

# 活性黑5厌氧生物脱色的自催化作用研究

王兴祖<sup>1</sup> 程翔<sup>1</sup> 郑慧<sup>1</sup> 孙德智<sup>1,2</sup>

(1 哈尔滨工业大学市政环境工程学院 2 北京林业大学环境科学与工程学院)

**摘要:** 该文研究了活性黑5(RB5)经沼泽红假单胞菌W1脱色后的代谢物对RB5厌氧生物脱色的影响,实验结果表明:RB5的脱色代谢物能明显促进W1对RB5的脱色,同时对菌株W1生长有促进作用;不同浓度RB5的脱色代谢物均能促进菌株W1对RB5的脱色,并使培养液氧化还原电位(ORP)降低,其中200 mg/L RB5脱色产物对脱色的促进作用最大;RB5的脱色代谢物对RB5厌氧污泥脱色的促进作用与纯菌相似,不同的是它对厌氧污泥生长有一定抑制作用。循环伏安分析的实验结果表明:RB5脱色代谢物具有氧化还原介体的性质,其可逆的氧化还原峰分别位于83和-220 mV,说明RB5脱色代谢物对脱色的作用是通过氧化还原介体的机制实现的。通过对RB5、W1胞外代谢物和RB5脱色代谢物的循环伏安特性可知,氧化还原介体来自RB5的脱色产物,即RB5厌氧生物脱色时具有自催化的特性。

**关键词:** 沼泽红假单胞菌;活性黑5;染料代谢物;氧化还原介体;生物脱色

**中图分类号:** X172   **文献标志码:** A   **文章编号:** 1000-1522(2009)03-0135-05

WANG Xingzu<sup>1</sup>; CHENG Xiang<sup>1</sup>; ZHENG Hui<sup>1</sup>; SUN De-zhi<sup>1,2</sup>. Autocatalysis in biological decolorization of Reactive Black 5 under anaerobic condition. *Journal of Beijing Forestry University* (2009) 31(3) 135-139 [Ch, 15 ref.]

1 School of Municipal & Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, 150090, P. R. China;

2 College of Environmental Science & Engineering, Beijing Forestry University, 100083, P. R. China.

The effects of decolorization metabolites (DM) of Reactive Black 5 (RB5) from *Rhodopseudomonas palustris* W1 on the biodecolorization of RB5 under anaerobic condition were investigated. The results indicated that DM significantly enhanced the decolorization rate of RB5 and the growth rate of W1. DM of different concentration RB5 played a crucial role for stimulating decolorization, in which DM of 200 mg/L RB5 brought the highest effect, and accelerated the decrease of ORP as well. Stimulation of decolorization of anaerobic sludge by DM was similar to decolorization of W1, but it differed in that DM would slightly inhibit the growth of bacteria in anaerobic sludge. Cyclic voltammogram of DM showed that pair current peaks of reversible oxidation and reduction appeared at potential of 83 and -200 mV, respectively, indicating DM may present as redox mediators to enhance the RB5 decolorization. Comparison of cyclic voltammogram of RB5 solution, DM, and extracellular metabolites (EM) of the strain W1 further demonstrates that the redox mediators existing in the DM of RB5 decolorization, namely RB5 play the role of autocatalysis in the process of an anaerobic biodecolorization.

**Key words** *Rhodopseudomonas palustris*; Reactive Black 5; decolorization metabolites; redox mediators; biodecolorization

偶氮染料是染料中品种和数量最多的一类,包括活性、酸性、直接、阳离子和分散染料等,其产量约占有机染料产品总量的60%~70%<sup>[1]</sup>。在偶氮染料的生产和使用中,约有10%~15%的剩余染料随废

水排出,这些排放到环境中的染料不仅影响美观和水生植物的生长,同时许多偶氮染料和它们的代谢产物对生物具有三致(致癌、致突变、致畸)作用<sup>[2]</sup>。因此,偶氮染料的降解研究越来越引起人们的重视。

收稿日期: 2008-03-03

http://www.bjfujournal.cn, http://journal.bjfu.edu.cn

基金项目:“863”国家高技术研究发展计划项目(2007AA06Z300)。

第一作者:王兴祖,博士生。主要研究方向:环境微生物。电话:0451-86284412 Email:wuxingzhizhong@yahoo.com.cn 地址:150090哈尔滨工业大学市政环境工程学院。

责任编辑:孙德智,教授,博士生导师。主要研究方向:污染防治的物化与生物技术。电话:010-62336596 Email:sdzlab@126.com 地址:(同上)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

厌氧条件下偶氮结构能够被一些细菌还原酶裂解为无色的芳香胺。目前,部分细菌细胞质偶氮还原酶已经得到纯化和鉴定<sup>[3~6]</sup>。然而,含有极性磺酸基团的偶氮染料难以渗透通过细胞膜,同时,被认为是初级电子供体的NAD(P)H对于细胞膜也具有不可渗透性。因此高极性偶氮染料的还原应该发生在细胞外侧<sup>[1]</sup>,这个现象已通过偶氮染料胞外还原剂的间接非生物性还原<sup>[7]</sup>,以及原生质膜外侧还原酶的直接还原所证实。理论上,氧化还原介体能使还原当量更容易地从细胞内转移到基质中的染料。这个假说最早在研究普通变型杆菌(*Proteus vulgaris*)对食用偶氮染料脱色时被提出<sup>[8]</sup>。近年来的许多报道指出,氧化还原介体(通常为醌型化合物)能有效促进偶氮染料脱色<sup>[9~11]</sup>。氧化还原介体对细菌偶氮染料脱色的参与已经得到公认。这些氧化还原介体的研究通常为外源的化合物加入到脱色体系中,但最近的研究表明,“内源”性的氧化还原介体也是存在的。Keck等<sup>[12]</sup>观察到利用2-萘磺酸盐对鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas* sp.)进行好氧驯化,产生的代谢物能作为氧化还原介体促进该菌株后续的厌氧脱色。Van der Zee等<sup>[13]</sup>研究发现,酸性红7(AO7)厌氧还原过程中存在自催化效应,并认为AO7的还原产物之一——1-氨基-2-萘酚能促进染料自身的脱色。此外,自然界土壤腐殖质中的某些物质也能够充当氧化还原介体,促进偶氮染料的还原脱色<sup>[14~15]</sup>。

本实验通过沼泽红假单胞菌W1研究了活性黑5(RB5)脱色代谢物对RB5厌氧脱色的影响,发现RB5脱色代谢物能显著促进RB5脱色,即RB5具有厌氧脱色自催化作用。通过循环伏安的分析证实RB5脱色产物具有氧化还原介体性质,在此基础上初步探讨了RB5自催化脱色的机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 染 料

双偶氮染料RB5,购自中国浙江邦化集团有限公司,最大吸收波长位于600 nm处。

### 1.2 微生物和培养基

从处理染料废水的厌氧填充床反应器中分离得到1株紫色非硫细菌,经鉴定命名为沼泽红假单胞菌W1(*Rhodopseudomonas palustris* W1)。采用修改的Van Neil培养基(碳源修改为4 g/L的乳酸钠)作为菌株W1基础培养基(BM),脱色培养基为BM中添加浓度为200 mg/L的RB5。

厌氧污泥取自哈尔滨某污水处理厂厌氧污泥,经染料RB5反复驯化直至获得稳定高效的脱色率后使用。厌氧污泥脱色所用的培养基(g/L):蔗糖5,乙酸钠1, NH<sub>4</sub>Cl 1, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2, MgSO<sub>4</sub> 0.2, NaHCO<sub>3</sub> 0.5, RB5 0.2, 少量微量元素。微量元素组成(g/L),

MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.01, CaCl<sub>2</sub> 0.01, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 0.01, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.2, AlK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 0.01。

### 1.3 染料代谢物及菌体的获得

用菌株W1对RB5进行厌氧脱色,待脱色完全后将培养液在8 000 r/min下离心5 min,得到菌体和上清液。菌体作为后续实验的种子接种;上清液经0.22 μm滤膜过滤进一步去除菌体,滤出液称脱色代谢物(DM)。同理,BM培养的菌液进行上述操作,则获得W1胞外代谢物(EM)。DM和EM对脱色影响的实验中,DM和EM的接入量均为10%(体积比)。

### 1.4 不同浓度RB5的DM的获得

分别以含有不同浓度RB5(100、200、400、600和800 mg/L)的脱色培养基培养菌株W1,然后按照1.3操作获得一系列不同浓度RB5的DM,为别记为DM<sub>100</sub>~DM<sub>800</sub>。在随后的脱色实验中,分别将其按照10%(体积比)的接入量加到脱色培养基中。

### 1.5 不同浓度RB5的DM对RB5生物脱色的影响

分别将DM<sub>100</sub>~DM<sub>800</sub>及EM接入(接入体积比为10%)纯菌及厌氧污泥的脱色培养基,来研究不同浓度DM对生物脱色的影响。纯菌W1的初始生物量为50 mg/L,厌氧污泥初始生物量为2 g/L。

### 1.6 脱色条件

脱色实验在250 mL广口瓶中进行,装液量200 mL。在厌氧、静置、30℃条件下脱色,纯菌株W1的脱色增加光照(2 000 lx)。每5 h取样分析,每组实验设3个平行样,取其平均值。

### 1.7 分析方法

#### 1.7.1 细胞干重的测定

生物量由菌液660 nm处的光密度值(OD)确定。细胞干重(mg/L)和OD值的对应关系为( $R^2 = 0.998\ 9$ ):细胞干重 = 413.1 OD<sup>-2.4</sup>。

#### 1.7.2 氧化还原电位(ORP)的测定

ORP的检测采用PHS-25型酸度计的ORP复合电极。

#### 1.7.3 脱色率的测定

取4 mL培养液,加入到离心管中,8 000 r/min离心5 min,取上清液在分光光度计上测定600 nm处的吸光度值,并以不接菌的脱色培养基为对照,计算脱色率。脱色率 =  $(A_1 - A_0)/A_0 \times 100\%$  ( $A_0$ 为脱色前培养基的吸光度值,  $A_1$ 为脱色后培养基的吸光度值)。

#### 1.7.4 循环伏安分析

循环伏安分析采用三电极体系,以玻碳电极( $d=3$  mm)为工作电极,铂丝为辅助电极,Ag/AgCl为参比电极。用263A型电化学分析仪测试并做循环伏安曲线。扫描速率为50 mV/s,扫描范围在-500~500 mV。所用支持电解质Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>的浓度为0.1 mol/L。

实验前样品经高纯氮气除氧 30 min。

## 2 结果与分析

### 2.1 DM 对 RB5 纯菌脱色的影响

加入 DM 能显著促进菌株 W1 脱色(图 1), 20 h 脱色率达到 96%, 此时空白脱色率不足 80%。而在没有菌株 W1 存在时 DM 不能单独完成脱色(数据未列)。说明 DM 能够刺激菌株 W1 脱色而自身没有脱色能力, 同时也排除了 DM 中酶参与脱色的可能。EM 对 RB5 脱色影响不大, 25 h 时脱色率不足 80%, 与空白接近, 说明 DM 中促进脱色的活性组分不是由菌株 W1 自身基础代谢产生的。加入等体积培养基的空白实验组至 25 h 为止, 其脱色率只有 77%, 说明 DM 促进脱色也不是因为自身带有的少量残留的营养物。由此表明, DM 能够显著提高菌株 W1 对 RB5 的脱色速率, 并且促进脱色的活性组分应为 RB5 降解的中间体, 即 RB5 具有自催化脱色作用。

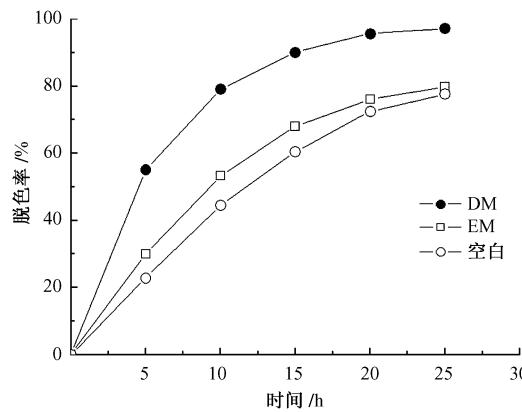


图 1 DM 对 RB5 脱色的影响

FIGURE 1 Effects of DM on decolorization of RB<sup>5</sup>

加入 DM 后 20 h 细胞浓度达到 320 mg/L(图 2), 是空白的 1.9 倍, 说明 DM 亦能促进菌株 W1 生长。而 EM 对细胞生长影响不大。值得注意的是, 在 5 h 内细胞生长处于停滞状态, 而加 DM 的实验组脱色速率是空白的 2 倍, 说明 DM 对脱色的促进不是通过增加生物量来实现的。

### 2.2 不同浓度 RB5 的 DM 对 RB5 纯菌脱色的影响

不同浓度的 DM(DM100~DM800)均能够促进菌株 W1 对 RB5 的脱色(图 3)。其中 DM200 对脱色的促进作用最显著, 5 h 脱色率接近 70%。高浓度 DM(DM600~DM800)对脱色的促进能力下降, 可能是高浓度 DM 中的有害产物浓度达到了毒性水平, 使 DM 对脱色的促进受到一定限制。从菌株 W1 生长(图 4)来看, 低浓度的 DM(DM100~DM400)能促进菌株 W1 生长, 而高浓度 DM(DM600~DM800)抑制菌株 W1 生长。

偶氮染料的厌氧脱色是在厌氧条件下发生的非

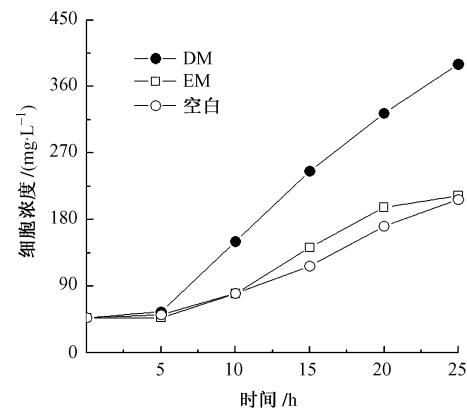


图 2 DM 对 W1 生长的影响

FIGURE 2 Effects of DM on the growth of W1

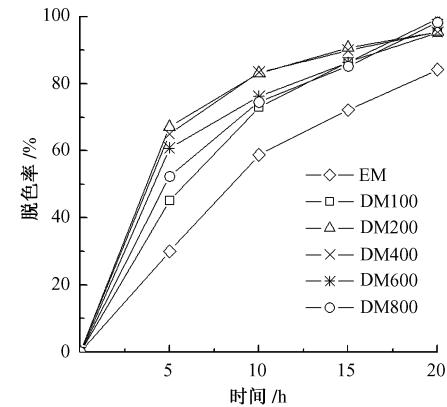


图 3 不同浓度 DM 对 RB5 脱色的影响

FIGURE 3 Effects of DM with different concentrations on biodecolorization of RB<sup>5</sup>

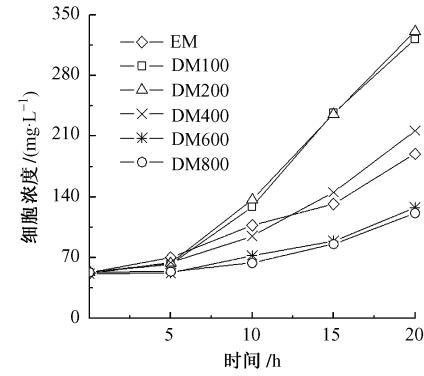


图 4 不同浓度 DM 对 W1 生长的影响

FIGURE 4 Effects of DM with different concentrations on the growth of W1

特异性的还原过程, 较低的氧化还原电位, 是染料厌氧脱色所必需的。从培养液氧化还原电位的变化(图 5)可以看出, 加入不同浓度 RB5 的 DM 均能加快培养液 ORP 的降低, 5 h 内 ORP 由 100 mV 下降到 -400 mV 左右, 而空白在 5 h 时 ORP 仅为 -300 mV 左右。目前认为偶氮染料的厌氧还原是由细菌在低 ORP 条件下催化完成的, DM 使 ORP 迅速达到较低

的范围,这对染料的厌氧脱色是有利的。另外,加入不同浓度的DM均使培养液终ORP低于空白,加入高浓度的DM能获得更低的ORP,但对比其脱色率的情况可以发现,更低的ORP没有进一步提高RB<sub>5</sub>的脱色速率。

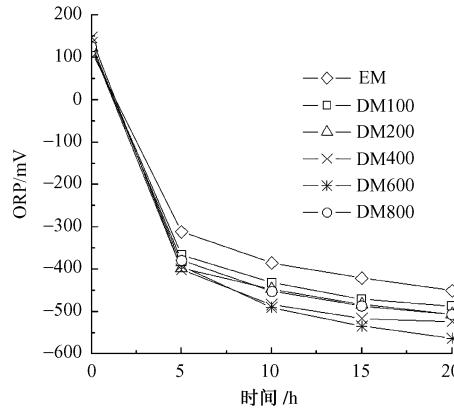


图5 不同浓度DM对ORP的影响

FIGURE 5 Effects of DM with different concentrations on ORP

### 2.3 不同浓度的DM对RB<sub>5</sub>污泥脱色的影响

已有研究表明,氧化还原介体能促进厌氧污泥中的多种微生物脱色。为了研究DM对微生物脱色作用的广谱性,考察了DM对厌氧污泥脱色的影响。DM对厌氧污泥脱色的影响(表1)与菌株W1类似,不同浓度的DM对脱色均有促进作用,且脱色速率随着DM浓度的提高而增大,加入DM800时5 h内脱色率达到52.85%,而空白只有15.25%。DM对厌氧污泥生长的作用为抑制效应(表2),DM浓度在DM400以下表现为轻微抑制,高于DM400则污泥生物量迅速下降。高浓度DM能获得更低的终ORP(表2),这可能与DM中的氧化还原介体有关。因为氧化还原介体能使还原当量更容易地从胞内转移到胞外,从而加速培养基中ORP下降。

表1 不同浓度DM对厌氧污泥脱色的影响

TABLE 1 Effects of DM with different concentrations on decolorization by sludge

时间/h	脱色率/%					
	EM	DM100	DM200	DM400	DM600	DM800
0	0	0	0	0	0	0
5	15.25	34.26	35.74	41.07	49.54	52.85
10	36.21	56.34	65.27	70.46	75.21	73.29
15	60.33	78.59	80.48	85.31	88.32	85.97
20	80.30	98.64	99.20	99.54	99.27	99.02

表2 不同浓度DM对厌氧污泥生物量和ORP的影响

TABLE 2 Effects of DM with different concentrations on biomass of sludge and ORP level

	EM	DM100	DM200	DM400	DM600	DM800
生物量/(mg·L <sup>-1</sup> )	1 630	1 570	1 580	980	642	454
终ORP/mV	-452	-440	-486	-520	-544	-547

### 2.4 DM的循环伏安特性

为了确定DM中氧化还原介体的存在及来源,分别对RB<sub>5</sub>、DM和EM进行循环伏安分析。RB<sub>5</sub>的

DM(图6)有一对可逆的氧化还原峰,其可逆氧化峰位于83 mV左右,可逆还原峰位于-220 mV左右,表明DM能够发生可逆的氧化还原反应,具有氧化还原介体的性质。因此,DM对脱色的促进作用很可能是通过氧化还原介体来完成的。RB<sub>5</sub>溶液(图7)在-500 mV到500 mV扫描范围内没有氧化还原峰出现,表明氧化还原介体不是来源于DM残余的RB<sub>5</sub>。另外,EM(图8)没有氧化还原峰出现,说明氧化还原介体非菌体自身产生的,而是来源于RB<sub>5</sub>的脱色产物。

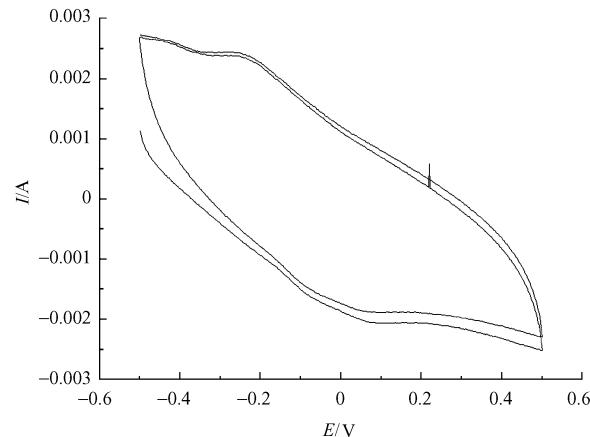


图6 DM200的循环伏安特性

FIGURE 6 Cyclic voltammogram of DM200

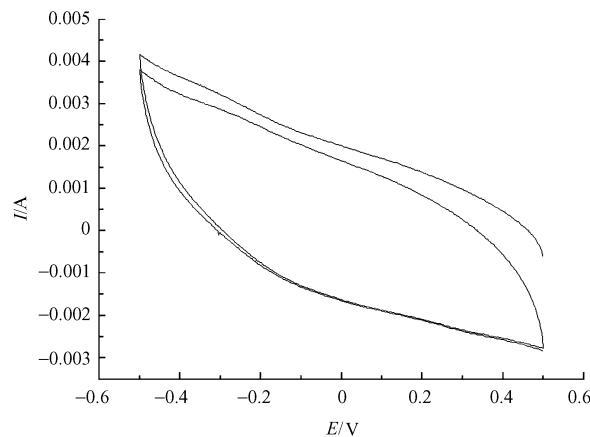


图7 RB<sub>5</sub>的循环伏安特性

FIGURE 7 Cyclic voltammogram of RB<sub>5</sub> solution

### 3 结论与讨论

1)RB<sub>5</sub>经菌株W1脱色生成的DM能够对RB<sub>5</sub>的脱色产生明显的促进作用。同时,RB<sub>5</sub>生成的DM也能促进菌株W1的生长。

2)不同浓度的DM均能够促进RB<sub>5</sub>的纯菌脱色,DM200对RB<sub>5</sub>脱色促进作用最明显。而DM对菌株W1生长的影响为:低浓度的DM促进生长,高浓度的DM抑制菌体生长。不同浓度的DM均引起培养液ORP迅速下降,其终ORP也低于空白,达到了-500 mV以下。

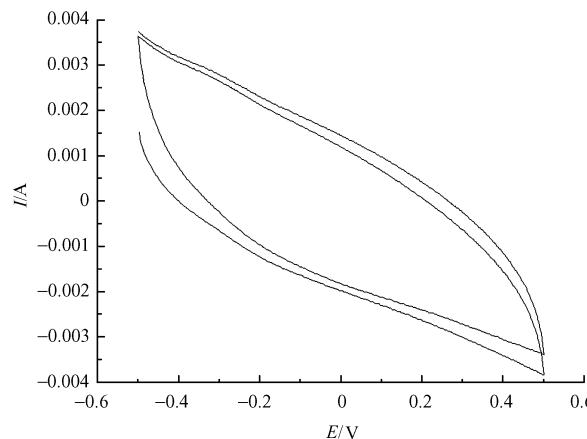


图8 EM的循环伏安特性

FIGURE 8 Cyclic voltammogram of EM

3)以污泥为脱色主体获得了与纯菌相似的脱色结果,说明RB5自催化脱色不仅限于脱色主体为W1,而很可能是RB5生物脱色中的普遍现象。

4)分别对RB5、DM和EM进行了循环伏安分析,结果表明,DM具有氧化还原介体的性质,可通过氧化还原介体的机制来加速偶氮染料的脱色。而RB5自身以及菌株W1基础代谢产生的EM无氧化还原介体性质,说明氧化还原介体来自RB5的脱色产物。

对于纺织偶氮染料的自催化,目前文献报道的有AO7和活性红2,未见有RB5自催化的报道。本实验的结果表明,RB5能够通过脱色产物促进自身的脱色,即偶氮染料RB5具有自催化脱色的性质。对于偶氮染料自催化的机制,到目前为止仍不十分清楚,在对AO7<sup>[13]</sup>和活性红2自催化的研究中,研究者推测偶氮染料的自催化是由于氧化还原介体的作用,但没有给出相应的证据。本实验通过对RB5脱色产物循环伏安的分析证明,RB5的脱色产物具有氧化还原介体的特性,由此可知,RB5自催化是通过氧化还原介体来实现的。在此过程中,RB5脱色形成的还原态介体与偶氮染料相作用,使偶氮键被还原,而自身转变为氧化态,氧化态介体再从菌体得

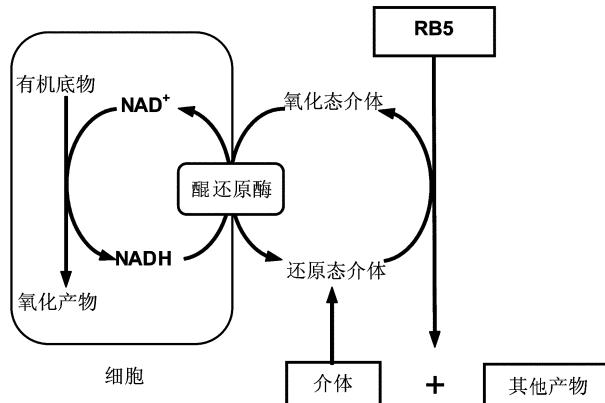


图9 推测的RB5脱色的自催化过程

FIGURE 9 Proposed process of autocatalysis in RB<sup>5</sup> decolorization

到电子重新生成还原态介体,继续还原偶氮染料,如此往复来提高偶氮染料的还原速率。推测的RB5自催化过程如图9所示。

## 参 考 文 献

- [1] STOLZ A. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 56(1-2): 69-80.
- [2] BROWN M A, DE VITO S C. Predicting azo dye toxicity[J]. *Crit Rev Environ Sci Technol*, 1993, 23(3): 249-324.
- [3] GHOSH D K, MANDAL A, CHAUDHURI J. Purification and partial characterization of two azoreductases from *Shigella dysenteriae* type 1[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1992, 77(1-3): 229-233.
- [4] MOUTAOUAKKIL A, ZEROUAL Y, DZAYRI F Z, et al. Purification and partial characterization of azoreductase from *Enterobacter agglomerans* [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2003, 413(1): 139-146.
- [5] RAFII F, CERNICLIA C E. An anaerobic non denaturing gel assay for the detection of azoreductase from anaerobic bacteria [J]. *J Microbiol Methods*, 1990, 12(2): 139-148.
- [6] RAFII F, COLEMAN T. Cloning and expression in *Escherichia coli* of an azoreductase gene from *Clostridium perfringens* and comparison with azoreductase genes from other bacteria[J]. *J Basic Microbiol*, 1999, 39(1): 29-35.
- [7] VAN DER ZEE F P, BISSCHOPS I A, BLANCHARD V G, et al. The contribution of biotic and abiotic processes during azo dye reduction in anaerobic sludge [J]. *Water Res*, 2003, 37(13): 3 098-3 109.
- [8] DUBIN P, WRIGHT K L. Reduction of azo food dyes in cultures of *Proteus vulgaris*[J]. *Xenobiotica*, 1975, 5(9): 563-571.
- [9] CERVANTES F J, VAN DER ZEE F P, LETTINGA G, et al. Enhanced decolourisation of acid orange 7 in a continuous UASB reactor with quinones as redox mediators [J]. *Water Sci Technol*, 2001, 44(4): 123-128.
- [10] KECK A, RAU J, REEMTSMA T, et al. Identification of quinoid redox mediators that are formed during the degradation of naphthalene-2-sulfonate by *Sphingomonas xenophaga* BN<sup>6</sup>[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(9): 4 341-4 349.
- [11] RAU J, KNACKMUSS H J, STOLZ A. Effects of different quinoid redox mediators on the anaerobic reduction of azo dyes by bacteria [J]. *Environ Sci Technol*, 2002, 36(7): 1 497-1 504.
- [12] KECK A, KLEIN J, KUDLICH M, et al. Reduction of azo dyes by redox mediators originating in the naphthalenesulfonic acid degradation pathway of *Sphingomonas* sp. strain BN<sup>6</sup> [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(9): 3 684-3 690.
- [13] VAN DER ZEE F P, LETTINGA G, FIELD J A. The role of (auto)catalysis in the mechanism of an anaerobic azo reduction[J]. *Water Sci Technol*, 2000, 42(5-6): 301-308.
- [14] COATES J D, COLE K A, CHAKRABORTY R, et al. Diversity and ubiquity of bacteria capable of utilizing humic substances as electron donors for anaerobic respiration [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(5): 2 445-2 452.
- [15] FIELD J A. Limits of anaerobic biodegradation [J]. *Water Sci Technol*, 2002, 45(10): 9-18.

(责任编辑 董晓燕)