	<i>Trichococcus flocculiformis</i>	99	<i>Lactobacillaceae</i>
1-15	EU014866	<i>Trichococcus flocculiformis</i>	99	<i>Lactobacillaceae</i>
1-16	EU014867	<i>Klebsiella sp.</i>	99	<i>Enterobacteriaceae</i>
1-17	EU014868	<i>Lactococcus sp.</i>	99	<i>Lactobacillaceae</i>
1-18	EU014869	<i>Trichococcus flocculiformis</i>	99	<i>Lactobacillaceae</i>
1-19	EU014870	<i>Dysgonomonas wimpennvi</i>	99	<i>Bacteroidaceae</i>
1-20	EU014871	<i>Lactosphaera pasteurii</i>	99	<i>Lactobacillaceae</i>

2.2 共固定化醌还原菌群与蒽醌对酸性大红 3R 的脱色

前期实验已证实,该醌还原菌群不仅可还原 AQDS 和溴氨酸等水溶性醌类化合物,而且可以许多固态蒽醌类化合物作为氧化还原介体加速偶氮染料生物脱色^[10,14].本研究以蒽醌作为固态介体,并与醌还原菌群共固定化,其形貌特征如图 2 所示.可见,蒽醌被包埋在菌球中,并以晶体结构存在.

以固定化蒽醌(不含菌体)和固定化菌球(不含蒽醌)为对照,葡萄糖浓度为 0.5 g · L⁻¹,考察了共固定化菌球对酸性大红 3R 的生物脱色,结

果如图 3 所示.只投加固定化蒽醌时,由于海藻酸钙固定化球对酸性大红 3R 有一定的吸附脱色作用,在 12 h 内吸附脱色率(η)达 15%;固定化菌球对酸性大红 3R 的脱色率在 12 h 内可达到 43%;而共固定化菌球在 12 h 内脱色率接近于 100%,显示了很好的脱色效果.Stolz 研究表明^[3],在适宜电子供体存在下,氧化还原介体可被定位于细胞膜上的介体还原酶还原为氢醌,后者作为电子供体可无选择性地还原许多氧化性化合物,如卤代以及含偶氮或硝基芳烃等,并完成介体的再生,从而加速电子在电子供体与受体之间的传递.这种生物-化学组合机理在难降解有机物处理中具

有独特的优势,尤其是该反应可在胞外进行,对于难以进入细胞内的高极性或结构复杂的有机物、

有毒难降解有机物(如偶氮染料),可大幅度提高其生物降解速率.

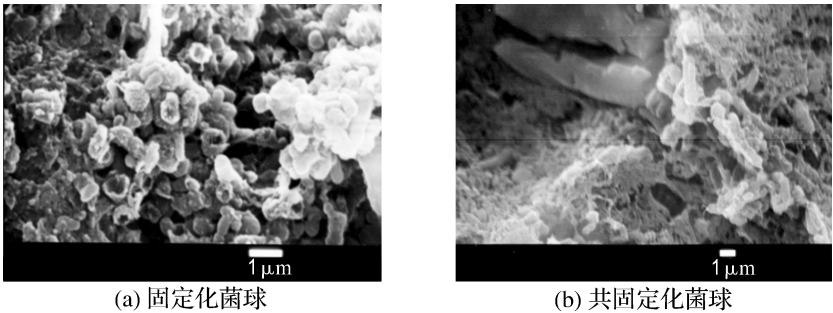


图 2 固定化菌球及共固定化菌球的电镜照片

Fig.2 SEM photos of immobilized and co-immobilized beads

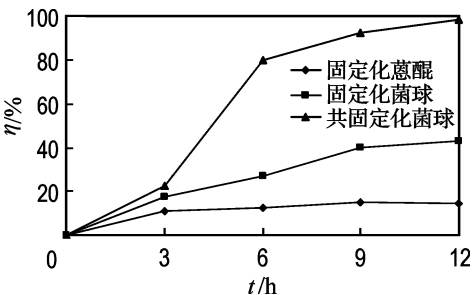


图 3 对酸性大红 3R 的生物脱色

Fig.3 Biodecolorization of Acid Red 3R

2.3 共底物浓度对共固定化菌球脱色酸性大红 3R 的影响

共底物为偶氮染料的生物脱色提供电子供体,而且其浓度对偶氮染料废水 A/O 处理工艺的 COD 去除率有显著的影响^[15]. 已证实葡萄糖是该醌还原菌群最适宜的共底物(电子供体)^[10]. 图 4 显示了葡萄糖浓度对共固定化菌球脱色酸性大红 3R 的影响. 可见,葡萄糖浓度为 0.5 g · L⁻¹ 时脱色率最高,达到 98%. 继续提高外加葡萄糖浓度,脱色率下降,其原因可能是高浓度葡萄糖会导致非醌还原菌的过度生长,影响菌群结构中醌还原微生物的优势地位;或(和)高浓度葡萄糖会导致有毒代谢产物的过度积累. 在以下实验中,葡萄糖浓度均为 0.5 g · L⁻¹.

2.4 共固定化菌球对不同偶氮染料生物脱色的加速作用

为了考察介体与菌体共固定化技术对加速偶氮染料废水生物脱色的广谱性,选择了 10 种水溶性染料,包括酸性(4 种)、活性(4 种)、直接(2 种),脱色时间为 12 h. 结果如图 5 所示. 可见,共

固定化菌球对单偶氮和双偶氮染料的脱色率均可达到 90% 以上;对含有多个磺酸基且相对分子质量较大的活性艳红 KE-3B、直接耐晒蓝 B2RL 以

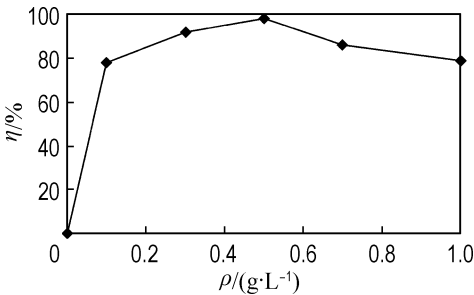
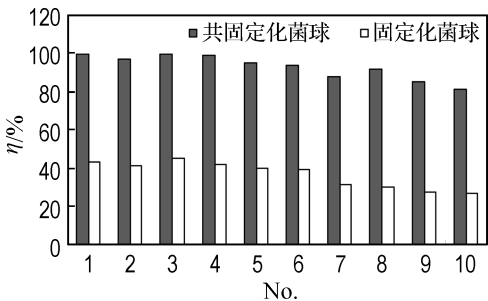


图 4 葡萄糖浓度对共固定化菌球脱色酸性大红 3R 的影响

Fig.4 Effect of glucose concentrations on decolorization of Acid Red 3R by co-immobilized beads



1 酸性红 B; 2 酸性品红 6B; 3 酸性大红 3R; 4 萘菜红; 5 活性红 X-3B; 6 活性艳红 K-2G; 7 活性艳红 KE-3B; 8 活性艳红 K-2BP; 9 直接耐晒蓝 B2RL; 10 直接耐晒黑 GF

图 5 共固定化菌球对不同偶氮染料的脱色
Fig.5 Decolorization of different azo dyes by co-immobilized beads

及直接耐晒黑 GF 的脱色率也可达到 80% 以上. 10 种偶氮染料的生物脱色率不同可能是由它们的分子结构和氧化还原电位的差异所致. 相对于固定化菌球, 共固定化菌球对 10 种偶氮染料的生物脱色速率提高 1.3~2.1 倍. Guo 等研究表明, 使用固定化蒽醌作为介体可使几种偶氮染料的脱色速率提高 0.5~1.0 倍^[9]. 而共固定化技术不仅可使介体固定在反应器中, 而且克服了菌体与介体的接触限制, 从而使其催化活性得以进一步提高. 通过上述分析, 介体与菌体共固定化能够加速多种结构类型的偶氮染料生物脱色, 具有广谱性, 在实际染料废水处理中有良好的应用前景.

2.5 共固定化菌球的稳定性

共固定化菌球循环使用的脱色效果如图 6 所示. 可见, 经过 10 次循环, 共固定化菌球对活性艳红 KE-3B 仍然具有较好的脱色效果, 脱色率保持在 85% 以上. 活性艳红 KE-3B 典型的脱色过程如图 7 所示. 可见光区 513 和 538 nm 处的吸收峰

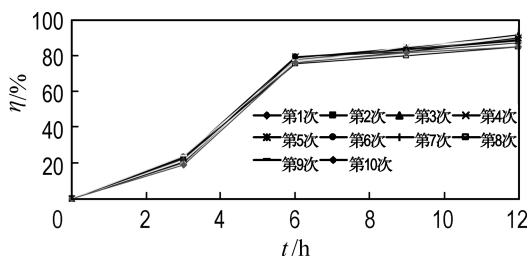


图 6 共固定化菌球循环使用对活性艳红 KE-3B 的脱色效果

Fig. 6 Decolorization of Active Red KE-3B with repeated batch cycles of co-immobilized beads

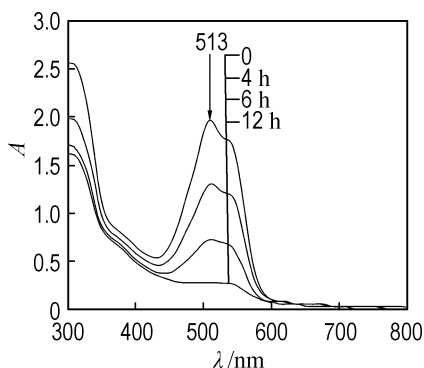


图 7 共固定化菌球对 KE-3B 脱色过程中的紫外-可见波谱

Fig. 7 UV-VIS spectra during KE-3B biodecolorization by co-immobilized beads

逐渐降低, 说明 KE-3B 的发色基团——偶氮键断裂了. 但随着使用次数的进一步增加, 海藻酸钙共固定化菌球的强度将有所降低, 因此, 有必要选择性能更好的固定化载体, 以提高固定化菌球的耐冲击能力, 增加菌球的循环使用次数. 目前该研究工作正在进行中.

3 结 论

(1) RIS 片段测序表明, 醌还原菌群主要包括乳杆菌科 (*Lactobacillaceae*)、肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*) 和拟杆菌科 (*Bacteroidaceae*).

(2) 共固定化醌还原菌群与蒽醌可以大幅度强化多种偶氮染料的生物脱色, 包括酸性、活性和直接染料.

(3) 共固定化菌球经 10 次循环使用后, 对活性艳红 KE-3B 脱色率仍保持在 85% 以上.

参考文献:

- [1] PANDEY A, SINGH P, IYENGAR L. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2007, **59**(2):73-84
- [2] VAN DER ZEE F P, VILLAVERDE S. Combined anaerobic-aerobic treatment of azo dyes — A short review of bioreactor studies [J]. *Water Research*, 2005, **39**(8):1425-1440
- [3] STOLZ A. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, **56**(1-2):69-80
- [4] ENCINAS-YOCUPICIO A A, RAZO-FLORES E, SÁNCHEZ-DÍAZ F, *et al.* Catalytic effects of different redox mediators on the reductive decolorization of azo dyes [J]. *Water Science and Technology*, 2006, **54**(2):165-170
- [5] RAU J, KNACKMUS H J, STOLZ A. Effects of different quinoid redox mediators on the anaerobic reduction of azo dyes by bacteria [J]. *Environmental Science and Technology*, 2002, **36**(7):1497-1504
- [6] VAN DER ZEE F P, BOUWMAN R H, STRIK D P. Application of redox mediators to accelerate the transformation of reactive azo dyes in anaerobic bioreactors [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2001, **75**(6):691-701

- [7] VAN DER ZEE F P, BISSCHOPS I A, LETTINGA G. Activated carbon as an electron acceptor and redox mediator during the anaerobic biotransformation of azo dyes [J]. **Environmental Science and Technology**, 2003, **37**(2):402-408
- [8] LÓPEZ F, MEDINA F, PRODANOV M, *et al.* Oxidation of activated carbon: application to vinegar decolorization [J]. **Journal of Colloid and Interface Science**, 2003, **257**(2):173-178
- [9] GUO J B, ZHOU J T, WANG D, *et al.* Biocatalyst effects of immobilized anthraquinone on the anaerobic reduction of azo dyes by the salt-tolerant bacteria [J]. **Water Research**, 2007, **41**(2):426-432
- [10] 方连峰. 醌化合物催化强化偶氮染料生物脱色研究 [D]. 大连:大连理工大学, 2007
- [11] CERVANTES F J, GUTIERREZ C H, LOPEZ K Y, *et al.* Contribution of quinone-reducing microorganisms to the anaerobic biodegradation of organic compounds under different redox conditions [J]. **Biodegradation**, 2008, **19**(2):235-246
- [12] CERVANTES F J, DUONG-DAC T, IVANOVA A E, *et al.* Selective enrichment of *Geobacter sulfurreducens* from anaerobic granular sludge with quinones as terminal electron acceptors [J]. **Biotechnology Letters**, 2003, **25**(1):39-45
- [13] CERVANTES F J, DE BOK F A, DAC T D, *et al.* Reduction of humic substances by halorespiring, sulphate-reducing and methanogenic microorganisms [J]. **Environmental Microbiology**, 2002, **4**(1):51-57
- [14] 苏妍彦,王 竞,周集体,等. 蒽醌染料中间体催化强化偶氮染料生物脱色 [J]. 环境科学, 2008, **29**(7):1986-1991
- [15] ONG S A, TOORISAKA E, HIRATA M, *et al.* Granular activated carbon-biofilm configured sequencing batch reactor treatment of C. I. Acid Orange 7 [J]. **Dyes and Pigments**, 2008, **76**(1):142-146

Enhanced biodecolorization of azo dyes by co-immobilization of quinone-reducing consortium and anthraquinone

WANG Jing*, SU Yan-yan, LI Li-hua, LÜ Hong, JIN Ruo-fei, ZHOU Ji-ti

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

Abstract: The decolorization rate of azo dyes under anaerobic conditions can be improved by the addition of water-soluble redox mediators. However, the continuous dosing and discharge of water-soluble redox mediators, such as biologically recalcitrant compounds, will result in the secondary contamination. The accelerating effect of co-immobilization of quinone-reducing consortium and insoluble anthraquinone in the biodecolorization of azo dyes was investigated for the first time. The cloning and sequencing analysis of ribosomal intergenic spacer (RIS) genes show that quinone-reducing community is predominate by *Lactobacillaceae*, *Enterobacteriaceae* and *Bacteroidaceae*; the decolorization rates of a broad range of azo dyes are greatly improved by co-immobilized beads as 1.3-2.1-fold increases; after ten repeated experiments, the decolorization rate of Active Red KE-3B by co-immobilized beads retains over 85%.

Key words: quinone-reducing consortium; anthraquinone; co-immobilization; azo dyes; biodecolorization