

摘 要

偶氮染料多具致癌作用,对人体健康危害极大,并且偶氮染料废水为高盐废水,对微生物的生长产生抑制作用,因此含偶氮化合物废水的处理成为环境污染治理的焦点问题。本论文通过研究耐盐菌株菌株 GYZ(*Staphylococcus sp.*)对高盐偶氮染料废水的降解特性及其胞内粗酶的活性,来解决高含盐染料废水中高盐对传统生物处理系统抑制和偶氮染料厌氧生物降解效率低的问题。

实验中首先考察了耐盐菌株 GYZ 的生长和降解偶氮染料 GR 的基本特性。菌株 GYZ 对氨苄青霉素具有抗性,对其它所试抗生素均无抗性。耐盐菌株 GYZ 可以在盐度为 1~20%条件下生长,在盐度为 10%条件下最适宜。耐盐菌株 GYZ 生长和降解的最优条件为温度 30℃、pH 值 7.2~7.5。在高盐条件下不仅对酸性大红 GR 具有较高脱色效果,对其它所选的 9 种染料也具有较好的脱色效果。

采用测定一定反应体系的吸光度随时间的变化来考察偶氮还原酶在不同条件下对偶氮染料的降解脱色速率。通过对反应体系 pH 值的考察,确定 pH=8 为该偶氮还原酶脱色反应的最适 pH。在 20~60℃之间考察温度变化对反应体系的影响,确定 40℃为该耐盐菌 GYZ 偶氮还原酶脱色反应的最适温度。

以酸性红 B 为底物,研究了耐盐菌株 GYZ 偶氮还原酶的降解动力学及降解机理。实验研究表明,其酶促反应动力学的双倒数曲线为平行线,符合乒乓机理。并且通过 PCR 方法获得了一偶氮还原酶的基因。

关键词 高盐度; 偶氮染料废水; 耐盐菌株 GYZ; 偶氮还原酶; 乒乓定理

ABSTRACT

Azo dyes show the potential oncogenic effect and are severely harmful to human health. Moreover, azo dyes wastewater always contains high salinity which will inhibit microbial activity greatly in bio-treatment process. So azo dyes wastewater treatment has been paid more attention in environmental pollution control. The treatment of azo dyes wastewater with high salinity by salinity-tolerance strain GYZ(*Staphylococcus sp.*) was investigated in this research and the crude enzyme activity of strain cells on azo dye degradation was also explored. The purpose is to deal with the problems of inhibition of conventional bio-treatment system by high salinity and low efficiency of azo dyes wastewater treatment by anaerobic bacteria.

The basic characteristics of salinity-tolerance strain GYZ growth and Acid Brilliant Scarlet GR degradation were investigated firstly. The results indicated that strain GYZ was resistant to penicillin and sensitive to other antibiotics. Strain GYZ could tolerate and grow in the salinity range of 1~20% (wt/vol) NaCl and the optimal salinity was 10% NaCl. The optimal conditions for both growth and degradation of strain GYZ at NaCl concentration of 10% were: pH was 7.2~7.5 and temperature was 30°C. High degradation efficiency of not only Acid Brilliant Scarlet GR but also another nine azo dyes were obtained by strain GYZ under high salinity condition.

The activity of azoreductase of strain GYZ was tested and the optimal conditions of enzyme reaction were determined also in this research. The results indicated that the optimal temperature for azoreductase activity was 40°C and the optimal pH was 8.0.

The dynamic model of azoreductase reaction was investigated and the effect of NADH on azoreductase activity was explored. The double-reciprocal plots of initial velocity versus concentration of NADH or acid red B showed parallel lines. This result suggested that the azoreductase catalysis corresponded to a Ping-Pong mechanism. Furthermore, a DNA fragment (550bp) possibly encoding the azoreductase protein was obtained by PCR amplification from the total DNA of strain GYZ.

Key words high salinity; azo dyes wastewater; salinity-tolerance strain GYZ; azoreductase; Ping-Pong mechanism.

河北科技大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品或成果。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：李曉霞

指导教师签名：杨学亮

年 月 日

2009 年 5 月 22 日

河北科技大学学位论文授权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权河北科技大学可以将本学位论文的全部或部分内 容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密，在___年解密后适用本授权书。

本学位论文属于

不保密。

(请在以上方框内打“√”)

学位论文作者签名：

指导教师签名：杨学亮

年 月 日

2009 年 5 月 22 日

第1章 绪论

1.1 引言

染料废水排放量大,成分复杂,化学性质稳定,含盐量高^[1]。是生物难降解废水之一。在染料的生产和使用中,偶氮染料就占50%以上,其降解产物多具致癌作用,并能在环境中长期存在,对人体健康危害极大,因此含偶氮化合物废水的处理成为环境污染治理的焦点问题^[2]。对于此类废水,目前常用的物化法会产生大量难处理的泥渣,化学法运行费用高,容易造成二次污染^[3];常规的生化法处理含染料废水也有明显的缺点,微生物对营养物质、pH、温度等条件有一定要求,高盐度会抑制微生物的生长,破坏微生物的细胞膜和菌体的酶,对有机物的去除率较差,生物强化技术是提高染料废水生物处理效果的可行途径,而获得具有耐盐和偶氮染料脱色能力的菌株是应用生物强化技术的关键^[4]。

1.2 染料废水的来源及特点

1.2.1 染料简介

1.2.1.1 染料的特性

偶氮染料是人工合成的偶氮化合物,其分子的主要特征是含有一个或多个偶氮键(-N=N-)。在生产领域广泛运用的一些直接染料、活性染料、酸性染料、分散染料和金属络合染料等,都含有偶氮结构。1876年 Witt 提出染料发色团说,认为染料颜色是由双键共轭体系(-N=N-)引起的,这些含双键的基团即为发色团。现代理论认为,染料的颜色与其结构有密切相关,共轭双键的长度、共轭体系两端的氨基、羟基、甲基和磺酸基等极性基团、分子的离子化、分子平面性、染料内络合物等会对染料颜色都会产生影响^[5]。

偶氮染料本身对人类不会产生有害的影响,其毒性主要是降解产物芳香氨,研究发现只有化学结构中含有联苯胺或苯二胺的偶氮染料才有此特性。

1.2.1.2 染料废水的水质特点

偶氮染料废水主要来源于染料生产和印染过程。染料废水产成量少,但污染物浓度高、色度高、且含盐量高;印染废水产生于印染工序染整和洗涤,污染物浓度较低,色度也较低。但共同的特点是废水间歇排放其污染物难降解,在环境中存在时间长,特别是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,对环境危害大等特征^[6,7],因此在对染料降解和脱色的研究中,偶氮染料废水的处理备受重视。

1.3 染料废水处理技术现状

偶氮染料废水的处理方法有物理法、化学法、生物法等。对于传统生物处理系统,高盐进水必须脱盐或稀释到不影响微生物活性,且用淡水稀释也会增加废水体积,反渗透、离子交换或电解脱盐技术成本高,在实际工程应用中受到限制。

1.3.1 物理法

1.3.1.1 吸附法

在物理处理法中应用最多的是吸附法,通常是将其多孔的无机吸附剂粉末或颗粒与废水混合,或让废水通过由其颗粒状物组成的滤床,采用交换吸附、物理吸附或化学吸附等方式使废水的污染物质被吸附到吸附剂上,达到去除的目的。张建英等^[8]报道了复合膨润土用于印染废水脱色,废水中的苯系偶氮分散染料可在酸性条件下用活性白土处理,脱色率可达到98%。另外工业废料(如煤渣、粉煤灰等)、天然废料(如木炭、木屑等)、植物秸秆均对印染废水具有一定的吸附作用。有文献报道^[9,10],用粉煤灰处理染料废水取得良好脱色效果,粉煤灰吸附后可进窑制砖消除二次污染,这样既能化废为宝,也可以解决活性炭等吸附剂昂贵的处理费用这一问题。

1.3.1.2 磁分离法

磁分离法是将水体中的微粒先行磁化再分离。作为一种水处理新技术,现在可供工业使用的磁化技术主要有磁性团聚法、铁盐共沉淀法、铁粉法、铁氧体法。国外高梯度磁分离技术已从实验室走向应用,高梯度磁滤器(HGMS)的工作核心为导磁不锈钢毛和电磁不锈钢多孔板。HGMS采用过滤-反冲洗工作方式是分离 $<50\ \mu\text{m}$ 铁磁性物质的先进技术,具有过滤快($100\sim 500\ \text{m}\cdot\text{h}^{-1}$),占地少(为沉淀法的 $1/10\sim 1/20$)的特点。

1.3.1.3 膜分离法

目前,应用于偶氮染料废水处理的主要是超滤和反渗透。超滤过程本质是一种筛滤作用,膜表面孔隙大小是主要控制因素,通常应用于分散染料废水处理。反渗透是施加一定的压力为推动力在半透膜上实现水与染料的分离,进行染料回收。王振余等^[11]对多孔炭膜处理染料水溶液进行了研究,结果发现,炭膜将染料与水有效分离,其截留率为95%~99%,水的渗透速率介于 $65\sim 200\ \text{L}\cdot(\text{m}^2\cdot\text{h}\cdot\text{MPa})^{-1}$ 之间。刘梅红等^[12]采用醋酸纤维素纳滤膜,对染料厂提供的高盐度、高色度、高COD的染料废水进行了试验研究,结果表明,纳滤膜技术能有效截留废水中的染料和有机物,而废水的无机物则几乎100%透过,膜对废水的色度和COD的去除效果较好。可见,膜技术可有效实现对高盐度、高色度、高COD的染料废水的处理。

1.3.2 化学法

1.3.2.1 混凝法

混凝法是目前使偶氮染料废水脱色最经济、最有效的方法之一，在实际工程中得到了广泛的应用。此法主要用于去除非水溶性化合物以及分子量较大、在水中能形成聚集体的染料。常用的混凝剂有无机低分子混凝剂、无机高分子混凝剂、有机高分子混凝剂和微生物絮凝剂等。近年来，大量的实验研究表明^[13-15]，无机高分子混凝剂的混凝效果一般要优于传统的铁盐和铝盐混凝剂，广泛地应用于印染废水处理中。同时，有机混凝剂特别是人工合成的高分子混凝剂应用也日益广泛^[16-19]。缺点是运行费用较高、泥渣量大且脱水困难、适用的 pH 值范围窄、对亲水性染料处理效果差。

1.3.2.2 化学氧化法

化学氧化法降解偶氮染料废水是利用强氧化剂氧化染料分子，破坏其发色团，降低废水的色度和 COD 值，提高废水的可生化性，达到净化废水的一种方法，Kerzhner 等^[20]将印染废水中的偶氮染料用臭氧处理，达到良好的脱色效果。胡文容等^[21]研究了用超声强化臭氧氧化偶氮染料，结果表明，氧化速度快，偶氮染料分解彻底。另外，顾平等^[22]研究表明，对于单偶氮的活性黑 KBR 废水，Fenton 试剂处理是一种有效方法。近年来还相继把紫外光、氧气和电引入 Fenton 体系，形成了“类 Fenton 试剂”，以期达到提高效果、加快反应速度、降低成本等目的。化学氧化法存在的主要问题是处理成本高；催化剂无法回收；常用氧化剂表现出氧化能力不强，存在选择性氧化等缺点；而且处理过程中容易引入杂质造成二次污染。

1.3.2.3 光催化氧化法

该技术能有效地破坏许多结构稳定的生物难降解污染物，与传统的处理方法相比，具有明显的高效、污染物降解彻底等优点，因此日益受到重视。利用太阳能或紫外光激发 TiO₂ 半导体材料的光催化体系研究的最多，应用前景也最好。Davis 等^[23]用 UV/TiO₂ 光催化氧化处理染料模拟废水，催化氧化法一般只应用于低浓度染料废水，应用于高浓度染料废水很少有报道。

1.3.2.4 电化学法

电化学处理方法是最近发展起来的新型高级氧化技术(AOP)，管玉江^[24]对部分活性单偶氮染料和双偶氮染料采用复极性固定床电解反应器进行氧化脱色降解实验。结果表明，偶氮染料脱色率在 99.7%以上，COD 的去除率在 80.6%以上，对处理的偶氮染料废水降解比较彻底。许海梁等^[25]采用同样的复极性固定床电解槽对单偶氮、双偶氮、三偶氮、四偶氮染料废水进行了研究，发现采用复极性固定床电解槽通过电氧化还原作用可以破坏偶氮染料分子中的发色共轭体系，有效去除偶氮染料废水中的色度和 COD，但偶氮染料的分子结构及空间构型对其降解行为有影响。

1.3.3 生物法

偶氮染料降解的最为关键的就是偶氮键被打开,生成芳香氨化合物。生物法降解印染废水是利用微生物的代谢作用,破坏染料的不饱和键及发色基团,将其脱色降解,而这一过程是在偶氮还原酶催化作用下完成的。在有氧条件下,偶氮染料还原是由特异性的偶氮还原酶直接催化完成;在厌氧条件下,这一反应通常是由非特异性的还原酶还原偶氮键降解偶氮染料。

1.3.3.1 好氧法

传统的好氧法有活性污泥法、生物膜法等,对染料工业废水 BOD 去除效果明显,但对色度的去除率不太理想,并且耗能较多,污泥产量也较大,给后续处理带来困难。

1.3.3.2 厌氧法

厌氧法是在厌氧条件下,通过厌氧微生物对有机物进行酸性和碱性发酵的代谢过程,使之转化为低级脂肪酸、醇等,然后在甲烷细菌作用下转化为甲烷和 CO_2 。该方法能耗降低,污泥生成量小,同时厌氧产生的甲烷气体提供了新的能源,方便了后续处理,有较广泛的应用前景。

1.4 耐盐菌处理染料废水的研究及进展

1.4.1 耐盐微生物的分类

Kushner^[26]根据微生物在不同盐浓度下的生长情况将其划分为非耐盐菌、轻度耐盐菌、中度耐盐菌、极端耐盐菌以及耐盐菌 5 大类:

(1)非耐盐菌 生长不需要 NaCl,低浓度的 NaCl(>1%)就会对它们的生长产生抑制。

(2)轻度耐盐菌 生长需要少量的 NaCl,其最适宜的 NaCl 浓度为 1%~3%。

(3)中度耐盐菌 生长离不开 NaCl,其最适生长的 NaCl 浓度为 5%~10%。

(4)极端耐盐菌 生长对 NaCl 的要求很高,一般在 9%以上,可在 9%~35%浓度范围内生长,最适生长的 NaCl 浓度为 13%~15%。其中中度耐盐菌和极端耐盐菌属于极端微生物。

(5)耐盐菌 能耐盐的非耐盐菌。若生长范围超过 $2.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐可被认为是极端耐盐微生物。

耐盐菌的种类很多,既有极端耐盐的古细菌,也有真细菌、放线菌和藻类。对于耐盐菌至今仍没有一个确切的定义。因为不少耐盐菌在不同的培养条件(尤其是营养条件、pH 和温度等)下会具有不同的最适生长盐浓度。

1.4.2 国内外耐盐菌处理废水的研究及进展

到目前为止,一些研究表明,在生物法处理过程中,耐盐菌的投加能改善盐分对微生物活性的抑制作用,大大提高废水的有机物的去除效果。

国外于20世纪60年代末开始进行高含盐工业废水的处理研究^[27,28]。

Woolard 和 IrviRe^[29]用从大盐湖的土壤中筛选的耐盐菌在 SBR 反应器中处理模拟含酚(约 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 油田废水,含盐量 14%)。经过7个月的连续运行,出水的酚浓度小于 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、DOC 浓度小于 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、悬浮物浓度小于 $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。研究同时表明,传统的生物处理(活性污泥法)对废水中离子强度的变化很敏感。废水中含盐量的增加,可能导致微生物的正常代谢功能遭到破坏,其代谢途径减少。处理高含盐废水(含盐量约 3%~5%)的生化系统中出水 SS 偏高(一般大于 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。这一方面可能由于盐促进了细胞的溶解;另一方面,在高浓度盐环境下一些具有较好絮凝功能的原生动物和丝状菌的生长受到抑制也不容忽视。

Hinteregger 和 Streichsbier 等^[30]报道了在 14% NaCl 条件下酚转化率接近 100%。

Peyton 等^[31]以苯酚为模型化合物,进行了高盐(10%)生物降解动力学的探讨,实验结果表明为苯酚浓度(0~ $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的零级动力学。

1995年阿联酋 U.A.E.大学的 Hamoda 等^[32]使用活性污泥完全混合反应器分别对不含盐废水、含盐量 $10\sim 30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的废水在不同泥龄(3~20 d)和不同有机负荷($\text{COD } 0.5\sim 2.0 \text{ kg}\cdot(\text{kg}\cdot\text{VSS}\cdot\text{d})^{-1}$)条件下进行平行对照实验,结果发现盐度对未经驯化的活性污泥系统产生明显的抑制影响,但经过一段时间驯化后,系统的活性污泥浓度增加,并显著改变了活性污泥中微生物种群的组成,而且对 TOC 的去除率均达到 96%以上。

美国 Notre Dame 大学的研究者^[33]于 1992 年利用从美国大盐湖(the Great lake)中分离出的适盐细菌对含盐 15%的含酚废水(浓度为 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右)进行处理,原水经过 12 h 后,酚的去除率达到 95%。

Kargi 和 Dincer^[34]采用非耐盐活性污泥处理 1%~5%的含盐废水,发现 COD 的去除率和盐的浓度有很大关系,但高盐浓度下加入耐盐菌 *Halobacter halobium* 后可明显提高 COD 的去除率。同时还报道了模拟废水的动力学参数,但这些数据不能说明工业废水中抑制性化合物(如偶氮染料)的降解性。

此外,Ludzack 等^[35]开展了用传统活性污泥工艺处理含盐废水的效率研究;Belkin 等^[36]研究了高盐条件下化工废水的生物处理,处理效果不理想。

Ferrer 等^[37]以酵母膏,蛋白脉和葡萄糖为底物研究了盐浓度对中等耐盐菌 *Deleya halophila* 的生长影响。在盐浓度为 2.5%~15%范围内,盐浓度 10%时生长速度最大;且盐浓度变化时对生长速率影响不大,菌在变化盐浓度下保持生长和底物降解对工业废水生物过程是非常重要的。

国内对高盐废水生化处理的研究起步较晚,自 80 年代以来对适盐细菌的分离和

鉴定方面开展了大量的研究,并取得了成果。

何健等^[38]采用逐步提高有机负荷盐浓度的方法,驯化出耐高浓度盐污泥,在进水 NaCl 质量浓度为 $2.68 \times 10^4 \sim 4.72 \times 10^4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间时,保持较高的污泥浓度可使反应器 COD 容积负荷达到 $0.06 \text{ kg} \cdot (\text{m}^3 \cdot \text{d})^{-1}$, COD 和苯乙酸去除率达到 95% 以上。

杨健等^[39]用 SBR 法处理高含盐量石油发酵工业废水,研究发现,高含盐量对经驯化后的耐盐活性污泥并无明显抑制作用 COD 有机负荷为 $1.0 \text{ kg}/(\text{kg} \cdot \text{VSS} \cdot \text{d})^{-1}$ COD 去除率稳定在 90% 以上, BOD₅ 去除率稳定在 95% 以上。驯化的污泥以菌胶团和少量的原生动物(裂口虫和漫游虫)为主,菌落形态相对较少。

梁展辉等^[40]对高盐度有机废水进行吹脱和冷却预处理后,再利用 SBBR(序批式生物膜反应器)处理,取得了良好的效果。

微生物广泛存在于自然界,其中一些对盐适应性强的耐盐微生物在含盐废水生物处理中发挥着重要的作用。耐盐菌作为一类新型的、极具应用前景的微生物资源,近年来受到人们的广泛关注,它们具有极为特殊的生理结构和代谢机制,同时还产生了许多具有特殊性质的生物活性物质^[1],对它的研究既具有理论意义,又有应用价值。

1.4.3 国内外处理偶氮染料废水的研究及进展

目前报道许多细菌对偶氮染料具有很好的降解效果。国外最早的报道见于 1977 年,Horitsu 等^[41]分离出可以降解偶氮染料的细菌 *Bacillus subtilis* IFO3002。Wang 等^[42]分离得到一种可以降解甲基红的细菌 *Klebsiella pneumoniae* RS-12,研究发现该菌无论在静止条件还是在摇动条件下均对甲基红有非常好的降解效果,加入葡萄糖或 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 可以促进降解,但加入乙醇没有促进效果。Hu^[43]发现的菌株 *Pseudomonas luteola* 正好相反,该菌在完全静止或完全摇动的条件下均不降解染料,但在 2 d 摇动后静止 2 d 的条件下对染料 Red G、RBB、RP₂B、V₂RP 的降解效果分别可达 37.4%、93.2%、92.4%、88%,水中含氮量对降解效果没有影响。国内杨惠芳等^[44]对降解偶氮染料直接耐晒黄 RR 的假单胞菌进行了脱色酶研究,研究表明偶氮染料的脱色反应为偶氮染料双键的还原裂解并形成芳香伯胺类化合物,氧对脱色有抑制作用。

单一菌种降解染料一般只是将发色基团打开,中间产物如苯胺类致癌物质很难进一步降解,混合菌种在这方面有其优势,许多细菌之间存在协同降解作用,增加了降解效果。鲜海军等^[45,46]证明采用混合菌降解染料有一定的优势,并分离得到 13 株对 36 种染料有脱色作用的细菌,其中三株单菌分别对 29 种染料具良好的脱色能力。闵一珏等^[47]经过定向筛选培育到混合脱色菌群 ZF-1,在兼氧和厌氧条件下,对染料废水的脱色有明显效果,同时能降解其它有机物。

1.4.4 偶氮染料厌氧脱色机理以及偶氮还原酶

偶氮分子的发色基是偶氮键，助色基是氨基、羟基、甲基和磺酸基等，当光线射入后发生选择性吸收而产生视觉所感受到的各种颜色。一般地，在好氧条件下，偶氮染料的降解是在特定的偶氮还原酶催化下进行的；但是在厌氧条件下，某些非特异性的酶也可以催化这一反应。如果偶氮染料生物脱色过程的最初脱色反应是在偶氮还原酶的催化作用下进行的，那么一般地，脱色过程在厌氧条件下进行能显著促进脱色过程。脱色反应可用图 1-1 表示：

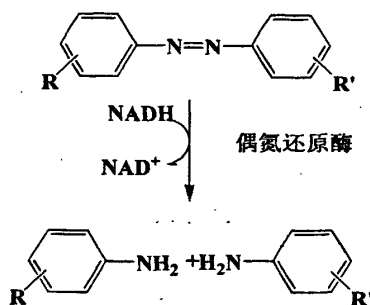


图 1-1 偶氮染料的脱色机理

Fig.1-1 The decolorization mechanism of azo dyes

Rafii 等^[48]等从 *Clostridium perfringens* 中纯化的偶氮还原酶和硝基还原酶，具有相似的电泳特性，都能在 Western blot 中和偶氮还原酶的多克隆抗体反应。两种酶的活性都会因为腺嘌呤脱氢酶(FAD)存在而提高；同时被甲萘醌，邻-亚碘酰苯酸和偶氮还原酶抗体抑制。其对偶氮染料直接蓝 15 的脱色受到硝基芳香族化合物的抑制。1-硝基萘存在的情况下直接蓝 15 还原的表现 K_m 高于染料单独存在的情况，表现出竞争抑制。数据表明在对偶氮染料和硝基芳香族化合物的还原中包含了同一种蛋白质。

Nam^[49]发现 NADH 在无偶氮还原酶存在的情况下，自身通过四电子方式，也能将几种偶氮染料还原为相应的芳香胺。但是要求较低的 pH(3.5~6)有一定的脱色能力，随着 pH 的降低，还原能力提高。NADH 浓度的提高也有利于提高还原能力。

Nakanishi 等^[50]研究偶氮还原酶动力学的过程中，发现染料和 NADH 在酶促脱色反应中作为两种底物，符合乒乓原理。

乒乓动力学给出了有关一个共价中间物出现的信息，染料和 NADH 作为两种参加反应的底物，其中一个(NADH)和酶反应产生一种共价修饰酶，并且释放出一种产物(NAD⁺)，然后，此酶再与另一底物(染料)进行反应，如此过程就得了下图 1-2 的多条平行特性曲线。

研究表明从具备此活性的菌株中纯化的偶氮还原酶，与完整菌体相比，在相同蛋白含量的情况下，具有更高的脱色活性。并且在同样外加还原辅酶时，纯化的酶

的活性会大大增加，而完整细胞活性没有明显提高。这说明细胞膜在传质过程中起到了速度阻碍作用。

1.5 研究目的及内容

本课题对偶氮染料降解性能入手，首先通过前期的实验研究耐盐菌株对偶氮染料的降解性能，随后，考察了其偶氮还原酶的活性及其动力学最后通过 PCR 方法克隆偶氮还原酶基因。通过本论文的研究工作，不仅可以为实际高盐废水生物处理提供高效的微生物菌种，而且可以为实际的偶氮染料废水生物降解提供必要的理论依据；具体研究内容如下：

- 1)耐盐菌株的生理特性研究；
- 2)耐盐菌对偶氮染料降解性能及影响因素研究；
- 3)耐盐菌偶氮还原酶特性研究及偶氮还原酶基因克隆。

第2章 耐盐菌株 GYZ 的生理特性研究

本章研究的目的是通过考察影响耐盐菌株 GYZ 生长的温度、pH、盐度等因素的系统研究,优化其最佳生长条件。

2.1 材料与方法

2.1.1 仪器及设备

实验所用主要仪器及主要设备见表 2-1。

表 2-1 实验主要设备

Tab.2-1 List of experimental instruments

| 仪器或设备名称 | 型 号 | 生 产 厂 商 |
|-----------|-------------|------------------|
| 分光光度计 | VIS7200 | 北京瑞利分析仪器公司 |
| 紫外可见分光光度计 | UV2600 | 上海天美科学仪器有限公司 |
| 电子分析天平 | AB204-N | 梅特勒托利多仪器(上海)有限公司 |
| 恒温摇床 | HQ45Z | 武汉中科环仪技术发展有限责任公司 |
| 数控超声波清洗器 | KQ3200DA | 昆山市超声仪器有限公司 |
| 振荡培养箱 | BS-1E | 江苏金坛市宏华仪器厂 |
| 台式干燥箱 | DGB/20-002 | 中华人民共和国重庆试验设备厂制造 |
| 生化培养箱 | 250B | 江苏省金坛市宏华仪器厂 |
| 立式压力蒸汽灭菌器 | YXQ-LS-30SI | 上海博迅实业有限公司医疗设备厂 |
| 紫外灭菌仪 | SW-CI-1BV | 苏州安泰空气技术有限公司 |
| 电子扫描显微镜 | S-3500N | 日本日立公司 |

2.1.2 菌种来源

菌种为本实验室分离驯化好的耐盐菌株 GYZ(*Staphylococcus sp.*)。菌株 GYZ 的 16S rDNA 在 GenBank 中登录的序列号 EF188282。

2.1.3 实验材料

2.1.3.1 培养基及其组成

根据实验要求的不同,实验过程中分别选用了 LB 培养基和无机盐培养基(固体培养基为液体培养基中加入 2%的琼脂)作为菌体生长的营养源,其具体组成如表 2-2 所示。

因为 LB 培养基为富营养源培养基,比较有利于菌体的生长,因此在筛选、培养与驯化菌种时一般选用 LB 培养基。但在考察不同碳源对菌体生长的影响时,为了消

除 LB 培养基中营养成分的干扰,以便使效果更明显,一般选用无机盐培养基加不同碳源作为菌体生长的单一营养源。

表 2-2 菌体在不同条件生长的培养基组成

Tab.2-2 Culture composition of halomonas sp. GYZ grown under different conditions

| 培养基名称 | 组分 | 浓度/g·L ⁻¹ |
|--------|---|----------------------|
| LB 培养基 | 酵母膏 | 5.0 |
| | 蛋白胨 | 10.0 |
| | NaCl | 0.5 |
| | (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1.0 |
| | K ₂ HPO ₄ | 1.4 |
| | KH ₂ PO ₄ | 0.6 |
| 无机盐培养基 | MgSO ₄ | 0.1 |
| | CaCl ₂ | 0.1 |
| | NaCl | 视实验要求加入 |
| | 营养源 ^① | 视实验要求加入 |
| | 微量元素 ^② | 视实验要求加入 |

注: ①考察不同营养源对菌体生长的影响时,选择了蔗糖、乳糖、葡萄糖、淀粉、果糖、麦芽糖六种营养源。

②微量元素组成(mg·L⁻¹): FeCl₃·6H₂O,5;CuSO₄·5H₂O,0.05;H₃BO₃,1;MnCl₂·4H₂O,0.05;ZnSO₄·7H₂O,1;NiSO₄,0.8.

2.1.3.2 实验用水

实验过程中所用染料废水(用于筛选单菌)为模拟染料废水,具体组成为 LB 培养基(或无机盐培养基)加染料酸性大红 GR, pH 为 7.2~7.5, NaCl 含量根据驯化条件逐步提高直到 30%(W/V), 染料浓度为 200 mg·L⁻¹ 左右。双偶氮染料酸性大红 GR 的结构式见图 2-1。

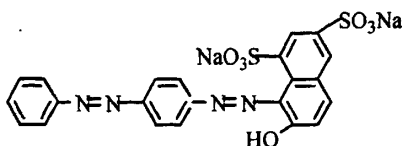


图 2-1 酸性大红 GR

Fig.2-1 Acid Brilliant Scarlet GR

2.1.3.3 所用试剂

实验中所用试剂除酵母膏、蛋白胨、琼脂、果糖和麦芽糖为生化试剂外,其余均为分析纯,具体名称及生产厂家见表 2-3。

表 2-3 实验所用化学试剂

Tab.2-3 Chemical agents for experiments

| 名称 | 纯度等级 | 生产厂家 |
|---|------|-----------------|
| 酵母膏 | 生化试剂 | 北京奥博星生物技术有限责任公司 |
| 蛋白胨 | 生化试剂 | 北京奥博星生物技术有限责任公司 |
| NaCl | 分析纯 | 天津市化学试剂一厂 |
| Na ₂ SO ₄ | 分析纯 | 天津市科密欧化学试剂开发中心 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 分析纯 | 北京化工厂 |
| K ₂ HPO ₄ | 分析纯 | 河北省保定化学试剂厂 |
| KH ₂ PO ₄ | 分析纯 | 河北省保定化学试剂厂 |
| Mg ₂ SO ₄ | 分析纯 | 北京五七六零化工厂 |
| CaCl ₂ | 分析纯 | 天津市河东区红岩试剂厂 |
| 琼脂 | 生化试剂 | 天津市科密欧化学试剂开发中心 |
| 果糖 | 生化试剂 | 天津市博迪化工有限公司 |
| 乳糖 | 分析纯 | 天津市凯通化学试剂有限公司 |
| 蔗糖 | 分析纯 | 天津市凯通化学试剂有限公司 |
| 葡萄糖 | 分析纯 | 天津市北方天医化学试剂厂 |
| 麦芽糖 | 生化试剂 | 北京奥博星生物技术有限责任公司 |
| 淀粉 | 分析纯 | 北京奥博星生物技术有限责任公司 |

2.1.4 分析项目及方法

pH 的测定: DELTA320 型 pH 计(梅特勒-托利多仪器有限公司)

菌体浓度测定: 660 nm 处 OD 值, 实验仪器为 VIS7220 分光光度计

染料波长测定: UV2600 紫外-可见分光光度计(上海天美科学仪器有限公司)

染料浓度测定: 最大特征吸收峰处的吸光度。染料浓度在 0~80 mg·L⁻¹ 范围内与最大吸光度线性关系较好, 高浓度通过稀释测定。

2.2 结果与讨论

2.2.1 菌株的抗性实验

在分离微生物时, 可在培养基中加入某种合适的抗生素抑制杂菌生长而使所需的微生物正常生长。Coronado 等^[51]研究了分别属于 *Chromohalobacter*、*Deleya*、*Halomonas*、*VibrioVolcaniella* 属的 13 株中度耐盐菌在不同盐浓度条件下对 10 种抗生素的反应, 发现中度耐盐菌在不同盐浓度下对这 10 种抗生素的敏感性不同, 据此将这 10 种抗生素分为 3 种类型: 1) 氨基青霉素和利福平, 供试菌株对这两种抗生素敏

感。除了 *C.marismortui* 外，盐浓度的改变不影响中度耐盐菌对这两种抗生素的敏感性。2)氨基糖苷类抗生素（如庆大霉素、卡那霉素、新霉素和链霉素）。在高盐条件下，有的供试菌株对这类抗生素的不敏感，但在低盐条件下，对这类抗生素较为敏感；其原因可能是盐浓度的升高使细菌细胞壁的通透性降低，从而影响氨基糖苷类抗生素进入细胞。3)三甲氧苄二氨嘧、萘啶酮酸、壮观霉素和四环素。供试菌株在不同盐浓度条件下对这类抗生素的反应不同。为了考察菌株 GYZ 对抗生素是否有抗性，本实验选择了六种抗生素：氨苄青霉素、链霉素、庆大霉素、盐酸林可霉素、土霉素及阿维菌素。将抗生素加入到固体培养基中(盐浓度为 10%)，菌株 GYZ 稀释后平铺于固体培养基平板上，在恒温培养箱中 30℃ 静置培养，观察平板是否长出菌落，以不加任何抗生素的实验组作为对照。3 d 后观察 GYZ 的生长情况，对不同抗生素的抗性实验结果见表 2-4。

表 2-4 菌株 GYZ 对抗生素的抗性实验结果

Tab.2-4 The results of antibiotic resistance assay of the strain GYZ

| 抗生素名称 | 储存浓度/mg·ml ⁻¹ | 保存条件(℃) | 工作浓度/μg·ml ⁻¹ | 实验结果 |
|--------|--------------------------|---------|--------------------------|------|
| 氨苄青霉素 | 50(溶于水) | -20 | 20-60 | - |
| 链霉素 | 10(溶于水) | -20 | 10-50 | + |
| 庆大霉素 | - | - | 10-50 | + |
| 盐酸林可霉素 | - | - | 10-50 | + |
| 土霉素 | - | - | 10-50 | + |
| 阿维菌素 | - | - | 10-50 | + |

注：+ 生长，有抗性 - 不生长，无抗性

从表 2-4 可以看出，GYZ 对氨苄青霉素敏感，不具有抗性，而对其它所试抗生素不敏感，有抗性。因此，在以后的实验中加入除氨苄青霉素外的抗生素均可防止染到其它杂菌而影响实验结果。

2.2.2 不同碳源对菌株生长的影响

耐盐菌的生长需要很复杂的营养结构，一些细菌可在葡萄糖、氨和无机盐的介质中生长，但大多数耐盐菌都需要诸如氨基酸或维生素等生长因素，在实验中，可利用酵母膏和蛋白质水解产物提供。盐浓度越高，耐盐菌生长所需的营养构成就越复杂。

LB 培养基是富营养源培养基，一般适合于微生物生长。为了测试耐盐菌株 GYZ 在单一营养源条件下的生长情况在选定的无机盐培养基中按碳源 5g·L⁻¹，分别选择了蔗糖、乳糖、葡萄糖、淀粉、果糖、麦芽糖六种营养源。对耐盐菌株 GYZ 进行生长对比实验。实验结果见图 2-2。

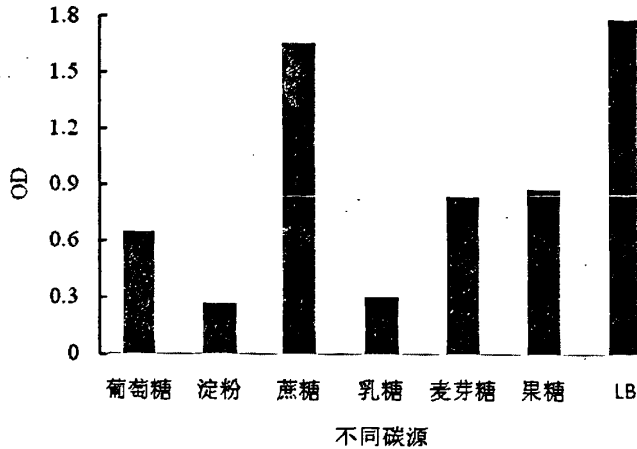


图 2-2 不同营养源对菌株生长的影响

Fig.2-2 Effect of different compounds on growth of the strain GYZ

从图 2-2 可以看出,耐盐菌株 GYZ 在 LB 培养基中生长最好,因为 LB 培养基为富营养源培养基,营养成分丰富,不仅包括一些微量元素,而且其代谢产物中的氨基酸有利于耐盐菌的生长。其次为蔗糖,可能是因为蔗糖为小分子有机物,容易被微生物所利用。微生物细胞在其生长或生活过程中,总是优先利用葡萄糖作为基本能源和碳源,葡萄糖的最终发酵代谢产物为丙酮酸,降低了培养基的 pH 值,不利于菌的生长,所以生长缓慢。果糖为葡萄糖的同分异构体,是由于其结构的原因导致难以被微生物分解利用。乳糖的代谢产物也是酸性,使培养基的 pH 降低,抑制了菌的生长速度。淀粉的分子较大,不能直接进入细菌细胞,必须被细菌胞外酶水解为单糖(葡萄糖或果糖)才能为微生物生长所利用。

2.2.3 NaCl 浓度对菌株生长的影响

要判断某个菌株是否为耐盐菌,衡量耐药菌的耐盐程度其所耐受的 NaCl 浓度范围是一个重要的指标,在 LB 培养基中添加不同浓度的 NaCl,接种后培养 20 h(对数生长后期),测定其生长量,结果见图 2-3。

由图 2-3 可以看出,耐盐菌株 GYZ 在盐浓度较低的范围,随着 NaCl 浓度的增加,OD 值逐渐增大,达到 10%时菌株生长良好,在盐浓度为 15%、20%时菌株生长明显受到抑制,而在盐浓度为 25%、30%时菌株就不能生长。

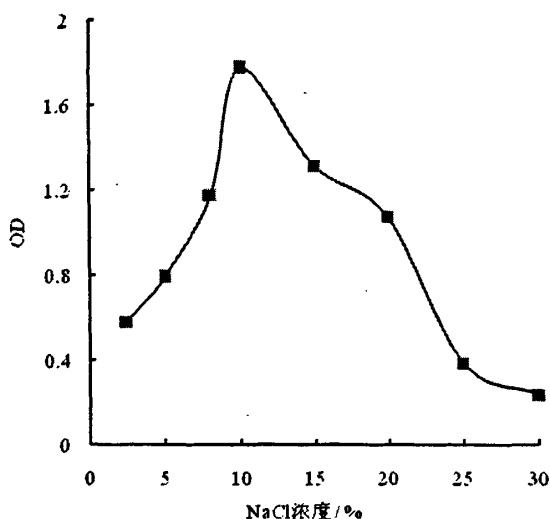


图 2-3 不同盐浓度对菌株 GYZ 生长的影响

Fig.2-3 Effect of NaCl concentration on growth of the strain GYZ

2.2.4 Na_2SO_4 对菌株生长的影响

在 1980 年时, Vreeland 就发现 *H.elongata* ATCC3317 在基本培养基上生长时, 必须有 Na^+ 的存在 (0.05M NaCl)。把基本培养基中的 NaCl 以相同浓度的 LiCl、KCl、 NH_4Cl 替代, *H.elongata* ATCC3317 均不生长。但是如果用相同浓度 NaBr、 NaNO_3 、NaI 和 Na_2SO_3 替代 NaCl, 发现 NaBr 和 NaNO_3 的存在可使 *H.elongata* 生长, 而 NaI、 Na_2SO_3 则没有这样的功能, 这主要是因为 I 和 SO_3^{2-} 对 *H.elongata* 生长有抑制作用。

取适量处于对数生长期的菌体(含盐量为 10%)转接至 Na^+ 浓度 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Na_2SO_4 (保持不变)的 LB 培养基中, NaCl 的 LB 培养基做对照, 测定菌体长过程中的 OD 值。实验结果见图 2-4。

从图 2-4 中可以看出, 在相同的条件下, NaCl 中菌体的 OD 值比 Na_2SO_4 高。说明与 NaCl 相比, SO_4^{2-} 对菌体生长也有明显的抑制作用。

2.2.5 pH 对菌株生长的影响

对于微生物群体, 其生长的 pH 范围极广(2~8), 有少数可以超出这一范围。虽然微生物外环境中的 pH 变化很大, 但其内环境的 pH 却相当稳定, 一般都接近中性。渗透性的变化, 从而影响微生物对营养物质的吸收以及代谢活力、代谢途径等。pH 变化可以影响相应代谢过程中酶的活性: 改变其生长环境中的营养物质及有害物质的毒性。各种微生物都有其最适 pH 值, 在适宜的 pH 范围内, 微生物能够很好的生长, 同时去除目标污染物。不同 pH 对耐盐菌株 GYZ 生长的影响见图 2-5。

由图 2-5 可以看出在 pH 值为 7.5 时菌体的生长量都较高, 即菌体最佳生长 pH

为 7.5。

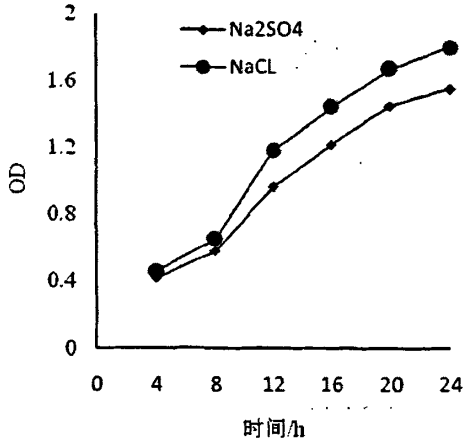


图 2-4 NaCl 和 Na₂SO₄ 对菌株生长的影响

Fig.2-4 Effect of NaCl and Na₂SO₄ on growth of the strain GYZ

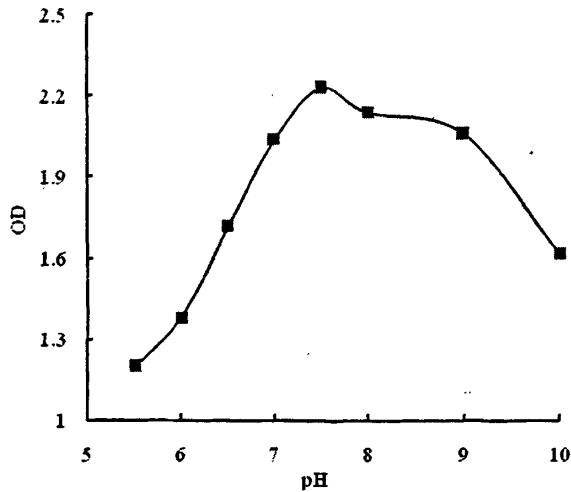


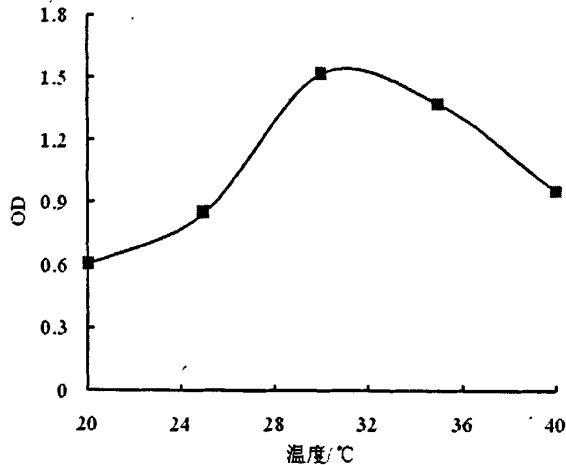
图 2-5 不同 pH 对菌株生长的影响

Fig.2-5 Effect of pH on growth of the strain GYZ

2.2.6 温度对菌株生长的影响

中度耐盐菌对盐的需求和耐受性和温度有一定的关系。*H. halophila* 在 32℃ 和 42℃ 条件下, 其最适生长盐浓度是 7.5%, 然而, 在 22℃ 条件下其最适生长盐浓度是 5%。在 20℃~30℃; *H. elongata* 能在盐浓度为 0.05~3.4 M 的复合培养基上生长, *Marinococcus halophilus* 在 20℃ 时, 能在无 NaCl 的复合培养基上生长, 但在 25℃ 时; NaCl 的浓度不得低于 0.5 M, 并且不能用 KCl 或非离子型溶质来代替 NaCl。但是在

S.costicola 中观察到一些不同的现象：在较高或较低的温度生长时，其最低和最适 NaCl 浓度都是较高的；在 30℃ 时，菌体能在 0.5~5 M 的盐度下生长。因此，当在一个较广的温度范围内研究一些耐盐菌的耐盐特性时，可以测得它们能在一个较广的 NaCl 浓度范围内生长。本实验对耐盐菌株 GYZ 在 20℃、25℃、30℃、35℃、40℃ 的生长情况进行了考察，温度对其生长的影响见图 2-6。



2-6 温度对菌体生长的影响

Fig.2-6 Effect of temperature on growth of the strain GYZ

由图 2-6 可以看出，在所测试的温度范围内，菌体均有不同程度的生长，温度为 30℃ 左右时的生长情况最好，因此，其最佳生长温度均为 30℃ 左右。

2.2.7 金属离子对菌株生长影响

金属离子与微生物的生长代谢关系密切，因为微生物的营养和代谢需在酶的参与下才能正常进行，而酶对环境条件极为敏感，高温、强酸、强碱都能使酶丧失活性，某些金属离子可以作为酶的激活剂，而另外一些金属离子则可以作为抑制剂。许多酶只有当某一种适当的激活剂存在时，才表现出催化活性或强化其催化活性。金属离子对耐盐菌株 GYZ 的影响见图 2-7。

由图 2-7 可以看出：硫酸锌、硫酸锰加入严重抑制了菌体的生长，可能是由于金属离子对酶的毒害作用所致。而硫酸钠和硫酸镁存在的情况下，菌体可较好的生长这可能是由于镁离子可以稳定核糖体、细胞膜和核酸，或是脱色酶活性中心的组分。

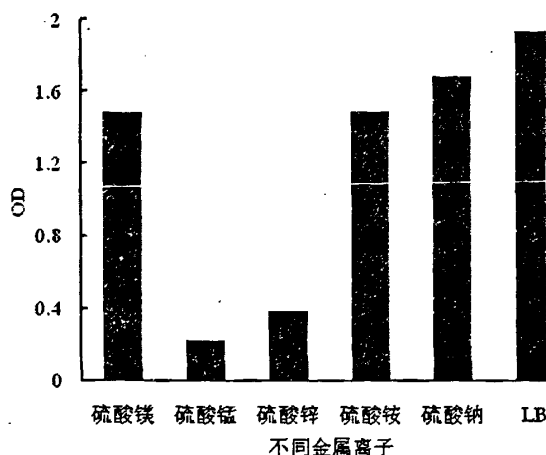


图 2-7 金属离子对菌株生长的影响

Fig.2-7 Effect of different metal compounds on growth of the strain GYZ

2.2.8 甜菜碱对菌株生长的影响

中度耐盐菌对渗透压的适应要求细胞膜内外的渗透压保持平衡。细菌中有两种适应高渗透压的机制：一种是 KCl 型，另一种是相容性物质型。一般来说，多数中度耐盐菌(包括光合细菌和好氧的化能异养细菌)的耐盐机制为相容性物质型。这些细菌的细胞内不存在高浓度的盐环境，胞内酶对 Cl^- 敏感。相容性物质是指那些能维持细胞内外渗透压平衡，同时与细胞物质相容的有机物质。中度耐盐的光合细菌和 *Actinopolyspora halophila* 可以在以葡萄糖为唯一碳源的培养基中从头合成甜菜碱。其他中度耐盐细菌只能从培养基中直接吸收甜菜碱或其前体胆碱。Cummings 等^[52] 研究了甜菜碱对 *Halomonas* SPC1 生长的影响，认为甜菜碱可以解除高盐对该菌株生长的抑制；可以作为唯一碳源供 SPC1 生长；

为了考察耐盐菌株 GYZ 的耐盐机理，用浓度为 1% 的葡萄糖作为 GYZ 生长的碳源，加入不同浓度的甜菜碱，耐盐菌株 GYZ 在甜菜碱不同浓度的情况下的生长曲线见图 2-8。

由图 2-8 中可以看出，甜菜碱添加量小于 $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对菌体生长均有一定的促进作用，但添加量为 $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 效果最佳，当超过此值时，促进作用下降，由此可以说明，GYZ 的耐盐机理很可能是在细胞内积累相容性物质。

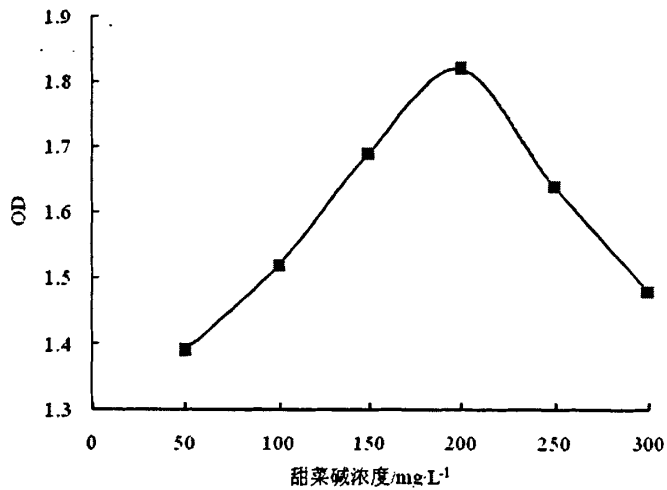


图 2-8 甜菜碱对菌株生长的影响

Fig.2-8 Effect of lycines on growth of the strain GYZ

2.3 本章小结

研究结果表明:

1)菌株 GYZ 对氨苄青霉素无抗性,对链霉素、庆大霉素、盐酸林可霉素、土霉素及阿维菌素均有抗性;耐盐菌株 GYZ 在钠盐和镁盐存在的情况下,可较好的生长,而锌、锰的加入会严重抑制菌体的生长;加入甜菜碱可以提高菌株在高盐条件下的生长速率,最佳值为 $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2)菌株 GYZ 可以在盐度为 0%~20%的环境中生长,当盐浓度不超过 10%时生长良好,最适生长 pH 为 7.2~7.5,最适生长温度为 30°C 。

第3章 耐盐菌株 GYZ 对酸性大红 GR 脱色性能研究

本章以偶氮染料酸性大红 GR 为主要考察研究对象,在盐度为 10%的条件下,考察外部环境(温度、pH 等)对脱色效率的影响,同时考察了耐盐菌株 GYZ 对偶氮染料的广谱性脱色情况。

3.1 材料与方法

3.1.1 仪器及设备

实验过程中用到的主要仪器设备见表 2-1。

3.1.2 菌种来源

由本实验室分离、驯化的耐盐菌株 GYZ(经 $200\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的偶氮染料酸性大红 GR 驯化)。

3.1.3 实验用水

实验用水为模拟染料废水,具体组成见表 2-2。根据具体实验需要加不同的偶氮染料。

实验中所用染料见表 3-1,其化学结构分子式见图 3-1。

表 3-1 实验所用染料最大吸收波长及其结构

Tab.3-1 The maximum Abs and chemical structures of dyes using in experiment

| 编号 | 染料名称 | $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ | 结构类型 |
|----|-------------|----------------------------------|------|
| 1 | 酸性红 B | 506 | 单偶氮 |
| 2 | 活性艳红 M-8B | 525 | 单偶氮 |
| 3 | 酸性大红 3R | 495 | 单偶氮 |
| 4 | 酸性橙 II | 480 | 单偶氮 |
| 5 | 分散大红 S-BWFL | 568 | 单偶氮 |
| 6 | 分散深蓝 HGL | 506 | 单偶氮 |
| 7 | 直接湖蓝 5B | 596 | 双偶氮 |
| 8 | 酸性大红 GR | 509 | 双偶氮 |
| 9 | 直接桃红 12B | 522 | 双偶氮 |
| 10 | 直接耐晒黑 G | 637 | 四偶氮 |

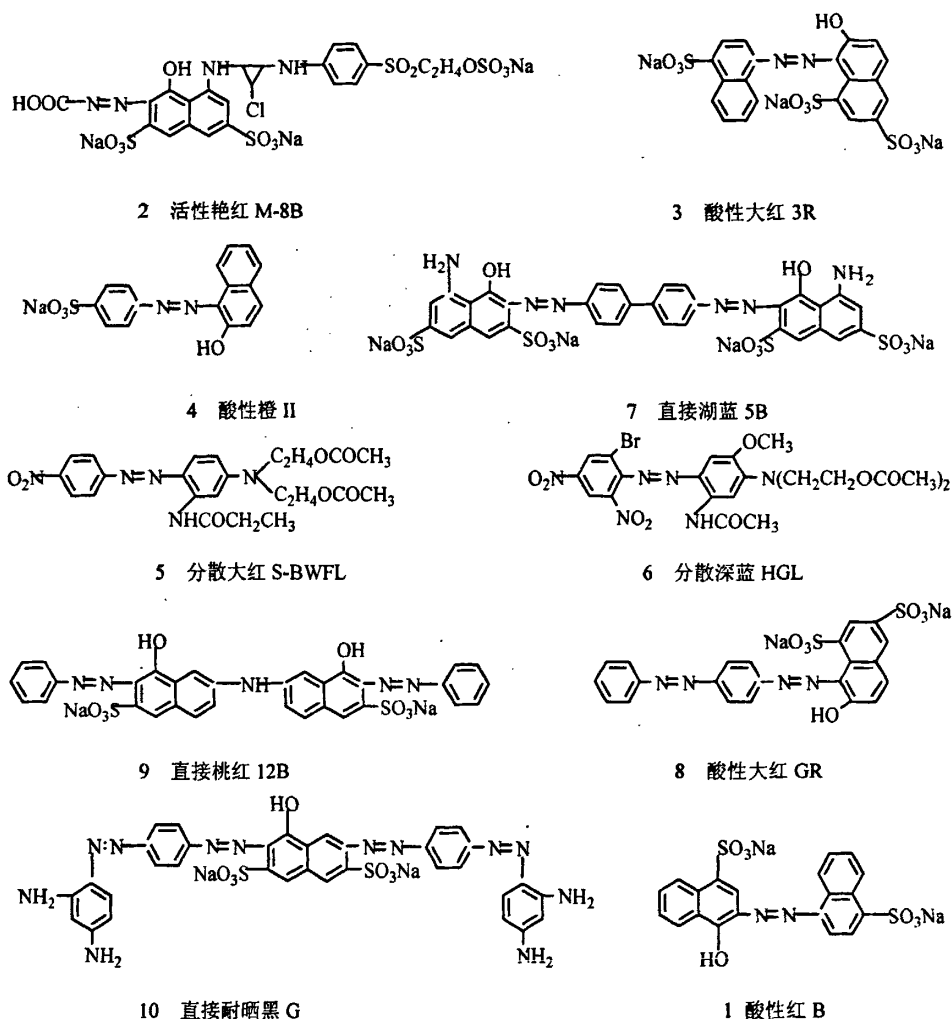


图 3-1 染料的化学结构分子式

Fig.3-1 The chemical structure of the dyes

3.1.4 分析项目及方法

pH 的测定: DELTA320 型 pH 计(梅特勒-托利多仪器有限公司)

菌体浓度测定: 660 nm 处 OD 值, 实验仪器为 VIS7220 分光光度计

染料特征波长测定: UV2600 紫外-可见分光光度计(上海天美科学仪器有限公司)

染料浓度测定: 最大特征吸收峰处的吸光度。染料浓度在 0~75 mg·L⁻¹ 范围内与最大吸光度线性关系较好, 高浓度通过稀释测定(UV2600 紫外可见分光光度计)。

3.1.5 实验方法

3.1.5.1 菌种的活化

取适量保存的菌种 GYZ 转接入 pH 为 7.2~7.5 的 LB 培养基中(经高温灭菌)好氧培养, 温度为 30°C, 摇床转速为 120 r·min⁻¹。每次实验前都要对菌种进行活化, 在其处于对数生长期时进行实验。

3.1.5.2 染料废水脱色及脱色率的测定

配制一定浓度染料水溶液, 以蒸馏水为参比, UV2600 紫外分光光度计中扫描其可见光区最大吸收峰的波长, 作为此染料的特征波长。接种的含染料培养基溶液离心(8000 r·min⁻¹, 10 min)后, 以未加染料的厌氧培养基为参比, 取其最大吸收波长的吸光度。

脱色率按如下公式计算:

$$q = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100\% \quad (3-1)$$

式中 A_0 ——接种后初始时刻的吸光度

A_t ——厌氧光照培养一定时间后的吸光度

由于在不同温度和 pH 值等条件下, 染料溶液的最大吸收波长有时可能会有所移动, 因此在每一次不同培养条件下的其可见最大吸收峰位置都需重新确定。

3.1.5.3 LB 液体培养基吸光度的测定

由于 LB 培养基在可见光的波长范围内均有一定的吸收, 但在不同波长处的吸光度不同, 因此为了消除 LB 培养基对染料吸光度的干扰, 在实验所用各染料的最大吸收波长(λ_{\max})处用 VIS7220 分光光度计测定培养基的吸光度, 结果见表 3-2。染料吸光度为测试结果减去 LB 培养基在该染料最大吸收波长处的吸光度。

表 3-2 LB 培养基在各染料 λ_{\max} 处的吸光度

Tab.3-2 The absorbency of LB on various dyes

| 序号 | 染料 λ_{\max}/nm | LB 吸光度 | 序号 | 染料 λ_{\max}/nm | LB 吸光度 |
|----|-------------------------------|--------|----|-------------------------------|--------|
| 1 | 506 | 0.299 | 6 | 506 | 0.299 |
| 2 | 525 | 0.238 | 7 | 596 | 0.113 |
| 3 | 495 | 0.342 | 8 | 509 | 0.296 |
| 4 | 480 | 0.406 | 9 | 522 | 0.247 |
| 5 | 568 | 0.148 | 10 | 637 | 0.080 |

3.1.5.4 酸性大红 GR 标准曲线的测定

由于实验过程中基本是以酸性大红 GR 为研究对象(广谱性实验除外), 因此只给出酸性大红 GR 的标准曲线, 以 5mg/L 为一浓度梯度, 分别配制各浓度的染料酸性大红 GR, 至 50mg/L; 在 8 000r/m 的转速下离心 10 分钟, 于 509nm 处测定上清液的吸光度, 见图 3-2。其它染料的标准曲线未列出。

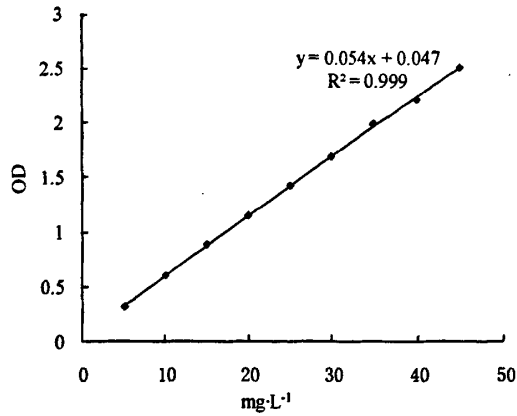


图 3-2 染料酸性大红 GR 浓度与吸光度曲线

Fig.3-2 The Abs and concentration of Acid Scarlet GR

3.2 结果与讨论

3.2.1 不同脱色时间对脱色率的影响

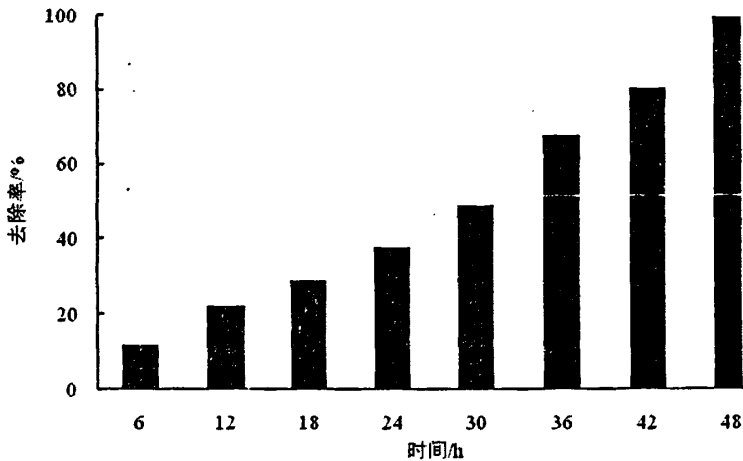


图 3-3 时间对脱色率的影响

Fig.3-3 The influence of oxygen on decolorization of Acid Scarlet GR

实验过程中主要以偶氮染料酸性大红 GR 为考察对象, 因此首先对 GR 在降解过程中的脱色情况进行考察。将处于对数生长期的菌株 GYW 转接入实验废水中, pH 为 7.2~7.5。接种混匀后立即取样于离心(8 000r/m, 10min), 以蒸馏水作空白, 测其吸光度, 计算其去除率其结果见图 3-3。

由图 3-3 可以看出随着时间的增加, 脱色率逐渐增加, 当 48 h 时, 去除率可达

99.1%。

3.2.2 氧气对染料脱色的影响

氧气对菌体生长及染料脱色有重要影响。在生物体生长过程中，氧气对其物理状态影响很大，在富氧条件下高氧化还原能力的电子受体氧气可能阻碍染料的脱色。这是因为电子供体氧化释放出的电子更易于还原氧气，而影响脱色效果。

将等量的处于对数生长期的耐盐菌株 GYZ 放入两个 50 mL 的离心管中，并加等量的实验用水，其中一个密封创造厌氧环境，另一个开盖作为有氧环境，耐盐菌株 GYZ 在厌氧和有氧条件下降解偶氮染料酸性大红 GR 的情况如图 3-4 所示

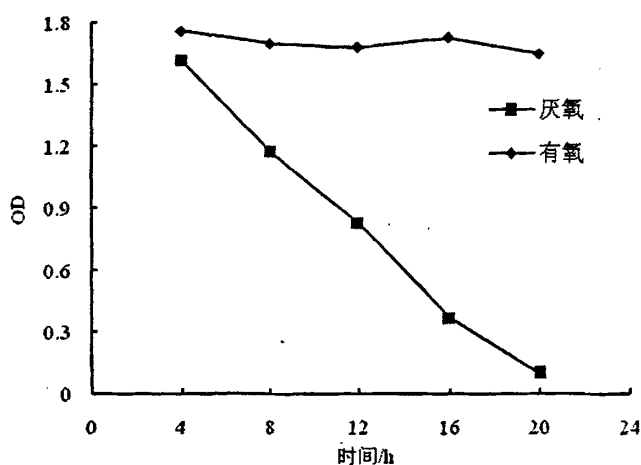


图 3-4 供氧条件对酸性大红 GR 脱色能力的影响

Fig.3-4 The influence of oxygen on decolorization of Acid Scarlet GR

从图 3-4 可以看出，供氧条件对染料的脱色有很大的影响。在厌氧条件下，耐盐菌株 GYZ 24 h 脱色率就达到 83%，而在好氧条件下却没有降解。说明厌氧条件有利于酸性大红 GR 的脱色。其他研究表明，偶氮染料的脱色是由细菌产生的偶氮还原酶破坏染料分子的偶氮键引起的，该酶促反应需要辅酶 NADH 参与，氧气的存在阻止了 NADH 向偶氮键转移^[53,54]，从而抑制偶氮还原酶的活力，降低菌的脱色能力。

3.2.3 盐浓度对染料降解的影响

盐对常规生化法的影响主要体现在两方面：

(1)高盐度及盐度变化对微生物有抑制作用，破坏生物的代谢功能并降低生物的降解能力，高盐废水有机物去除率会明显降低，微生物絮凝效果变差。

(2)盐度冲击造成活性污泥生态环境的改变，原生动物的死亡，无法对浮游细菌进行捕食，因此也可能造成悬浮固体浓度的增加。

因此,通过对微生物的驯化和培养得到的耐盐微生物,高盐度不会降低废水生物处理的有机物去除率,适当的含盐量还可以提高污泥絮凝性,对高盐废水生物处理系统起到稳定作用。

为了考证盐(NaCl)浓度的变化对耐盐菌株 GYZ 降解偶氮染料酸性大红 GR 的影响,选择了 2.5%、5%、8%、10%、15%五个浓度梯度进行研究,结果见图 3-5。

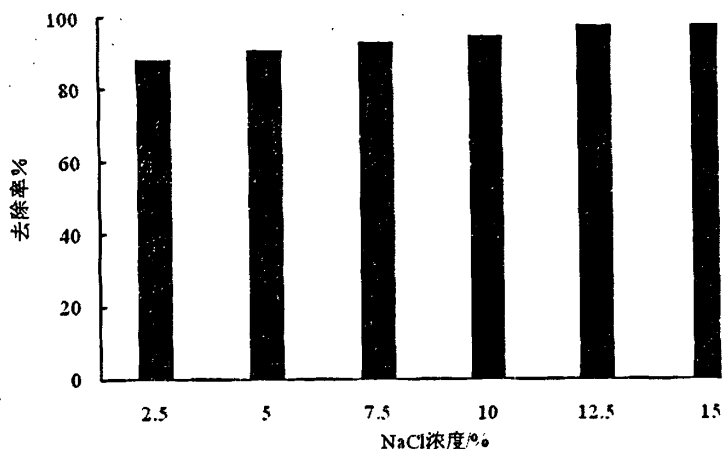


图 3-5 NaCl 浓度对染料 GR 脱色率的影响

Fig.3-5 Effect of sodium chloride on decolorization of Acid Scarlet GR

从图 3-5 可以看出菌株 GYZ 始终保持较高的脱色率,在实验条件下盐浓度对脱色效果无明显影响。

3.2.4 pH 对染料降解的影响

pH 值是微生物生长和有机物降解的重要参数,它通过影响细胞质膜的透性,膜结构的稳定性和物质的溶解性或电离性来影响营养物质的吸收,从而影响微生物的生长速率。同时,微生物产生的酶降解有机污染物的酶活也与 pH 密切相关。为了考察耐盐菌株 GYZ 最适应的 PH 值范围将处于对数生长期的菌株 GYZ 接入由 LB 培养基配制的实验用水中,初始菌体 OD_{660} 为 0.28~0.30,染料酸性大红 GR 的初始浓度为 $400\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,pH 分别调至 6、7、7.5、8、9、10、11, 30°C 静置厌氧培养,48 h 相对脱色率见图 3-6。

由图 3-6 可见,脱色最佳的 pH 为中性或偏弱碱性,强酸性或强碱性使脱色速率下降。偶氮染料的生物还原中,芳香胺的代谢产物会使 pH 升高,甚至比原始的偶氮染料碱性还强。pH 在 7.0 到 9.5 范围内,对偶氮染料的还原影响很小。

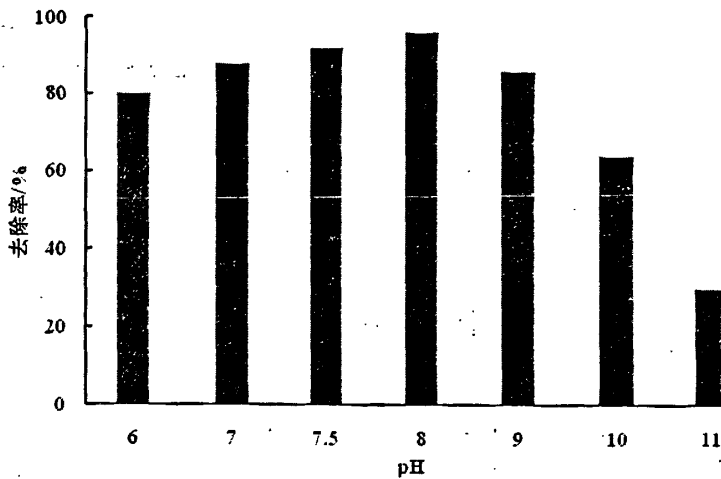


图 3-6 pH 对染料 GR 脱色率的影响

Fig.3-6 Effect of pH on decolorization of Acid Scarlet GR

3.2.5 温度对染料降解的影响

为了考察温度变化导致耐盐菌株 GYZ 对染料降解的影响,在染料浓度为 $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,调节温度为 25°C 、 30°C 、 35°C 、 40°C 、 45°C ,考察不同温度对脱色率的影响,实验结果如图 3-7。

从图 3-7 可以看出,在一定范围内,脱色率随温度的增加而提高,当温度为菌体最适温度($30\sim 35^\circ\text{C}$)时脱色效果最佳,当超过此范围,温度越高去除率越低,是因为温度升高导致酶的活性降低。

3.2.6 辅酶 NADH 对染料降解的影响

辅助底物(初始电子供体)的浓度能控制还原平衡产物的形成速度(中间电子供体)。Yoo^[55]发现,细胞溶菌的产物可以作为厌氧偶氮还原的电子供体。通常过程中,还原型辅酶被有机底物氧化发生电子转移。在偶氮染料还原过程中,辅酶作为电子的供体。NADH 是染料还原过程中产生还原中间产物做必需的。因此, NADH 是偶氮还原速度的决定者。耐盐菌株 GYZ 在辅酶存在的情况下降解偶氮染料的工作曲线见图 3-8。

从图 3-8 可以看出,外加辅酶 NADH 并不能提高耐盐菌株 GYZ 对偶氮染料酸性大红 GR 的降解速率,可知耐盐菌株 GYZ 自身有辅酶 NADH 产生系统,在降解染料的工程中不需要外加辅酶。

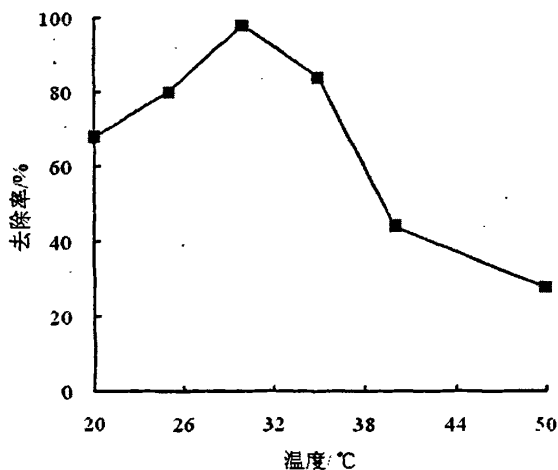


图 3-7 温度对染料 GR 脱色率的影响

Fig.3-7 Effect of temperature on decolorization of Acid Scarlet GR

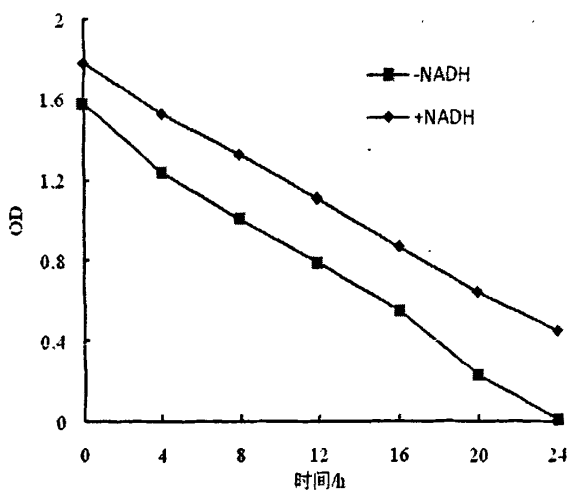


图 3-8 NADH 度对脱色率的影响

Fig.3-8 Effect of NADH on decolorization of Acid Scarlet GR

3.2.7 处于不同生长阶段的菌对染料降解的影响

菌体在不同生长阶段，其活性是不同的，因此实验过程中选取处于不同生长阶段的菌分别转接到 LB 培养基配制的实验用水中，控制菌体初始 OD_{660} 为 0.28~0.30，染料酸性大红 GR 初始浓度为 $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ， 30°C 静置厌氧培养，48 h 相对脱色率如图 3-9 所示。

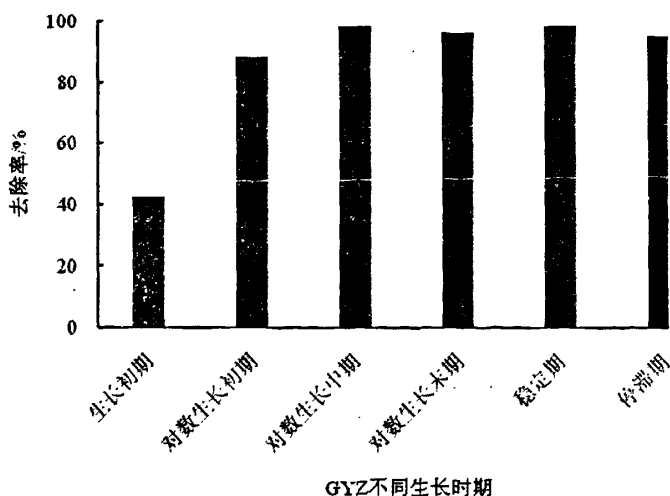


图 3-9 不同生长期的菌对染料脱色率的影响

Fig.3-9 Effect of different OD on decolorization of Acid Scarlet GR

由图 3-9 可见,处于对数生长期的菌体脱色率最高,48 h 可达 85%以上,而在菌的生长初期,由于刚将少量细菌转接至一种培养基中,一部分细菌适应环境,另一部分死亡,细菌总数下降,因此脱色率不高。而在生长后期,由于代谢产物大量积累对菌体本身产生毒害,pH、氧化还原电位等均有所改变。

3.2.8 菌体对染料降解的广谱性

结构简单的、分子量低的更容易被降解;相反结构复杂、分子量大的难以降解。根据末端非酶脱色机理,还原速率受偶氮基团附近电子密度影响。供电子取代基(-SO₃H-SO₂NH₂) 在偶氮键的对位,会增强脱色效率。

将处于对数生长期的菌株 GYZ 接入用 LB 培养基配制的实验用水中,菌体接种初始 OD₆₆₀ 为 0.28~0.30,初始染料浓度均为 100 mg·L⁻¹,30℃静置厌氧培养,48 h 脱色率如图 3-10 所示。

由图 3-10 可看出,在分子结构相近的情况下,单偶氮染料较多偶氮染料容易脱色(如图 3-10 中酸性大红 GR 比酸性红 B 脱色速度慢),但分子结构复杂的单偶氮染料脱色难度也很大(如图 3-10 中活性艳红 M-8B)。这是由于在厌氧条件下,偶氮还原酶由位于细胞膜和细胞质中两种不同的酶系统组成,结构简单的偶氮染料分子比结构复杂偶氮染料分子更容易穿过细胞膜进入细胞内,被两套酶系统同时作用,故宏观上表现为易脱色,如酸性红 B。对于结构复杂的多偶氮染料,脱色效果取决于芳环上促进基团和抑制基团的协同作用,如直接耐晒黑 G 也具有不错的脱色效果,是由于芳环上含有多个促进基团(如-OH, -NH₂),足以抵消抑制基团的抑制作用。

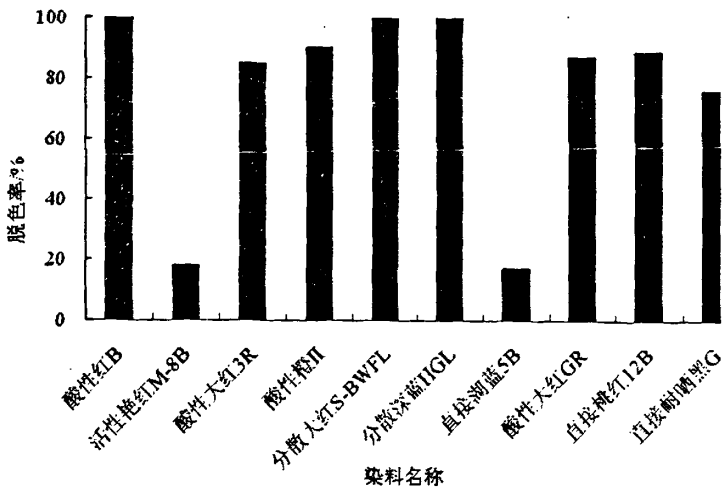


图 3-10 48 h 不同染料脱色效果

Fig.3-10 Decolorization of various dyes in 48 h

3.2.9 染料浓度对脱色效果的影响

染料浓度会影响脱色效率是由染料的毒性引起的。酶一般在低浓度染料下有很好的脱色效率。Michaelis-Menten 方程可以用来描述酶催化过程：

$$V = V_{\max} \frac{[S]}{K_m + S} \quad (3-2)$$

式中 V —— $[S]$ 浓度下反应速率；

V_{\max} ——某底物浓度下最大速度；

K_m ——Michaelis 常数。

Wuhmann 等^[56]观察发现，初始快速的脱色后，脱色速率会降低。这是由于染料脱色过程中代谢中间产物的毒性造成的。染料浓度越高，脱色需要的时间就越长。

将处于对数生长期的菌株 GYZ 接入用 LB 培养基配制的实验用水中，菌体接种初始 OD_{660} 为 0.28~0.30，30℃ 静置厌氧培养，分别在 48 h 和 120 h 时测染料的脱色率，实验结果见图 3-11。

由图 3-11 所示，单从脱色率上看，染料浓度越低脱色率越高，48 h 时，染料浓度为 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时脱色率可以达 80% 以上，而 $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的脱色率只有不到 20%。在一定条件下，菌体的数量一定，降解染料的数量也一定，超过此限度，脱色效率下降。

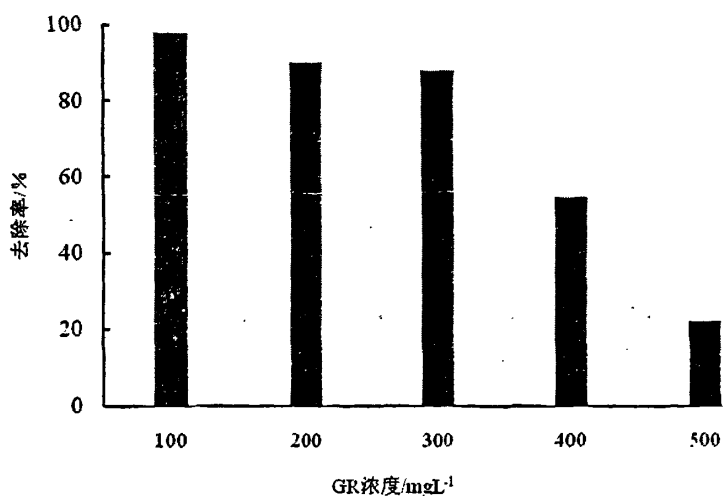


图 3-11 酸性大红 GR 浓度对脱色率的影响

Fig. 3-11 Effect of dye concentration on decolorization of Acid Scarlet GR

3.3 本章小结

实验结果表明:

- 1)分别在有氧和厌氧的情况下考察了耐盐菌株 GYZ 对偶氮染料 GR 降解情况,结果表明耐盐菌株 GYZ 必须在缺氧的条件下方可降解偶氮染料;
- 2)GYZ 对酸性大红 GR 脱色的最适温度为 30℃左右,最适 pH 为 7.5;
- 3)GYZ 对偶氮染料脱色具有广谱性,对单偶氮和多偶氮染料均具有较高的脱色效果。

第4章 耐盐菌株 GYZ 偶氮还原酶特性及其相关基因克隆

耐盐菌株 GYZ 之所以能够降解偶氮染料, 本质上是其所分泌的偶氮还原酶在起作用, 酶是生物合成的, 除了少数核酸具有催化作用外, 大多数具有催化作用的酶都是蛋白质, 而蛋白质的存在以及催化活性, 很大程度上依赖于环境因素, 如环境的温度、pH 等, 这些因素的改变影响酶促反应的速度以及酶促反应的程度。通过对偶氮还原酶的特性研究, 可以使耐盐菌株 GYZ 在偶氮还原酶活性最大的条件下实现对偶氮染料废水最有效的降解。影响酶促反应的最重要的因素是温度、pH 值、酶催化动力学等。本章从主要从以上几方面对耐盐菌株 GYZ 的偶氮还原酶进行研究。

4.1 实验部分

4.1.1 实验材料

4.1.1.1 实验仪器见表 4-1。

表 4-1 实验仪器列表

Table 2.1 List of experimental instruments

| 仪器名称 | 型号 | 厂商/产地 |
|----------|------------------------|--------------------------------------|
| 高速冷冻离心机 | Heraeus Biofuge primor | Kendro Laboratory Products (Germany) |
| 紫外分光光度计 | UV2600 | 上海天美 |
| PCR 仪 | 2720 Thermal cycler | ABI (USA) |
| 凝胶成像系统 | ChemiDOC | BIO-RAD (USA) |
| 自动高压灭菌器 | CL-32L | ALP (Japan) |
| 电泳仪 | DYY-6C | 北京六一 |
| 超纯水机 | UPH | 成都优普 |
| 超低温冰柜 | DW-YW226A | 中科美菱 |
| 超级微量恒温器 | HW-8B | 上海浦江 |
| 制冰机 | IMS-40 | 江苏格林 |
| 旋涡混合器 | QL-901 | 海门其林贝尔 |
| 恒温水浴摇床 | SKY-110WX | 上海苏坤 |
| 移液器 (一套) | DRAGON | Hongkong |
| 移液器 (一套) | GILSON | France |

4.1.1.2 菌株来源

本实验室已分离驯化好的菌株（耐盐菌株 GYZ）

4.1.1.3 实验药品:

NADH、Tris、考马斯亮蓝 G-250 Taq 酶、dNTP、DNA Marker RNaseA、溶菌酶、购自宝生物工程(大连)有限公司，磷酸盐缓冲液(K_2HPO_4 、NaCl、KCl、 KH_2PO_4)，其余药品为国产分析纯。

4.1.1.4 分析项目及测定方法

粗酶提取：溶菌酶加超声破碎法

蛋白含量测定：考马斯亮蓝 G-250 染色法

酶的活性及动力学测定：UV2600 紫外-可见分光光度计

DNA 提取：SDS+溶菌酶+蛋白酶 K

偶氮还原酶基因克隆：PCR 法

DNA 和偶氮还原酶基因检测：琼脂糖电泳

4.2 实验内容

4.2.1 粗酶提取法

1)开启制冰机制冰，加水制成冰水混合物以备超声破碎时恒温使用（超声破碎时，由于超声振动，机械能转变为热能，会导致溶液温度的升高，使蛋白质产生热变性）。

2)将细胞解冻，用适量 20 mM pH=8.0 磷酸缓冲溶液将其悬浮，再以少量 pH=8.0 的磷酸缓冲溶液洗脱粘附于离心管壁的菌体，用振荡器振荡，使其均匀分散悬浮后加入小烧杯中。加入溶菌酶至终浓度为 $0.25 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ，在 37°C 下保温 30 min。

3)将小烧杯固定于冰水混合物中，将超声探头与感温探头小心放入小烧杯中。

4)设置好超声破碎机工作参数(温度： 15°C ；时间：30 min；频率：1.0 s；破碎：1.0 s 间歇)后开机破碎。

5)将小烧杯中破碎后的细胞液与细胞残体的混合液转移至 10 ml 离心管中，外加套管在天平上平衡后准备离心。

6)安装转子，设置好参数(Rotor: JA-30.50；速度： $20000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ；温度： 4°C ，时间：20 min)输入后，开机离心。

7)离心结束后管底附着细胞壁残体，小心收集上清液，即得粗酶，置 4°C 冰箱中保存备用。

4.2.2 蛋白含量测定

标准曲线绘制：采用考马思亮蓝 G-250 染色法测定粗酶液中蛋白质的总含量，牛血清白蛋白作为标准蛋白。以不同浓度的牛血清白蛋白为横坐标，以所对应的吸光度为纵坐标，其标准曲线见图 4-1。

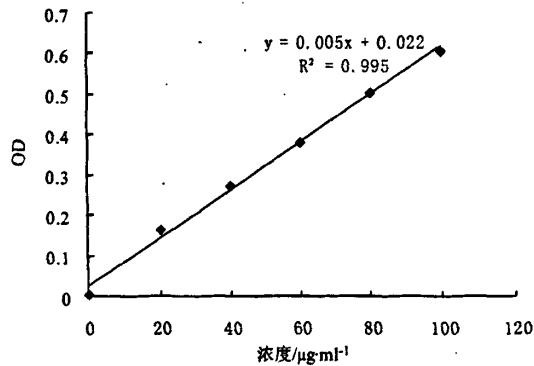


图 4-1 测定蛋白质含量的考马斯亮蓝 G-250 染色法标准曲线

Fig.4-1 Standard curve of Coomassie Brilliant Blue G-250 method determining protein

4.2.3 染料酸性红 B 工作曲线绘制

取不同浓度染料，以染料酸性红不同浓度为横坐标，所对应的吸光度为纵坐标做染料酸性红 B 工作曲线见图 4-2。

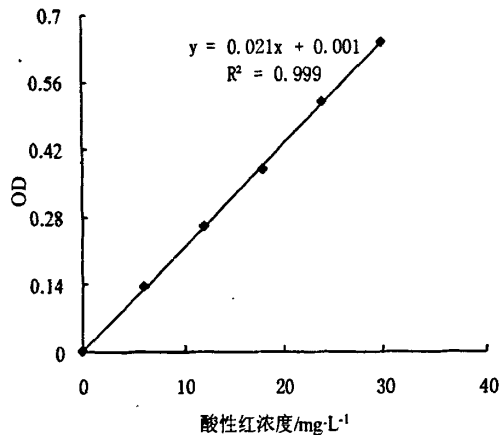


图 4-2 染料酸性红工作标准曲线

Fig. 4-2 Decolorization of Acid Red B

4.2.4 酶的活性测定

首先以 pH=8.0 的磷酸缓冲液为参比,使用 UV2600 紫外-可见分光光度计对各种染料在 pH=8.0 下进行全波长扫描(200~800nm),确定酸性红染料的最大吸收波长。反应体系总体积为 3 ml,偶氮还原酶粗酶和终浓度为 250 μM 的 NADH。向原试样中加入 NADH 混匀后,开始脱色反应。迅速放入 UV2600 紫外-可见分光光度计中,以 pH=8.0 的磷酸缓冲液为参比,在最大吸收波长下,于 20 $^{\circ}\text{C}$ 下测定反应体系的吸光度

随时间的变化情况。取初始一段时间,吸光度线性下降的切线部分,计算酶的比活。用单位时间下,吸光度的下降或染料降解的量来表示单位质量的酶的活性。

$$U = \frac{(A_0 - A_t)V}{Mktm} \quad (4-1)$$

式中 U ——比酶活

A_0 ——0 时刻染料的吸光度值

A_t —— t 时刻染料的吸光度值

T ——时间/min

M ——相应染料的分子量

V ——反应体系的总体积

K ——染料工作曲线的斜率

M ——加入反应体系中酶的质量/mg

4.2.5 DNA 提取方法

- 1)菌液离心 5 ml, 弃上清;
- 2)加 1 ml 的 TE, 混匀使之悬浮;
- 3)加 20 μ l 溶菌酶, 慢慢混匀;
- 4)37 $^{\circ}$ C 水浴加热 1 h;
- 5)加蛋白酶 5 μ l 混匀;
- 6)55 $^{\circ}$ C 水浴加热 1 h;
- 7)将上述溶液均匀的分成两份分别放入 1.5 ml 的离心管中, 加入等体积的苯酚、氯仿、异戊醇的混合液(25:24:1);
- 8)缓慢混匀、静置 5 min 中后, 10 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 10 min;
- 9)小心取其上清液重复(7)(8)两次后取其上清液;
- 10)加入 60% 体积的异丙醇后, 放入 -20 $^{\circ}$ C 冰箱静置 12 h;
- 11)离心后倒掉上清液, 加入 50 μ l 80%乙醇, 12 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 5 min;
- 12)倒掉上清液, 吹干, 加入 100 μ l 超纯水, 放入 20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

4.2.6 偶氮还原酶基因克隆

4.2.6.1 PCR 引物的设计:

PCR 引物依照四个序列的保守区域设计(GenBankTM 登陆号 AB032601, AB071366, AB071367 及 AB071368)。引物序列如下:

yb1, 5'- GCGGATG(GC)G(GA)TTGTATTAT-3';

yb2, 5'- ATCAAGCAC(AC)A(CG)(TC)TG(CT)TT-3'.

4.2.6.2 PCR 扩增:

以菌株 GYZ 染色体为模板进行 PCR 扩增.

PCR 反应:

| | |
|--|-------------|
| TaKaRa Ex Taq O($5U \cdot \mu l^{-1}$) | 1 μl |
| 10 \times Ex Taq Buffer | 10 μl |
| dNTP Mixture(各 2.5mM) | 8 μl |
| 染色体 | 5 μl |
| yb1($10pmol \cdot \mu l^{-1}$) | 2 μl |
| yb2($10pmol \cdot \mu l^{-1}$) | 2 μl |
| ddH ₂ O | 72 μl |
| Total | 100 μl |

反应条件:

| | | |
|----------------|-------|------------------|
| 94 $^{\circ}C$ | 1 min | } $\times 30$ 循环 |
| 94 $^{\circ}C$ | 30 s | |
| 55 $^{\circ}C$ | 30 s | |
| 72 $^{\circ}C$ | 1 min | |
| 72 $^{\circ}C$ | 7 min | |
| 4 $^{\circ}C$ | | |

4.3 结果与讨论

4.3.1 粗酶与辅酶的关系

许多菌株的偶氮还原酶只有在 NADH 存在的下方可降解偶氮染料,但是关于耐盐菌 GYZ 的偶氮还原酶降解偶氮染料的特性还没有相关的报道,为了研究耐盐菌 GYZ 偶氮还原酶的特性,进行以下研究:(1)偶氮还原酶单独作用(2)偶氮还原酶和辅酶共同作用(3)辅酶单独作用;其工作曲线如下图 4-3 所示:

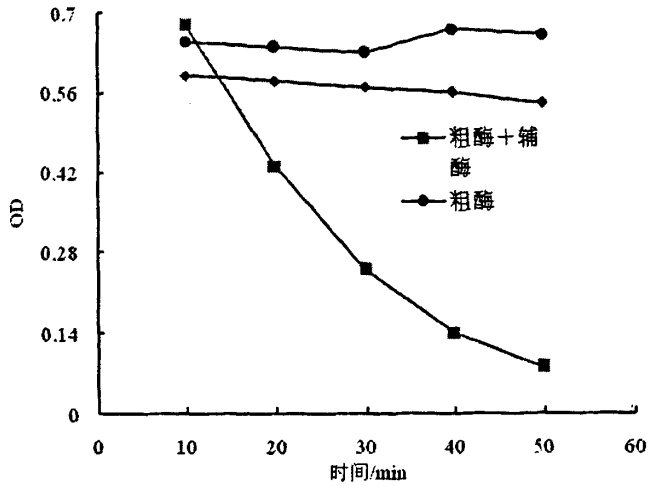


图 4-3 NADH 对粗酶酶活的影响

Fig.4-3 Effect of NADH on GR

从图 4-3 可以看出单一的偶氮还原粗酶和单一的辅酶都不能降解偶氮染料, 偶氮还原酶只有在和辅酶的共同作用方可降解偶氮染料。

4.3.2 偶氮还原酶定位研究

不同的菌其酶存在的部位不同, 为了考察耐盐菌株 GYZ 酶的存在部位, 从具有活性的菌株中提取粗酶, 与分泌物上清液分别进行实验并与完整菌体相比, 在相同蛋白含量并且在同样外加还原辅酶时, 比较其脱色活性。本实验各取 30 ml 处于对数生长期菌株四份: (1)离心后取其上清液作为胞外酶测其活性; (2)离心后倒掉上清液用 pH=8.0 的磷酸盐缓冲液冲洗几次后加入 30 ml 磷酸盐缓冲液作为完整菌株; (3)离心后倒掉上清液用 pH=8.0 的磷酸盐缓冲液冲洗几次后加入 30 ml 磷酸盐缓冲液作为完整菌株测活性时加辅酶; (4)离心后倒掉上清液后, 加入 30 ml 磷酸盐缓冲液后超声破碎提取粗酶。实验结果见图 4-4。

从图 4-4 可以看出 GWY 菌株胞内胞外都具有偶氮还原酶, 胞外酶活性远小于胞内, 活体菌株在不加辅酶的情况下也可以降解偶氮染料。研究中发现从具有活性的菌株中纯化的偶氮还原酶, 与完整菌体相比, 在相同蛋白含量的情况下, 具有更高的脱色活性。并且在同样外加还原辅酶时, 纯化的酶的活性会大大增加, 而完整细胞活性没有明显提高。这说明细胞膜在传质过程中起到了速度阻碍作用。

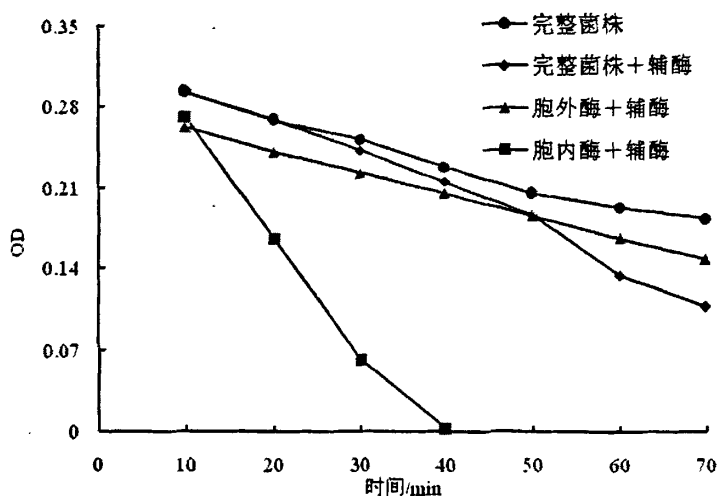


图 4-4 胞内胞外和完整菌株的工作曲线

Fig.4-4 endoenzyme and ectoenzyme on azoreductase activities

4.3.3 不同染料浓度对酶促反应速度的影响

在生化反应中，若酶的浓度为定值，底物的起始浓度很低时，酶促反应速度与底物浓度成正比，即随底物浓度的增加而增加，当所有的酶与底物结合生成中间产物后，即使再增加底物浓度，中间产物浓度也不会增加，酶促反应速度也不增加。

GR 为了考察偶氮染料酸性大红 GR 在不同浓度下对耐盐菌株 GYZ 偶氮还原酶活性的影响，进行了研究，结果见图 4-5。

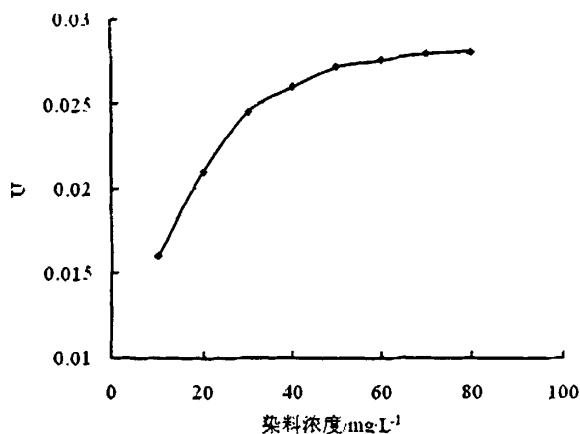


图 4-5 染料浓度粗酶酶活的影响

Fig.4-5 Effect of dye concentration on azoreductase activities

从图 4-5 可以看出，即使酶浓度足够高，随着底物浓度的升高，酶促反应速度并没有因此而增加，甚至受到了抑制。其原因是高浓度的底物降低了水的有效浓度，

降低了分子扩散性，从而降低了酶促反应速度；过低的底物会与激活剂结合，降低了激活剂的有效浓度，也会降低酶促反应速度。过低的底物聚集在酶分子上，生成无活性的中间产物，不能释放出酶分子，从而也会降低反应速度。

4.3.4 不同辅酶浓度对酶促反应速度的影响

在单独的偶氮还原酶粗酶的作用下，无法降解偶氮染料，只有在和辅酶的共同作用下方可降解偶氮染料，为了确定偶氮还原酶和 NADH 的量从而使偶氮还原酶在最佳的条件工作进行了如下研究，取 6 个 3 ml 的比色皿中分别加入 750 μg 酸性红 B, 1.5ml 的粗酶溶液后依次加入不同质量的 NADH, 用 $\text{pH}=7.5$ 的磷酸盐缓冲液补充到 3 ml, 依次测其酶活性，研究结果见图 4-6。

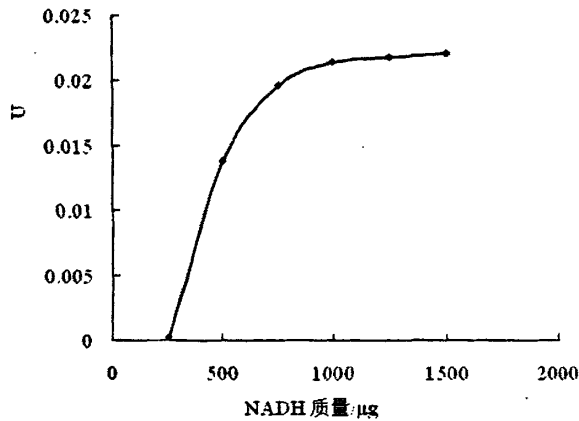


图 4-6 NADH 对粗酶酶活的影响

Fig.4-6 Effect of NADH concentration on azoreductase activities

从图 4-6 可以看出粗酶和 NADH 的量的比接近 1:2 的情况下，粗酶的酶促反应速度最佳。

4.3.5 偶氮还原酶动力学

Masayuki Nakanishi 等研究偶氮还原酶动力学的过程中，发现染料和 NADH 在酶促脱色反应中作为两种底物，符合乒乓原理。乒乓动力学给出了有关一个共价中间物出现的信息，染料和 NADH 作为两种参加反应的底物，其中一个(NADH)和酶反应产生一种共价修饰酶，并且释放出一种产物(NAD⁺)，然后，此酶再与另一底物(染料)进行反应，如此过程就得了一组平行特性曲线。为了考察耐盐菌株 GYZ 偶氮还原酶动力学进行了研究，结果见图 4-7、4-8 所示。

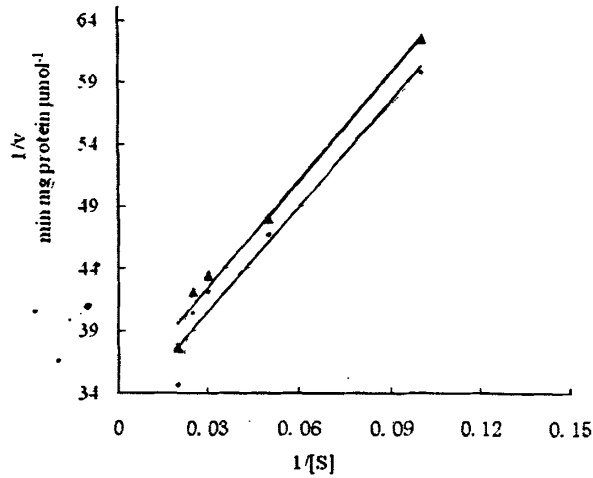


图 4-7 在不同 NADH 浓度下降解初始速率对甲基橙浓度的双倒数曲线

NADH 250-1500 μ M, ▲酸性红 20 μ M ■酸性红 40 μ M

Fig.4-7 Double-reciprocal plot of initial velocity (v) versus concentration of Methyl Orange [s]

NADH 250-1500 μ M, ▲Acid Red B 20 μ M ■Acid Red B 40 μ M

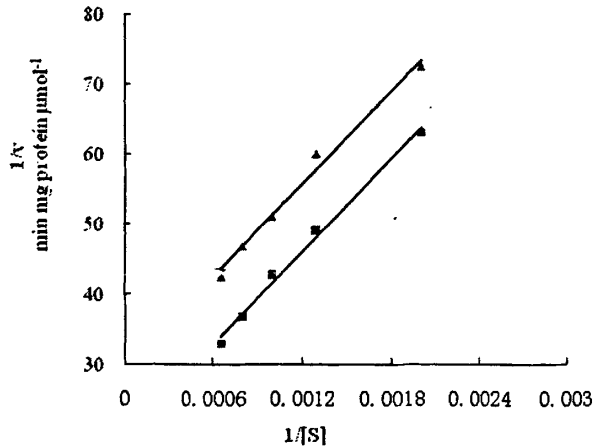


图 4-8 在不同甲基橙浓度下降解初始速率对 NADH 浓度的双倒数曲线

酸性红 10-50 μ M ▲表示 NADH 500mM ■NADH 750mM

Fig.4-8 Double-reciprocal plot of initial velocity (v) versus concentration of NADH[s]

NADH 250-1500 μ M, ▲Acid red 20 μ M ■Acid red 40 μ M

由图 4-7、4-8 可见，GWY 菌株偶氮还原酶粗酶显示了偶氮还原酶活性。偶氮还原酶对偶氮染料的降解符合乒乓机理。

4.3.6 pH 对酶活的影响

pH 对酶促反应的影响，一般来说，主要是以酶促反应的最适 pH 值和 pH 值变化对酶的稳定性表现出来。pH 对酶活性的影响主要有以下几个方面：

- 1)酸或碱可以使酶的结构破坏,引起酶活性丧失。
- 2)酸或碱影响酶活性部位催化基团的解离状态,使得底物不能分解成产物。
- 3)酸或碱影响酶活性部位结合基团的解离状态,使得底物不能和它结合。
- 4)酸或碱影响底物的解离状态,或者使得底物不能和酶结合,或者结合后不能生成产物。

基于以上原因,酶促反应存在一个合适的 pH。最适 pH 值的测定与最适温度的测定类似,即测定不同 pH 下酶活力,以酶活力对 pH 作图,得一钟罩性曲线,曲线的最高点所对应的 pH 即是酶促反应最适 pH。为了考察 pH 对耐盐菌株 GYZ 的影响,进行了试验研究,结果见图 4-9。

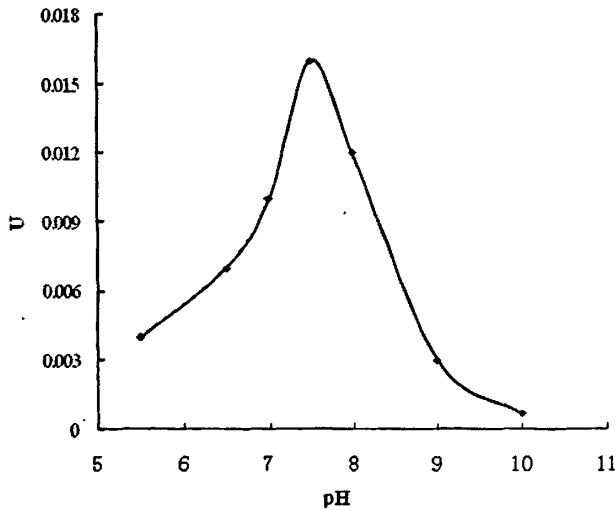


图 4-9 pH 对粗酶酶活的影响

Fig.4-9 Effect of PH on azoreductase activities

从图 4-9 可以看出,在 pH 小于 5.0 的情况下,反应体系出现絮凝沉淀现象,无法检测反应,由于 pH 值过低,酸性过高造成酶的变性; pH=5.5 时,酶的活性很低,表明酶的活性仍然受到很大影响; pH 6.0~7.0 时,酶的活性继续增大。当 pH=7.5 时酶的活性达到最大; pH 达到 8 时活性稍有下降; pH 大于 8 时,酶的活性迅速开始下降。因此,可以认为 pH=7.5 为酶的最适 pH 值,此时酶的活性最高,而且 pH 7.5~8 时活性变化很平缓,最佳 pH 范围比较宽。

4.3.7 温度对酶促反应的影响

温度对酶促反应的影响比较复杂。一般来讲，温度对酶促反应的影响主要有以下两个方面：一是温度对酶蛋白稳定性的影响，即对酶蛋白的变性失活作用。二是温度对酶促反应本身的影响，包括影响最大反应速度，影响酶与底物的结合，影响酶与抑制剂、激活剂或辅酶的结合影响酶与底物分子的解离状态等温度的影响具有双重性。也就是说，一方面，像一般化学反应一样，温度升高活化分子数就增多，反应速度就加快。另一方面，由于酶的蛋白质性，在较高的温度下会变性失活，从而使反应速度降低。因此，酶促反应有一个“最适”的温度，但是，酶的最适温度其实不是酶的特征性物理常数，一般来讲，酶促反应时间越长，所测得的最适温度越低，此外，最适温度还与底物浓度、反应 pH、离子强度等因素有关。温度对耐盐菌株 GYZ 偶氮还原酶的影响见图 4-10 所示。

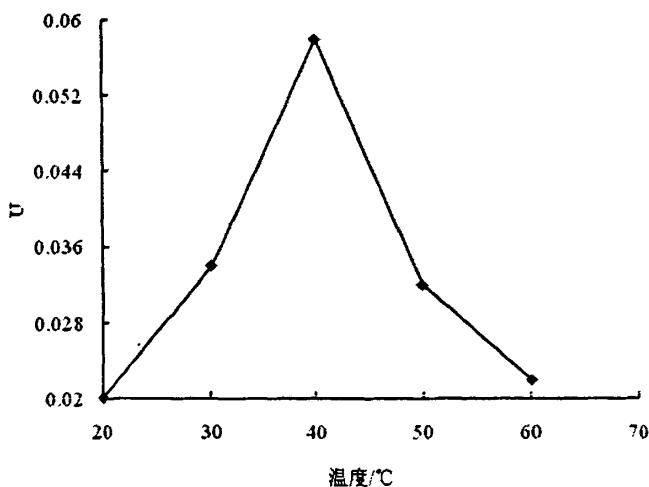


图 4-10 温度对粗酶酶活的影响

Fig.4-10 Effect of temperature on azoreductase activities

从图可以看出偶氮还原酶的最适反应温度为 40°C。温度过高会使偶氮还原酶丧失活性。

4.3.8 偶氮还原酶基因克隆

通过溶菌酶+SDS 法提取的耐盐菌 GYZ 总 DNA 经琼脂糖电泳后，用 DGGE 凝胶成像系统分析，方可看到 23 000 bp 左右长度的 DNA 片段。通过 PCR 扩增以后得到一大约 550 bp 左右的偶氮还原酶基因片段。须进一步研究进行测序。

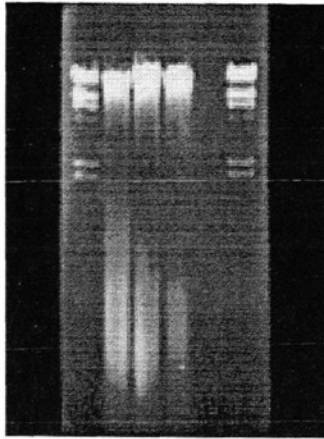
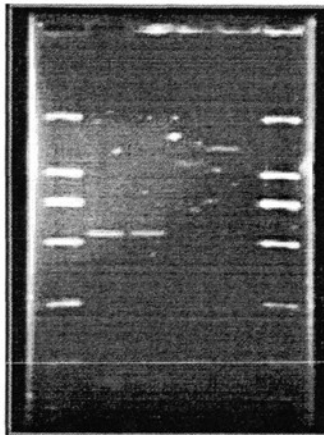


图 4-11 GYZ 总 DNA

Fig.4-11 The total DNA of GYZ



4-12 GYZ DNA PCR 扩增产物

Fig.4-12 Electrophoretic of amplification of GYZ DNA

4.4 本章小结

本章通过对耐盐菌株 GYZ 在温度、pH、染料浓度、NADH 等对偶氮还原粗酶活性的影响进行了研究，并通过 PCR 克隆偶氮还原酶基因片段，结果如下：

1)底物的起始浓度很低时，酶促反应速度与底物浓度成正比，即随底物浓度的增加而增加，当所有的酶与底物结合生成中间产物后，即使在增加底物浓度，中间产物浓度也不会增加，酶促反应速度也不增加。

2)粗酶和辅酶的最佳浓度比为 1:2

3)偶氮还原酶降解偶氮染料符合乒乓定理

4)当 pH=7.5 时为酶的最佳 pH 值，此时酶的活性最高。

5)通过 PCR 扩增可以获得 550 bp 左右的偶氮还原酶基因片段。

结 论

本课题考察了耐盐菌株 GYZ 其生长特性及对偶氮染料的降解特性；同时，对耐盐菌株 GYZ 偶氮还原粗酶活性进行了研究主要结论如下：

(1)耐盐菌株 GYZ 对氨苄青霉素无抗性，对链霉素、庆大霉素、盐酸林可霉素、土霉素及阿维菌素均有抗性。菌株 GYZ 可以在盐度为 0%~20%的环境中生长，当盐浓度不超过 10%时生长良好，最适生长 pH 为 7.2~7.5，最适生长温度为 30℃。耐盐菌株 GYZ 在钠盐和镁盐存在的情况下，可较好的生长，而铝、锰的加入会严重抑制菌体的生长。加入甜菜碱可提高菌株在高盐条件下的生长速率，最佳值为 200 mg·L⁻¹。

(2)偶氮染料 GR 必须在缺氧的条件下方可降解偶氮染料；GYZ 对酸性大红 GR 脱色的最适温度为 30℃，最适 pH 为 7.5；耐盐 GYZ 对偶氮染料脱色具有广谱性，对单偶氮和多偶氮染料均具有较高的脱色效果。

(3)底物的起始浓度很低时，酶促反应速度与底物浓度成正比，即随底物浓度的增加而增加，当所有的酶与底物结合生成中间产物后，即使在增加底物浓度，中间产物浓度也不会增加，酶促反应速度也不增加；粗酶和辅酶的最佳浓度比为 1:2；偶氮还原酶降解偶氮染料符合乒乓定理；当 pH=7.5 时为酶的最佳 pH 值，此时酶的活性最高；通过 PCR 扩增可以获得 550 bp 左右的偶氮还原酶基因片段。

参考文献

- [1] 郭建博,周集体,田存萍,等.耐盐菌在复合高盐条件下对偶氮染料 K-2BP 的脱色研究.环境科学与技术,2006,29(6):26-34
- [2] 李杏向,周集体.耐盐菌对偶氮染料酸性红 B 的脱色研究.环境科学学报,2007,27(10):1637-1642
- [3] 邹小玲,丁丽丽,赵明余,等.高盐度废水生物处理研究.工业水处理,2008,28(9):1-4
- [4] 戴树桂,宋文华,李彤,等.偶氮染料结构与其生物降解性关系研究进展.环境科学学报,1996,4(6):1-9
- [5] L.J HAO, P XU. Applications of Microbes in Dye Degradation and its Mechanism. Shandong Inst Light Ind, 2001, 15(2): 52-56
- [6] 刁文中.偶氮分散用活性白土的处理.染料工业,1984,(4):30-32
- [7] T.H LIU, MATSUURAT, S SOURIRAJON. Effect of Membrane Material Sand Average Pore Sizes on Reverse Osmosis Separation of Dyes. Ind Eng Chem Prod Res Dev, 1983, 22: 77-85
- [8] 张建英,梁缘东,陈曙光,等.染色废水脱色混凝效应研究.环境污染与防治,1998,20(3):9-12
- [9] 程云,周启星,马奇英,等.染料废水处理技术的研究与进展.环境污染治理技术与设备,2004,4(6):56-60
- [10] 阎存仙,罗曼.粉煤灰吸附去处活性艳蓝 XBR.上海交通大学学报,1998,32(9):126-129
- [11] 王振余,郭树才.炭膜处理染料水溶液的研究.膜科学与技术,1997,17(5):7-1
- [12] 刘梅红,姜坪.膜法染料废水处理试验研究.膜科学与技术,2001,21(3):50-52
- [13] 苏玉萍,奚旦立.活性染料印染废水混凝脱色研究.上海环境科学,1999,18(2):88-90
- [14] 卢俊瑞.溴氨酸活性染料生产废水治理.工业水处理,1999,19(3):20-21
- [15] 美洁,蒋湘顺,张鹏,等.SPTL-CS 系列复合无机高分子絮凝剂对石油和印染废水处理的研究.工业水处理,1997,17(5):20-21
- [16] 李俊雷,陈曙光.活性染料废水絮凝脱色性能研究.浙江师大学报,2005,24(3):268-271
- [17] 尹华,彭辉,刘慧义.淀粉改性阳离子絮凝机理浅探及应用.工业水处理,2000,20(2):5-8
- [18] 陈元彩,肖锦.天然有机高分子絮凝剂研究与应用.环境科学进展,1999,7(3):85-89
- [19] 林文鑫,黄惠莉.微生物絮凝剂的制备及其对净化水的研究.福建化工,2001,2:50-53
- [20] E.KERZHNER, S.IRMAKA, H.YAVUZA. Comparison of the Treatment Methods Efficiency for Decolorization and Mineralization of Reactive Black 5 Azo Dye. Journal of Hazardous Materials, 2005, 119: 109-116
- [21] 胡文容,钱梦路,高廷耀.超声强压臭氧氧化偶氮染料的脱色效能.中国给水,1999,15(11):

- 1-4
- [22] 顾平, 刘奎, 杨造燕. Fenton 试剂处理活性黑 KBR 染料废水研究. 中国给水, 1997, 13(6): 16-18
- [23] R.J DAVRS. Photocatalytic Decolorization of Wastewater Dyes. *Wat Environ Res*, 1994, 66: 50-53
- [24] 管玉江, 杨卫身. 复极性固定床电解反应器对活性染料的降解. 环境化学, 1999, 18(3): 270-273
- [25] 许海梁, 杨卫. 偶氮染料废水的电解处理. 化工环保, 1999, 19(1): 32-36
- [26] D.J KUSHNER. Life in High Salt and Solute Concentrations: Halophilic Bacteria. *Microbial Life in Extreme Environments*, London: Academic Press, 2001, 48: 32-439
- [27] F LUDZACK, D.K NORAN. Tolerance of High Salinities by Conventional Wastewater Treatment Process. *Water Pollution Control Fed*, 2004, 37: 1404-1406
- [28] A OREN, P GUREVICH, M AZACHI, et al. Microbial Degradation of Pollutions at High Salt Concentrations. *Biodegradation*, 2007, 3: 387-389
- [29] C.R WOOLARDD, R.L IRVINE. Treatment of Hypersaline Wastewater in the Sequencing Batch Reactor. *Water Reseach*, 29: 1159-1168
- [30] C HINTEREGGER, F STREICHSBIER, S.P HALOMONAS. a Moderately Halophilic Strain, for Biatreatment of Saline Phenolic Wastewater. *Biotechnol Lett*, 2005, 19(1): 1099-1102
- [31] M.B PEYTON, T WILSON, D.R YONGE. Kinetics of Phenol Biodegradation in High Salt Solutions. *Water Research*, 2002, 36: 4811-4820
- [32] M.F HAMODA, M.S AL-ATLAR. Effects of high sodium chloride concentration on activated sludge treatment. *Water Science and Technology*, 1995, 31(9): 61-72
- [33] C.R WOOLARD, R.L IRVINE. Biological Treatment of Hypersaline Wastewater by a Biofilm of Halophilic Bacteria. *Water Environental Rearch*, 2004, 66(3): 230-235
- [34] F KARIGL, A.R DINCER. Enhancement of Biological Treatment Performance of Saline Wastewater by Halophilic Bacteria. *Bioprocess Eng.*, 1996, 15: 51-58
- [35] F LUDZACK, D.K NORAN. Tolerance of high Salinities by Conventional Wastewater Treatment Process. *Water Pollution Control Fed*, 2007, 37: 1404-1406
- [36] B SHIMSHON, B ASHER, A AHARON et al. Biological Treatment of A High Salinity Chemicial Industrial Wastewater. *Watersince and Technology*, 2005, 27(7-8): 105-112
- [37] M.R FERROR, A MORAL, E QUESADA et al. Growth rate and Some Physiological Features of *Deleya Halophila* CCM3662 at Different Salt Soncentrations. *Ann Inst Pasteur Microbiol*, 2006, 138(1): 49-58
- [38] 何健, 陈立伟, 李顺鹏. 高难度难降解工业废水生化处理的研究. 中国沼气, 2000, 18(2):

12-14

- [39] 杨健. 高含盐量石油发酵废水处理研究. 给水排水, 1999,25(3): 35-39
- [40] 梁展辉, 王士芬. SBBR 法处理高盐度有机废水的应用研究. 污染防治生物技术. 1998, 11(4): 226-228
- [41] H HORITSU, M TATEDS, E IDAKA, et al. Degradation of P-Aminoazobenzene by *Bacillus Subtilis*. *European Journal of Applied Microbial*, 2006, 14: 217-224
- [42] P.K WANG, P.Y YUAN. Decolorization and Biodegradation of Methyl Red by *Klebsiella Pneumonia RS-13*. *Water Research*, 1996, 30(7): 1736-1744
- [43] T.L HU. Decolorization of Reactive Azo Dyes by Transformation with *Pseudomonas Luteola*. *Biosource Technology*, 2006, 49: 47-51
- [44] 杨惠芳. 水污染防治及城市污水资源化技术. 北京: 科学出版社, 1993: 197
- [45] 鲜海军, 杨惠芳. 多种染料的微生物脱色研究. 环境科学学报, 1988, 8(3): 266-273
- [46] 鲜海军, 贾省芬, 杨惠芳, 等. 用高效染料脱色菌和 PVA 降解菌混合培养液处理印染废水. 环境科学学报, 1993, 13(4): 420-426
- [47] 闵一斑. ZE-1 号印染废水脱色菌群的选育及适用条件的研究. 环境污染与防治, 1992, 14(6): 14-16
- [48] F RAFII, E.C CERNIGLLA. Comparison of the Azoreductase and Nitroreductase from *Clostridium Perfringens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 59: 1731-1734
- [49] S NAM, V RENGANATHAN. Non-enzymatic Reduction of Azo Dyes by NADH. *Chemosphere* 2005, 40: 351-357
- [50] M NAKANISHI, C YATOME, N ISHIDA. Putative ACP Phosphodiesterase Gene (*acpD*) Encodes an Azoreductase, *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276 (49): 4394-4399
- [51] M.J CORNADO, CARMEN, V.H.J KUNTE. Influence of Salt Concentration on the Susceptibility of Moderately Halophilic Bacteria to Antimicrobials and its Potential Use for Genetic Transfer Studies. *Current Microbiology*, 2006, 31: 365-376
- [52] S.P CUMMINGS, M.P WILLIAMSON. Turgor regulation in Novel *Halomonas* Species. *Arch Microbiol*, 2005, 160: 319-323
- [53] T PANSWAD, W LUAN GDILOK. Decolorization of Reactive Dyes with Different Molecular Structures under Different Environmental Conditions. *Wat.Res.* 2000, 34(17): 4177-4184
- [54] S CHINWETKITVANICH, M TUNTOOLVEST, T PANSWAD. Anaerobic Decolourisation of Reactive Bath Effluent by a Two Stage UASB System with Tapioca As a Co-Substrate. *Wat.Res.*, 2006, 34(8): 223-223
- [55] E.S YOO, LIBRA, L ADRIAN. Mechanism of Decolorization of Azo Dyes in Anaerobic Mixed Culture. *Journal of Environmental Engineering*, 2001, 127(9): 844-849

- [56] K WAHRMANN,K MECHSNER,T KAPPELER.Investigations on Rate Determining Factors in the Microbial Reduction of Azo Dyes. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, 1980, 9: 325-338

攻读硕士学位期间所发表的论文

- [1] 郭建博,周集体,王栋,田存萍,王平,李晓霞.降解偶氮染料耐盐菌 GYZ 分离鉴定研究.环境科学学报,2007,02

致 谢

本学位论文得以顺利完成，与导师杨景亮教授和郭建博副教授的精心指导是密不可分的，在此表示最诚挚的感谢！

杨老师生活上博大的胸怀、虚怀若谷的作风处处展现着一个大家的个人魅力；对待科研上，忘我的工作热情和追根溯源的精神总是时时感染着我；对待工作的兢兢业业，对待学生的认真负责，总是感动着我们。这些都将使学生铭刻在心，受益终身。在此，向恩师杨景亮教授致以崇高的敬意。

郭建博副教授在我两年的毕业论文期间，给予我无私而真诚的帮助，他的不畏困难、勇于探索、乐观向上的积极态度深深激励了我，尤其是他“老老实实做人、踏踏实实做事、默默无闻做学问”的态度时时感动着我，在此表示最真诚的谢意。

在论文进行期间，李再兴老师、刘春老师曾给予我实验和生活上许多的帮助和指导，在此一并表示衷心的感谢。

感谢环境科学与工程学院给予我的机会，可以在此深造！

感谢我至亲至爱的家人和众多的好朋友，他们对我始终如一的支持与理解给予我不断向前的动力，使我顺利完成了硕士论文工作！