

假单胞杆菌 BC001 对吡啶和喹啉的生物去除

柏耀辉 孙庆华 温东辉[†] 唐孝炎

北京大学环境科学与工程学院,北京 100871; [†]通讯作者, E-mail: dhwen@pku.edu.cn

摘要 从首钢焦化厂废水处理系统的活性污泥中分离出 1 株能在高浓度的吡啶(约 400 mg/L)和喹啉(约 500 mg/L)双基质条件下良好生长的细菌,经 16S rDNA 及生理形态特征鉴定为假单胞杆菌(*Pseudomonas* sp. BC001),它对吡啶的去除主要通过生物吸附,而对喹啉的去除包括生物吸附和降解两个阶段。该菌能利用喹啉作为唯一的碳源和氮源代谢生长,适量的外加碳源对喹啉降解具有促进作用,经检测喹啉降解的中间产物主要为 2-羟基喹啉和 8-羟基香豆素,氮的主要代谢终产物为 NH_4^+ 。

关键词 吡啶; 喹啉; 假单胞杆菌; 生物吸附; 生物降解

中图分类号 X172

Biological Removal of a Bacterial Strain *Pseudomonas* sp. BC001 on Pyridine and Quinoline

BAI Yaohui, SUN Qinghua, WEN Donghui[†], TANG Xiaoyan

College of Environmental Science and Engineering, Peking University, Beijing 100871;

[†]Corresponding Author, E-mail: dhwen@pku.edu.cn

Abstract An aerobic Gram-negative bacterium BC001 was isolated from the activated sludge in the coking wastewater treatment plant of Capital Iron and Steel Corporation and identified as *Pseudomonas* sp. according to 16S rDNA gene sequence analysis and physiological characters. The strain grew well in the high concentrated substrates of pyridine (about 400 mg/L) and quinoline (about 500 mg/L). For pyridine, the biological removal was only by biosorption, while for quinoline, it included two phases of biosorption and biodegradation. The strain could utilize quinoline as its sole carbon source and nitrogen source, and the biodegradation would be promoted by external carbon source with proper dosage. Main intermediate products in the metabolic pathway of quinoline were detected as 2(1H)-quinolinone and 8-hydroxycoumarin, and NH_4^+ was confirmed to be the final nitrogen metabolic product.

Key words pyridine; quinoline; *Pseudomonas* sp.; biosorption; biodegradation

目前工业生产每天都产生和排放大量的芳香族化合物,这其中大约有 2/3 都是杂环化合物^[1]。杂环化合物被广泛应用于工业溶剂、染料、炸药、医药及农药等领域^[2]。吡啶、喹啉是两种典型的含氮杂环化合物,常见于焦化废水、炼油废水、农药废水等,具有较大的刺激性气味、毒性、致癌性及致畸性,对人类、动植物及环境都具有很大危害,由于它们对大多数微生物具有毒害作用,因此都属于难生物降解

的有机物。利用生物强化技术处理杂环难降解有机物成为目前研究的热点之一,该技术向废水处理系统中投加特异性降解菌株,可以在不改造现有处理设施的基础上,提高污水处理的范围和能力^[3];但是,由于该方法中微生物的作用机制难以掌控,一些生物强化系统的处理效果并不理想,有的甚至是完全失败的^[4]。因此进一步研究微生物的作用机理及代谢过程显得尤为重要。在以往的研究中,发现特

国家“863”计划探索导向类课题(2006AA06Z336)和北京市自然科学基金(8073028)资助项目

收稿日期: 2007-02-11; 修回日期: 2007-05-21

异性降解吡啶的细菌主要包括 *Bacillus coagulans*^[5], *Nocardioides* sp.^[6], *Pimelobacter* sp.^[7], *Pseudomonas putida*^[8], *Pseudomonas* sp.^[9] 等; 降解喹啉的细菌主要包括 *Pseudomonas stutzeri*^[10], *Rhodococcus* sp.^[11], *Burkholderia pickettii*^[12], *Comamonas* sp.^[13] 等。另外, 白腐真菌对吡啶、喹啉也有一定的降解功能^[14,15]。上述研究主要集中在单基质条件下微生物的降解过程及代谢途径, 而对双基质条件下尤其是吡啶、喹啉含量都较高时, 微生物的生长及生物去除方式研究较少。另外, 关于喹啉代谢途径的研究虽然很多, 研究者也提出了各种可能^[2,16-18], 但仍然没有得出定论, 并且很少提到氮的转化途径。

由于假单胞菌能利用很多有机物作为自身生长繁殖所需的碳源和能源, 因此在环境微生物中占有重要的地位。本研究从首钢焦化厂废水处理系统的活性污泥中分离出 1 株假单胞杆菌 (*Pseudomonas* sp.), 对其在高浓度吡啶、喹啉的基质条件下的生物去除及对喹啉的微生物降解途径进行了实验研究, 为以后进行生物强化实验及降解基因的获取提供了良好的生物材料及其特性参数。

1 材料与方法

1.1 活性污泥的驯化

从首钢焦化厂废水处理系统中取活性污泥样本, 在用多层纱布封口的容器中进行间歇性曝气。定期加入适量吡啶、喹啉以及焦化废水原水, 以强化可能存在的降解菌的降解能力和多样性, 同时加入磷酸盐缓冲液以及微量元素溶液, 以保证正常代谢活动所需要的 pH 值和必要成分。驯化共进行了 40 天。

1.2 菌种的富集、分离及纯化

取 100 mL 驯化后的活性污泥于 250 mL 锥形瓶中, 加入 0.01% 的焦磷酸钠及数粒玻璃珠, 在 30 °C, 180 r/min 摆床下振荡 30 min 以充分混匀, 取出后在 5000 r/min 下离心 10 min。将沉淀混匀至 100 mL 含吡啶 200 mg/L, 喹啉 200 mg/L 的无机盐培养基(每 L 培养基含 4.26 g Na₂HPO₄, 2.65 g KH₂PO₄, 0.2 g MgSO₄·7H₂O, 0.02 g CaCl₂, 0.0012 g MnSO₄·H₂O, 以及 1 mL 微量元素溶液)^[12], 在 30 °C, 180 r/min 摆床下振荡培养 5 天; 移取 5 mL 菌悬液至 100 mL 含吡啶 300 mg/L, 喹啉 300 mg/L 的无机盐培养基, 在 30 °C, 180 r/min 摆床下振荡培养 4 天。取 0.1 mL 菌悬液转至含 1.9% 琼脂的无机盐固体培养基, 涂布稀释分离, 再经平板

划线分离纯化, 由此分离出 1 株能在吡啶、喹啉双基质下生长的细菌, 命名为 BC001。

1.3 菌种的 16S rDNA 鉴定

以 TIANGEN 细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 BC001 的基因组 DNA, 根据文献[19]设计引物进行 PCR 片断基因扩增。引物序列为 27F: 5' AGAG TTTGATCATGGCTCAG 3'; 1492R: 5' TACGGTTACCTT GTTACGACTT 3'。PCR 设定程序为: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 最后 72 °C 终延伸 15 min, 4 °C 保存。经切胶回收纯化 PCR 产物后, 送至 TIANGEN 公司测序。测序结果通过 GenBank 的 BLAST 进行同源性比对。

1.4 降解实验方法

向 100 mL LB 液体培养基^[20] 加入吡啶、喹啉各 0.05 mL 防止杂菌的侵入及保持菌生长活力, 富集培养。菌液离心, 液体无机盐培养基洗涤 3 次以去除表面杂质, 再转移至液体无机盐培养基, 制备成菌悬液。各取 10 mL 菌悬液加入 3 个 90 mL 以吡啶、喹啉及吡啶加喹啉作为唯一的碳源和氮源的液体无机盐培养基中, 封口膜密封, 在 30 °C, 180 r/min 的摇床中振荡培养。每隔一定时间取少量样品用 0.45 μm 的滤膜过滤后进行分析测定。设 3 个未加菌的灭菌培养基, 进行同等条件下的空白对照实验。外加碳源实验是在无机盐培养基中加入一定比例的葡萄糖后进行的, 同时为了缩短抑制期的时间, 取 1 mL 上述菌悬液转入 100 mL 含有 400 mg/L 吡啶及 500 mg/L 喹啉的无机盐培养基进行培养, 然后取一定量新鲜培养液转入含有葡萄糖、吡啶、喹啉的无机盐培养基进行降解实验, 同时设未外加碳源的对照实验。

1.5 分析方法

吡啶及喹啉浓度通过高效液相色谱(岛津 LC10AD_{VP}, SPD10A_{VP} UV-Vis Detector; Diamonsil C₁₈ 色谱柱, 250 × 4.6 mm, 5 μm)测定。流动相为 V_{甲醇}:V_水 = 4:1, 流速为 1 mL/min; 吡啶检测波长为 254 nm; 喹啉检测波长为 275 nm(高浓度)和 230 nm(低浓度), 进样体积均为 10 μL。

菌体浓度通过岛津 UV2401 型紫外可见分光光度计测定, 吸收波长为 602 nm, 投菌量通过干重法测定。

喹啉降解过程中, 在不同时间取样, 样品经 0.45 μm 滤膜过滤后, 再经二氯甲烷等体积萃取, 用预先烘干的无水硫酸钠过滤后, 在 GC/MS(Agilent 6890N GC/5973 MSD, DB-5MS 毛细管柱, 30 m ×

0.25 mm × 0.25 μm) 上进行中间产物的定性分析。色谱柱升温程序为: 初始温度为 40 °C, 保持 2 min, 以 5 °C/min 的速度升温至 250 °C, 保持 5 min, 继续升温至 280 °C, 保持 2 min。离子源温度为 200 °C, 电子能量为 70 eV。

不同降解时间段, 样品溶液中 NH_4^+ 的浓度用 Ammonium test kit QUANTOFIX (Sigma-Aldrich, Germany) 测定。

2 结果与讨论

2.1 BC001 鉴定结果

通过显微镜观察 BC001 的形态特征并经革兰氏染色, 确定其为 1 株杆状、革兰氏阴性细菌。测定该菌的 16S rDNA 基因序列, 经 BLAST 同源性对比, 发现其与 *Pseudomonas* sp. OCR7 (AB240203) 的同源性在 99% 以上。综合上述生理形态特征及 16S rDNA 鉴定结果, 确定该菌为假单胞杆菌 (*Pseudomonas* sp.)。

2.2 BC001 对吡啶和喹啉的生物去除

在吡啶、喹啉单基质以及吡啶和喹啉双基质条件下, 考察 BC001 对 2 种杂环化合物的生物去除, 接种量均为 0.062 g/L, 实验结果如图 1 及图 2 所示。

从图 1(a)可以看出, BC001 对吡啶的去除主要是生物吸附作用, 并且在短时间内完成, 随着时间的推移, 吸附量逐渐趋于稳定。同时可以推断吡啶自身所含的碳氮源不能直接被 BC001 所利用; 从图 1(b)中可以看出 BC001 对喹啉的去除主要经过两个阶段: 生物吸附及生物降解。初期吸附后, 微生物生长进入停滞期, 停滞期的产生主要是由于 BC001 从 LB 培养基转入到含有喹啉的无机盐培养基, 需要适应新的可利用的碳、氮源及一个新的生长环境。因此, 这段时间, 微生物生长速度很慢。停滞期大约需要 9 h; 此后进入微生物降解阶段, 喹啉的降解速率很快, 其浓度几乎呈直线性下降, 菌的生长也同时进入对数期; 大约在 20.5 h 后, 99.9% 的喹啉被降解。说明 BC001 在好氧条件下能以喹啉作为唯一的碳源和氮源。

从图 2 可以看出, BC001 在吡啶和喹啉双基质条件下, 对吡啶的去除还是通过生物吸附, 对喹啉的去除仍包括生物吸附及生物降解两个阶段, 说明 BC001 对吡啶、喹啉的去除作用机理并未发生变化。

对比图 2 及图 1(a), 尽管 BC001 在不同基质下对吡啶的去除同为生物吸附, 但去除量及趋势有所不同。

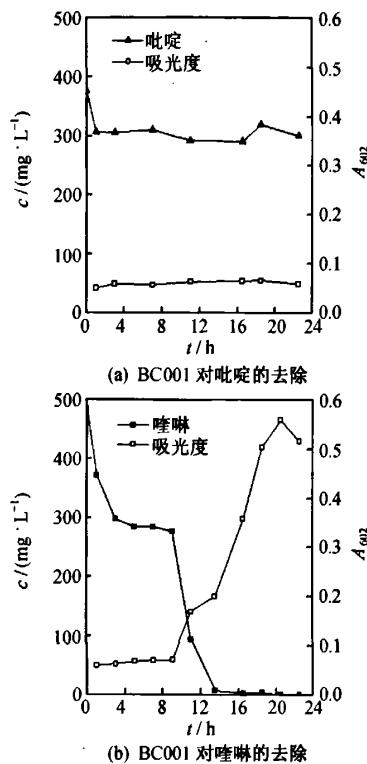


图 1 吡啶、喹啉单基质条件下 BC001 的生物去除
Fig. 1 Bio-removal of *Pseudomonas* sp. BC001 on single substrate of pyridine or quinoline

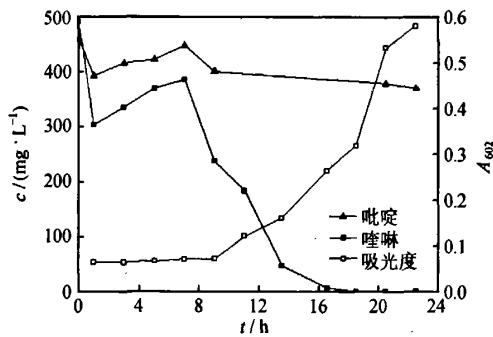


图 2 吡啶和喹啉双基质条件下 BC001 的生物去除
Fig. 2 Bio-removal of *Pseudomonas* sp. BC001 on two substrates of pyridine and quinoline

不同。由于在吡啶单基质条件下, BC001 并没有生长, 生物吸附主要发生在初期阶段; 而在双基质条件下, 生物吸附过程不仅包括初期阶段的吸附, 同时还包括微生物生长期时的生物吸附, 这是因为 BC001 能利用另一种基质——喹啉作为碳氮源进行生长, 因此, 随着菌体密度的增加, 吡啶的吸附量逐渐增大, 这和单基质条件下吡啶浓度趋于平衡有所不同。

对比图 2 及图 1(b), 在双基质条件下, 吡啶的

存在并没有延长 BC001 的生长停滞期的时间。这说明在双基质条件下, 吡啶的存在没有明显“干扰” BC001 对喹啉这个新的可利用的碳氮源的适应。因此, 在双基质条件下与单基质条件下, 停滞期的长短主要取决于 BC001 对新的可利用的碳氮源的适应时间长短。而吡啶在停滞期时只是扮演了一个碳氮源不可利用的“杂质”角色。但当 BC001 进入生长期时, 吡啶的存在对喹啉的生物去除及 BC001 的生长都有一定的抑制作用, 这主要体现在两方面: 首先, 从降解的速率来看, 单基质条件下去除 98.4% 的喹啉需要 13.5 h, 而双基质条件下同样去除 98.4% 的喹啉则需要 16.5 h; 其次, 对比相同时间段菌体密度的大小可以发现, 当微生物生长进入对数期后, 单基质条件下的微生物生长速度总是比双基质时的生长速度快。这与文献[21]报道的瓦呼吸仪测定结果基本相同。这说明在双基质条件下, 吡啶由于自身的毒性对 BC001 的生长造成了一定的影响, 使其不能有效地利用喹啉中的碳氮源, 从而造成喹啉的降解速率及微生物生长速率在一定程度上的下降。而这时, 吡啶的角色从“杂质”转换成“抑制剂”。

2.3 外加碳源对喹啉生物降解的影响

吡啶本身的碳氮比为 4.3:1, 喹啉本身的碳氮比为 7.7:1, 均不能满足(20~30):1 的微生物生长的最佳碳氮比, 因此可向培养基中加入易于被微生物利用的碳源, 考察能否产生协同作用而促使微生物利用吡啶或促进喹啉的生物降解。实验选择葡萄糖为外加碳源, 吡啶、喹啉基质的起始浓度约为 400 和 500 mg/L 左右, 接种量均为 0.14 g/L。

实验发现: 在吡啶单基质条件下以及吡啶与喹啉共存的双基质条件下, 不同的葡萄糖投加量均不能促使 BC001 降解吡啶, 因此, 可以确定吡啶本身的碳氮源在有外加碳源的情况下仍然不能被 BC001 所利用。

以吡啶与喹啉共存的双基质条件下, 外加碳源对喹啉生物降解的影响如图 3 所示。

外加 2.0 g/L 葡萄糖使原双基质体系中可利用的碳氮源比例提高到 21:1, 经过初期吸附后, 喹啉的降解速率明显比不加葡萄糖的降解速率快, 8 h 后 98.9% 的喹啉可以被 BC001 降解, 而在不加葡萄糖的双基质条件下, 喹啉降解需要近 17 h。外加 5.8 g/L 葡萄糖使原双基质体系中可利用的碳氮源比例进一步提高到 46:1, 在初期的生物吸附之后, 从总体上看, 喹啉的降解速率反而比不加葡萄糖的降解速率

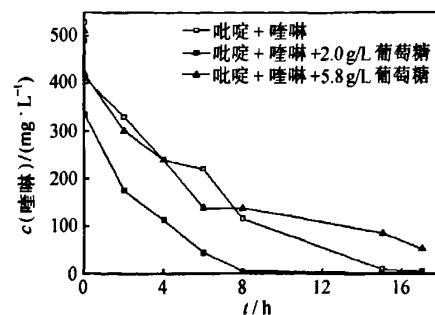


图 3 双基质条件下外加碳源对喹啉生物降解的影响

Fig. 3 The effect of external carbon source on quinoline biodegradation in two substrates

慢。这些实验结果说明: 适量的外加碳源能使微生物生长可利用的碳氮源达到较好的比例, 从而对喹啉的降解具有促进作用, 这与文献[22]报道的结果相同; 但是过多的外加碳源则会抑制喹啉的降解, 这是因为一方面相对过量的外加碳源使得微生物不能有效利用氮源, 另一方面相对过量的碳源在微生物的生长和代谢过程中可能使得溶液体系的 pH 值产生变化(如酸化)或产生了其他代谢产物, 从而使微生物的生长和代谢受到一定程度上的抑制。

此外, 对比图 3 和图 2 可以发现, 由于采用新鲜的无机盐培养液作为接种液, 同时增加了接种量, 生物降解的抑制时间大大缩短; 这说明细菌抑制期的长短主要取决于接种量、菌自身的活力以及基质条件等综合因素。

2.4 喹啉生物降解的中间产物及终产物

在以 HPLC 测定吡啶浓度的过程中, 没有发现非吡啶的“杂质峰”, 这也从侧面说明了 BC001 对吡啶只是生物吸附而没有生物降解; 但在以 HPLC 测定喹啉浓度的过程中, 发现有其他物质的峰, 估计为喹啉降解的中间产物峰。因此, 可通过 GC/MS 对 BC001 的代谢途径做进一步的分析。

经过多次对不同时间段喹啉降解产物的 GC/MS 分析, 确定了生物降解的主要中间产物 BC001 降解喹啉的中间产物的质谱图及所对应有机物的标准谱图, 如图 4 和图 5 所示。

检测发现 BC001 降解喹啉的两种中间产物分别为 2-羟基喹啉(图 4)及 8-羟基香豆素(图 5), 与标准谱图的相似度都在 90% 以上, 这与以往研究假单胞菌降解喹啉的中间产物是相同的^[10,23], 同时 2-羟基喹啉也出现在皮氏伯克霍尔德氏菌^[21]降解喹啉的中间产物中。

BC001 降解喹啉过程中, 对 NH_4^+ 浓度的监测结

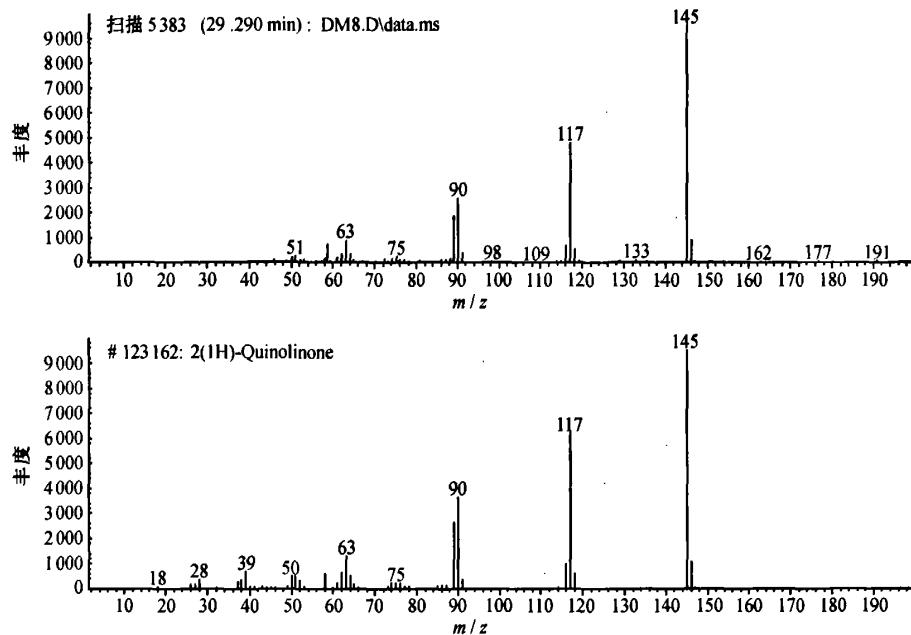


图4 喹啉降解中间代谢产物1
Fig.4 Intermediate metabolite 1 of quinoline biodegradation

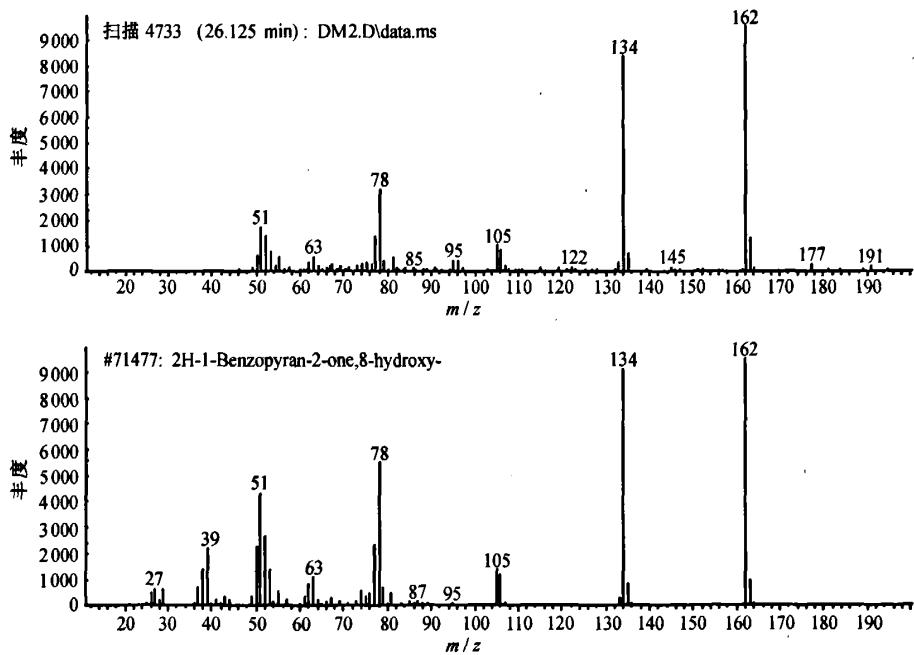
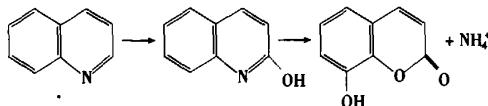


图5 喹啉降解中间代谢产物2
Fig.5 Intermediate metabolite 2 of quinoline biodegradation

果发现:随着喹啉浓度的不断降低, NH_4^+ 的浓度不断升高, 最后达到一个稳定的数值。这时, 喹啉已被降解完全, 估算氮转化率在 50% 以上。监测结果表

明降解过程中, 喹啉中的氮除了一部分用于维持微生物正常的生长需求外, 其余部分大多被转化为 NH_4^+ 。因此, 推断 BC001 对喹啉的部分降解途径为:



3 结论

1) 经 16S rDNA 鉴定、生理形态观察及革兰氏染色, 表明由首钢焦化活性污泥中分离得到的 BC001 菌株属于假单胞杆菌(*Pseudomonas* sp.), 革兰氏阴性菌。

2) BC001 对吡啶的生物去除主要是生物吸附, 而对喹啉的生物去除包括生物吸附和生物降解, 即该菌在好氧条件下可以喹啉为唯一的碳源和氮源生长; 在吡啶和喹啉共存的双基质条件下, BC001 对喹啉的降解速率相比于单基质条件下有所降低。

3) 适量的外加碳源能提高双基质条件下喹啉的生物降解速率, 但过量的外加碳源则对降解有一定的抑制。

4) 经 GC/MS 检测, BC001 降解喹啉的中间产物主要有 2-羟基喹啉和 8-羟基香豆素。 NH_4^+ 浓度监测发现喹啉中的部分氮转化为 NH_4^+ 。

致谢 本研究工作得到北京大学生命科学院李毅教授、北京未名凯拓农业生物技术有限公司的夏勉老师的指导以及曹小近、王丽英、乔琳和沙圣德等同学的帮助, 在此表示衷心的感谢。

参考文献

- [1] Ronen Z, Bollag J M. Biodegradation of pyridine and pyridine-derivatives by soil and subsurface microorganisms. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 1995, 59 (2-4): 133-143
- [2] Kaiser J P, Feng Y, Bollag J M. Microbial metabolism of pyridine, quinoline, acridine, and their derivatives under aerobic and anaerobic conditions. *Microbiol Rev*, 1996, 60 (3): 483-498
- [3] 甘丽华, 吴昊, 郭树凡. 生物强化技术在环境治理中的应用. 中国环保产业, 2005, (5): 37-39
- [4] 全向春, 刘佐才, 范广裕, 等. 生物强化技术及其在废水治理中的应用. 环境科学研究, 1999, 12 (3): 22-27
- [5] Uma B, Sandhya S. Pyridine degradation and heterocyclic nitrification by *Bacillus coagulans*. *Can J Microbiol*, 1997, 43 (6): 595-598
- [6] Rhee S K, Lee K Y, Chung J C, et al. Degradation of pyridine by *Nocardoides* sp. strain OS4 isolated from the oxic zone of a spent shale column. *Canadian Journal of Microbiology*, 1997, 43 (2): 205-209
- [7] Rhee S K, Lee G M, Lee S T. Influence of a supplementary carbon source on biodegradation of pyridine by freely suspended and immobilized *Pimelobacter* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1996, 44 (6): 816-822
- [8] Kim M K, Singleton I, Yin C R, et al. Influence of phenol on the biodegradation of pyridine by freely suspended and immobilized *Pseudomonas putida* MK1. *Lett Appl Microbiol*, 2006, 42 (5): 495-500
- [9] Mohan S V, Sistla S, Guru R K, et al. Microbial degradation of pyridine using *Pseudomonas* sp. and isolation of plasmid responsible for degradation. *Waste Manag*, 2003, 23 (2): 167-171
- [10] Shukla O P. Microbiological degradation of quinoline by *Pseudomonas stutzeri*: The coumarin pathway of quinoline catabolism. *Microbios*, 1989, 59 (238): 47-63
- [11] O'Loughlin E J, Kehrmeyer S R, Sims G K. Isolation, characterization, and substrate utilization of a quinoline-degrading bacterium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 1996, 38 (2): 107-118
- [12] Wang J L, Wu W Z, Zhao X. Microbial degradation of quinoline: Kinetics study with *Burkholderia picketti*. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2004, 17 (1): 21-26
- [13] 崔明超, 李丽, 陈繁忠, 等. 噻丸酮丛毛单胞菌对喹啉的微生物降解途径的研究. 环境科学学报, 2004, 24 (1): 171-173
- [14] 任大军, 张晓昱, 颜克亮, 等. 白腐菌对焦化废水中喹啉的降解及机理研究. 环境保护科学, 2006, 32 (1): 20-23
- [15] 任大军, 颜克亮, 刘延杰, 等. 白腐菌在固体培养基下对吲哚和吡啶的降解. 环境污染与防治, 2006, 28(9): 658-661
- [16] Sugaya K, Nakayama O, Hinata N, et al. Biodegradation of quinoline in crude oil. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2001, 76 (6): 603-611
- [17] Grant D J, Al-Najjar T R. Degradation of quinoline by a soil bacterium. *Microbios*, 1976, 15 (61-62): 177-189
- [18] Carl B, Arnold A, Hauer B, et al. Sequence and transcriptional analysis of a gene cluster of *Pseudomonas putida* 86 involved in quinoline degradation. *Gene*, 2004, 331: 177-188
- [19] Devereux R, Wilkinson S S. Amplification of ribosomal RNA sequences. *Molecular Microbial Ecology Manual*, Second Edition. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2004: 509-522
- [20] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 黄培堂, 等译. 分子克隆实验指南. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002: 1595
- [21] 韩力平. 生物强化技术处理难降解有机物喹啉的研究. 北京: 清华大学, 2000
- [22] 全向春, 王建龙, 韩力平, 等. 喹啉与葡萄糖共基质条件下生物降解的动力学分析. 环境科学学报, 2001, 21 (4): 416-419
- [23] Kilbane J J II, Ranganathan R, Cleveland L, et al. Selective removal of nitrogen from quinoline and petroleum by *Pseudomonas ayucida* IGBTN9m. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66 (2): 688-693