

染料生物降解及其基因工程菌研究进展

杜翠红 周集体 黄丽萍 董晓丽 严 滨

(大连理工大学环境科学与工程学院 大连 116012)

摘要: 染料降解基因工程菌的构建是染料生物降解研究的重要任务之一, 它可以高效地除去废水中的常规生物难降解染料。文中综述了构建染料降解基因工程菌的基础研究进展, 主要包括: 染料降解菌的筛选、降解特性及酶系的研究、降解性质粒特性及基因定位的研究等等。

关键词: 染料, 生物降解, 基因工程菌, 质粒

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 04-0099-03

染料大多数是难以生物降解的芳香族化合物。随着染料工业、纺织工业、印染工业的发展以及染料品种和用量的日益增多, 染料废水已成为环境的主要污染源之一。用常规的废水处理方法难以有效去除。目前已筛选出多种微生物菌株可以降解不同类型的染料, 但一方面有些菌株难以适应处理环境, 而且繁殖速度慢, 分解染料的速度和效果难以达到预期目标; 另一方面, 有些菌株专一性太强, 不能满足降解多种染料混合物及其中间体的要求。因此, 有必要将降解性基因转入繁殖能力强和适应性能佳的受体菌株内, 或将降解各种染料的基因组合到同一菌株内, 构建出高效基因工程菌。

1 微生物对染料的降解性研究

染料的生物降解性研究是构建基因工程菌的前提和基础, 主要包括染料降解菌的筛选及其降解特性研究和染料降解机理及降解酶系的研究。

1.1 染料降解菌株的筛选及其降解性的研究 经过多年研究, 国内外学者已分离得到许多株对染料有降解活性的菌株。降解菌的类型从仅限于厌氧降解菌, 到近几年得到的好氧降解菌。可降解染料类型, 已从偶氮型染料, 到三苯甲烷型、蒽醌型及杂环结构染料。分离得到的微生物主要包括: 假单胞菌、芽孢杆菌、肠细菌和酵母菌等。

70年代末的研究发现, 某些肠道细菌可降解几种偶氮染料, 但它们大多只能在厌氧条件下不完全降解染料, 使其应用范围受到限制。1981年 Kulla 等^[1]分离到一株可利用偶氮染料作为唯一碳源的假单胞菌, 它可在有氧条件下完全降解偶氮染料, 但其专一性太强, 对于实际废水中的混合组分处理效果不理想。1990年 Cripps 等^[2]首先将白腐菌的木质素降解体系用于各种染料的降解实验, 发现它对染料的降解作用取决于染料的结构和真菌是否处于繁殖期。1992年 Spakaro 等^[3]对白腐菌的进一步研究表明: 这种菌可在有氧条件下彻底将一些偶氮染料矿化为二氧化碳和水。1999年金若菲等^[4]从蒽醌型染料中间体溴胺酸生产车间污口的污泥中筛选到一株以溴胺酸为唯一碳、氮源的菌株, 初步鉴定此菌为假单胞菌, 但该菌株对其他染料不具有降解能力, 说明其专一性太强, 不适合混合染料的废水处理。

1.2 染料降解机理及降解酶系的研究 染料降解机理的研究, 主要涉及染料分子中发色团的消失, 以及复杂多环芳烃分解为单环或简单多环芳烃(如萘环、蒽环等)。然

收稿日期: 2001-03-26, 修回日期: 2001-06-23

后,再按相应的单环或多环芳香族化合物的分解代谢途径进行彻底降解。而关于单环芳烃(如甲苯、联苯及多氯联苯等)和多环芳烃(如萘)的降解途径,已研究得比较清楚^[5]。因此,关于染料降解途径关键在于脱色机理和脱色关键酶的研究。

偶氮染料脱色的关键是偶氮键断裂形成无色的芳香胺,这一过程是由偶氮还原酶催化的。Zimmermann等^[6]从假单胞菌KF46中提纯了负责催化橙Ⅱ染料偶氮键断裂的橙Ⅱ偶氮还原酶,经过酶提纯、酶活力测定和酶作用条件的研究,发现它属于诱导酶,以NAD(P)H为电子传递体,此酶对底物的结构具有专一性。

在细菌降解蒽醌染料时,一般认为先要产生一种还原酶,催化还原裂解染料分子的共扼键,使其结构发生变化。Itoh^[7]经研究提出了C. I. 分散红15的一种可能的最初降解途径为氨基的脱除和破坏了分子的不饱和共扼键。作为蒽醌染料的主要原料,溴胺酸的微生物降解途径引起人们的关注。黄丽萍等^[8]人的研究表明:溴胺酸在微生物作用下有中间产物邻苯二甲酸生成,降解产物是一种溴代芳磺酸类化合物。

为了研究白腐菌对染料的降解机理,有人对其胞外过氧化酶系作了研究。发现该酶系可分为两大类:木质素过氧化酶和Mn-过氧化酶。其氧化染料的机理为:利用过氧化氢作为氧化剂,形成高氧化态的化合物I,化合物I通过一电子氧化染料,形成化合物II,然后氧化中间递体,回到原来的酶状态。

2 基因工程菌的构建

构建基因工程菌治理环境污染是环境生物工程高新技术中的前沿课题。其构建的基本过程为:一是目的基因片段的获得;二是目的基因的克隆和表达。实验证明^[9~11],微生物对染料降解的基因多数是位于降解性质粒上或由质粒所控制。因此,要想构建染料基因工程菌,首先需对其降解性质粒进行研究,然后分离出目的基因片段,将其与适当的载体连接后,转入受体菌中,从而得到基因工程菌。

2.1 染料降解性质粒的研究 关于染料降解性质粒的研究,只限于对质粒消除和质粒转化等特性的研究。1991年曹孟地等^[9]对偶氮染料脱色菌气单胞菌RD2菌株的脱色质粒进行了检测、消除及结合转化等实验,证明了RD2菌株的脱色遗传物质基础是由所含的脱色质粒控制的。1999年宋文华等^[10]从长期受染料废水污染的土壤中分离到两株脱色优势菌,它们对于偶氮染料及蒽醌染料有较好的脱色效果,经检测它们均含有质粒。经过质粒转化、转化子的检测及脱色能力表征,发现质粒的转化子获得了脱色能力,说明这两株菌的脱色是由其质粒控制的。1999年张波等^[11]也证明了光合细菌对活性艳红X-3B的降解性基因位于质粒上。关于染料降解性质粒的遗传结构及基因定位等方面,研究的并不多。但关于染料中间体如甲苯、联苯及萘等芳香烃的降解性质粒的遗传结构及基因定位已有详细报道^[5]。由此可以总结出降解性质粒的一些遗传规律,即质粒的基因结构分为结构基因和调节基因,基因的表达与调控机制符合操纵子模型。

2.2 目的基因片段的分离 获得目的基因片段的一般思路为:从细胞中分离出质粒或染色体,用适当的内切酶进行酶切,构建基因组文库,从中筛选出目的基因片段。筛选目的基因的方法主要有鸟枪法、分子杂交法和PCR技术。

鸟枪法是从供体基因组文库中直接分离目的基因常用的方法。这种方法是用限制性内切酶将供体DNA切成大量片段,再与以相同酶切后的载体连接后,转化受体细胞,最后从转化细胞中筛选出含有目的基因的转化子。1992年Khan等^[12]用鸟枪法从恶臭假

单胞菌中得到了降解 4-氯联苯的基因。1997 年刘振盈等^[13]采用分子杂交法从多能硫杆菌的基因库中筛选到了 RubisCO 基因片段。PCR 技术是根据降解酶的两端氨基酸序列设计引物,以基因组文库为模版,通过 PCR 技术扩增出目的基因。

2.3 目的基因的克隆与表达 构建降解性基因工程菌的一般步骤为:将目的基因片段与载体连接后,首先转入繁殖速度快的菌株(如大肠杆菌)中,使之得到克隆,然后通过质粒分离、酶切、凝胶电泳后,进行分离鉴定,最后将鉴定后的质粒转入目的菌株中,使目的基因得到表达,从而得到基因工程菌。因此,目的基因的克隆与表达关键在于穿梭质粒的构建,即质粒载体同时含有两个种属的复制起点,使目的基因可以在两个菌株间克隆和表达。1996 年 Afinsa 等^[14]构建了分枝杆菌与大肠杆菌的穿梭质粒 pSUM,用于克隆这些物种的目的基因。2000 年 Masayuki 等^[15]构建了光合细菌沼泽红假单胞菌和大肠杆菌的穿梭质粒 pMG103,用于基因工程菌的构建,实验证明该质粒也可用于其他几种光合细菌。

由于染料降解菌的降解质粒的遗传结构尚未得到充分研究,从而限制了染料基因工程菌的构建。但是,通过重组办法或新型育种技术构建高效降解芳香烃的新型微生物已有很多报道^[5]。从而为构建染料基因工程菌提供了科研思路:一种是“水平”方式扩展,即借助体内、体外遗传技术,通过应用从第二个微生物来的同工酶的引入来扩大微生物的降解范围;另一种是“垂直”方式扩展,即通过对一已存在的降解途径加入新的酶促步骤,以便新的酶将新底物分解到已知生化途径中。

3 结束语

综上所述,关于染料基因工程菌的构建,已作了大量的基础研究。但关于降解质粒的遗传结构和目的基因定位等方面的工作还有待于进一步开展。不过,其他芳香烃的降解质粒的遗传结构已作了大量工作,这就为我们进一步开展染料降解菌基因工程方面的研究提供了基础和方法。随着基因工程技术的发展和染料降解菌的进一步研究,在不久的将来将会出现许多染料基因工程菌,为彻底净化环境作出贡献。

参 考 文 献

- [1] Kulla H G. Microbial Degradation of Xenobiotics and Recalcitrant Compounds. London: Academic Press, 1981. 387 ~ 399.
- [2] Cripps C, John B, Steven D A. Appl Environ Microbiol, 1990, 56: 1114 ~ 1118.
- [3] Spadaro J T, Michael H G, Renganathan V. Appl Environ Microbiol, 1992, 58: 2397 ~ 2401.
- [4] 金若菲,王 竟,张劲松,等.环境科学研究,1999, 12 (6): 32 ~ 35.
- [5] 杨永华,华晓梅,陈素玲,等.环境科学进展,1995, 3 (6): 31 ~ 43.
- [6] Zimmermann T. Eur J Biochem, 1982, 129: 197 ~ 203.
- [7] Itoh K, Kitade Y, Yatome C. Bull Environ Contam Toxicol, 1996, 56: 413 ~ 418.
- [8] 黄丽萍,周集体,杨凤林,等.大连理工大学学报,2000, 40 (5): 557 ~ 561.
- [9] 曹孟德,王孔星,简浩然.中国环境科学,1991, 11 (5): 348 ~ 351.
- [10] 宋文华,颜 慧,胡国臣,等.环境化学,1999, 18 (3): 263 ~ 269.
- [11] 张 波,张素蓉.城市环境与城市生态,1999, 12 (1): 13 ~ 15.
- [12] Khan A, Walia S. Appl Environ Microbiol, 1992, 55 (4): 798 ~ 805.
- [13] 刘振盈,颜望明,徐海岩,等.微生物学通报,1997, 24 (2): 99 ~ 103.
- [14] Afasa J A, Martin C, M Cabeza, et al. Gene, 1996, 176: 23 ~ 26.
- [15] Masayuki I, Jung H R, Kenneth Z, et al. Appl Environ Microbiol, 2000, 66 (1): 54 ~ 63.