

Shinella zoogloeoides BC026 对吡啶的降解特性研究

孙庆华^{1,2}, 柏耀辉², 赵翠², 温东辉^{2*}, 唐孝炎²

(1. 北京大学深圳研究生院环境与城市学院, 深圳 518055; 2. 北京大学环境科学与工程学院, 北京 100871)

摘要: 从首钢焦化厂的污水处理系统中分离 1 株能以吡啶为唯一碳、氮源的细菌 BC026, 它具有自絮凝特性, 对卡那霉素、氨苄青霉素和壮观霉素具有抗性, 可在阿须贝无氮培养基中良好生长. 通过 16S rRNA 序列分析和 Biolog 微生物鉴定系统鉴定, 确定该菌为 *Shinella zoogloeoides*. 纯菌对单基质的降解实验表明, 在 30℃、180 r/min 和 pH 为 7 的条件下, 当投菌量为 0.1 g/L 时, BC026 可在 17 h 内将 400 mg/L 吡啶完全降解; 在吡啶初始浓度为 99~1 806 mg/L 的无机盐培养基中, BC026 均能保持降解活性, 较高初始浓度的吡啶对 BC026 的生长产生一定抑制, 但 BC026 在适应后对吡啶的降解速率较快; 降解最适温度为 30~35℃, 最适 pH 为 8. BC026 对吡啶的代谢途径研究表明: 降解的第一步是断开吡啶的 2 条 C—N 键, 生成氨氮和戊二醛, 随后戊二醛被氧化为戊二酸, 并最终转化为二氧化碳和水; 吡啶中的氮有 59.5% 转化成氨氮.

关键词: *Shinella zoogloeoides*; 吡啶; 生物降解; 氮转化; 代谢途径

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3301(2008)10-2938-06

Biodegradation of Pyridine by *Shinella zoogloeoides* BC026

SUN Qing-hua^{1,2}, BAI Yao-hui², ZHAO Cui², WEN Dong-hui², TANG Xiao-yan²

(1. College of Environmental and Urban Science, Shenzhen Graduate School, Peking University, Shenzhen 518055, China; 2. College of Environmental Sciences and Engineering, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: A bacterial strain BC026 capable of utilizing pyridine as its sole source of carbon and nitrogen was isolated from the activated sludge in a coking wastewater treatment plant. The bacterium featured flocculability and antibiotic resistance to kanamycin, ampicillin and spectinomycin. It could grow well in Ashby nitrogen free culture medium. The strain was identified as *Shinella zoogloeoides* according to the results of 16S rRNA sequence analysis and Biolog microbial identification system. The experiments of pyridine biodegradation by the pure culture showed that pyridine of 400 mg/L could be degraded completely in 17 h under the condition of inoculum 0.1 g/L, 30℃, 180 r/min and pH 7. BC026 could keep high degradative activity in mineral salt medium containing pyridine with a concentration ranging from 99 mg/L to 1 806 mg/L. Higher initial concentration of pyridine caused repression on BC026 to a certain extent, however, the degradation rate became faster after the strain had been accommodated. The optimal conditions for the degradation were 30-35℃ and pH 8. The research on metabolic pathway of pyridine by BC026 indicated that the first step of pyridine degradation was C—N bonds cleavage, generating NH₄⁺ and glutaraldehyde. Then glutaraldehyde was oxidized into glutaric acid, and finally into CO₂ and H₂O. 59.5% nitrogen from pyridine was transferred into ammonium in the whole degradation.

Key words: *Shinella zoogloeoides*; pyridine; biodegradation; nitrogen transformation; metabolic pathway

杂环芳烃大多是由人类活动产生的, 是一类易在生物体内富集、高稳定性、有毒有害的化合物^[1]. 吡啶是目前杂环芳烃中开发与应用范围最广的品种之一, 是重要的工业原料, 也是一种致癌、致畸、致突变的环境污染物^[2], 对生态环境以及人体健康具有潜在危害. 很多行业排放的废水中都含有吡啶, 例如制药、染料、杀虫剂和除草剂、石化、食品加工以及焦化行业^[3], 用生物强化法处理上述工业废水具有诸多优势, 已成为研究热点^[4], 但其前提是获得高效稳定的降解菌. 自 20 世纪 70 年代, 研究人员陆续分离到一些吡啶降解菌株, 其中大部分是细菌, 如假单胞菌属 (*Pseudomonas*)^[5-7]、节杆菌属 (*Arthrobacter*)^[8,9]、戈登氏菌 (*Gordonia nitida*)^[10]、假诺卡氏菌属 (*Pseudonocardia* sp.)^[6]、凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*)^[11]、脂肪杆菌属 (*Pimelobacter* sp.)^[12]、混浊

红球菌 (*Rhodococcus opacus*)^[13]、黄杆菌属 (*Flavobacterium*)^[14]、普通变形杆菌 (*Proteus vulgaris*)^[15]、芽孢杆菌 (*Bacillus*)^[15]、嗜吡啶红球菌 (*Rhodococcus pyridinivorans* nov.)^[16] 等, 也有放线菌和真菌, 如嗜盐放线菌 (*Nocardioides* sp.)^[16] 和白腐真菌^[17]. 在此基础上, 研究者通过共代谢^[12,13]、细胞固定化^[12,18]等方式, 使降解菌的降解能力得到更好地发挥. 然而在吡啶降解机制及代谢途径的探索, 一直缺乏有力的证据, 没有形成成熟的理论^[19], 因此, 目前对吡啶中有机碳、杂原子氮的转化尚无明确结论.

收稿日期: 2007-10-08; 修订日期: 2007-11-24

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (2004AA649090, 2006AA062336)

作者简介: 孙庆华 (1984~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为环境生物技术, E-mail: shiyue1001@yahoo.cn

* 通讯联系人, E-mail: dhwen@pku.edu.cn

本研究从焦化废水处理系统中分离出 1 株高效吡啉降解菌 *Shinella zoogloeoides* BC026, 且该菌具有自絮凝特性, 目前国际上对该种属细菌的研究很少, 鲜见其降解吡啉的报道. 因此, 研究该菌株对吡啉的降解特性与代谢途径, 将为含吡啉类废水的生物强化处理提供新菌株材料及其基本特性参数.

1 材料与方法

1.1 菌种分离及培养

取首钢焦化厂污水处理系统二沉池回流污泥. 在装有污泥样本的容器中滴加少量吡啉, 用多层纱布封口, 间歇曝气, 定期补充原焦化废水及吡啉, 保持微生物的生长活性并强化其降解能力. 同时加入磷酸盐缓冲液以及微量元素溶液, 驯化 60 d.

取 200 mL 驯化培养液于三角瓶中, 加入 2 滴 0.01% 的焦磷酸钠及数粒玻璃微珠, 在 30℃, 180 r/min 的摇床中振荡 30 min, 充分摇匀, 使细胞分散, 然后离心. 将沉淀转移到 100 mL 含吡啉 500 mg/L 的无机盐培养基^[20] (每 L 中含 Na_2HPO_4 1.42 g, KH_2PO_4 1.36 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.216 g, CaCl_2 0.006 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.69 g, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.000 24 g, H_3BO_3 0.001 16 g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.000 024 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002 78 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001 15 g 和 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.000 38 g), 培养约 4 d 后, 取 5 mL 菌液在无机盐培养基中转接培养 2 次. 此时, 用灭菌去离子水将菌液稀释 $10^{-1} \sim 10^{-7}$ 倍, 各取 0.1 mL 稀释液于无机盐固体培养基 (2% 琼脂) 平板中涂布分离, 30℃ 培养, 长出明显菌落后, 挑取有代表性的单菌落, 划线分离纯化. 得到纯菌落后, 将菌株接种到含 500 mg/L 吡啉的无机盐培养基中, 根据细菌对吡啉的耐受浓度及降解速率进一步筛选高效降解菌.

细菌液体培养条件为: 在 250 mL 锥形瓶中加入 100 mL 培养基, 以 500 mg/L 吡啉作为唯一的碳、氮源, 摇床设为 30℃, 180 r/min. LB 培养基^[21] 中加入 500 mg/L 吡啉, 保持细菌降解活力, 防止杂菌侵入. 通过离心收集菌体, 离心条件为 4 000 r/min, 10 min.

1.2 菌株生理生化特性研究

通过上述分离与培养, 获得 1 株高效吡啉降解菌 BC026, 对其进行革兰氏染色^[22] 并委托中国科学院微生物研究所对细菌形态进行电镜扫描. 另外, 在 LB 半固体培养基 (0.5% 琼脂) 中, 用穿刺法和混合平板法考察细菌运动性与好氧性; 在 LB 固体培养基 (1.8% 琼脂) 中分别添加抗生素: 氨苄青霉素 60

mg/L、卡那霉素 50 mg/L、氯霉素 170 mg/L、四环素 40 mg/L、头孢 100 mg/L、壮观霉素 100 mg/L, 考察 BC026 的抗性, 实验设阴性与阳性对照; 在阿须贝无氮培养基^[22] 中接种 BC026, 考察其是否为自生固氮菌.

1.3 菌种鉴定

在实验室采用 16S rRNA 序列分析, 并结合菌的生理生化反应对细菌种属进行鉴定. 以 TIANGEN 基因组 DNA 提取试剂盒提取细菌的基因组 DNA 作为 PCR 反应的模板, 设计引物^[23] 进行 PCR. 上下游引物序列分别为: 27F: 5'AGAGTTTGATCATGGCTCAG3'; 1492R: 5' TACGGTTACCTTGTACGACTT3'. PCR 产物用 0.8% 的琼脂糖凝胶分离, 纯化与回收后送 TIANGEN 公司测序. 测序结果在 GenBank 中与已知序列进行相似度分析. 此外, 为了进一步确认实验室的鉴定分析结果, 委托中国科学院微生物研究所通过 Biolog 微生物鉴定系统进行鉴定.

1.4 降解实验

考察在吡啉初始浓度为 400 mg/L, 30℃, pH 为 7 时, BC026 对吡啉的降解特性. 在此基础上, 进一步研究吡啉初始浓度、培养温度及培养液 pH 值对 BC026 降解特性的影响. 吡啉初始浓度的 4 个梯度为 99、473、932 和 1 806 mg/L; 培养温度设为 20、25、30 和 35℃; pH 值设为 4、5、6、7、8、9 和 10.

取 2 mL BC026 的 LB 培养液, 收集菌体沉淀, 接种到 200 mL 无机盐培养基中, 培养至对数期. 离心菌液, 所得菌体用无机盐培养基重悬, 离心 3 次以去除细菌表面吸附的杂质. 再转移到一定体积的灭菌无机盐液体培养基中, 制备成菌悬液, 作为降解实验的接种液. 在 100 mL 无机盐培养基中依次加入吡啉和接种液, 以封口膜密封, 置摇床中培养. 间隔一定时间取样 0.4 mL, 测定菌密度 D_{602} ; 另取由 0.45 μm 滤膜过滤后的微量培养液样品, 测定吡啉浓度.

1.5 代谢途径跟踪实验

在含吡啉 500 mg/L 的无机盐培养基中接种一定量的 BC026 菌悬液, 30℃ 恒温振荡培养, 每间隔 2 ~ 3 h 取样, 经 0.22 μm 的滤膜过滤, 测定 pH 值、吡啉浓度和氨氮浓度; 同时间隔 3 ~ 4 h 取样, 经 0.22 μm 滤膜过滤、二氯甲烷等体积萃取, 再以预先烘干的无水硫酸钠过滤, 以 GC/MS 分析代谢中间产物.

1.6 分析方法

接种菌的投加量以干重法测定, 并以岛津 UV2401 型紫外-可见光分光光度计测定菌液在最佳波长 602 nm 的吸光度, 建立吸光度 D_{602} 与菌重量的相关曲线.

pH 值测定使用 Thermo Orion 868 pH 计.

吡啶浓度以高效液相色谱测定,仪器型号为岛津 LC10AD_{VP}, SPD10A_{VP} UV-Vis Detector;色谱柱为 Diamonsil C18 反相柱, $5\ \mu\text{m} \times 250\ \text{mm} \times 4.6\ \text{mm}$;流动相为甲醇:水 = 4:1,流速为 $1.0\ \text{mL/min}$;检测波长为 $254\ \text{nm}$;高浓度吡啶进样体积为 $5\ \mu\text{L}$,低浓度吡啶进样体积为 $10\ \mu\text{L}$.

吡啶降解的氮产物(氨氮)浓度以水杨酸-次氯酸盐光度法(GB 7481-87)测定.

吡啶降解的有机中间产物以气相色谱/质谱联用仪进行定性分析,仪器型号为 Agilent 6890N GC/5973 MSD;毛细管柱为 DB-5MS, $30\ \text{m} \times 0.25\ \text{mm} \times 0.25\ \mu\text{m}$;色谱柱升温程序为:初始温度为 40°C ,保持 $2\ \text{min}$,以 6°C/min 的速度升温至 280°C ,保持 $3\ \text{min}$;离子源温度为 250°C ,电子能量为 $70\ \text{eV}$.

2 结果与讨论

2.1 菌株分离及纯化

经稀释涂布、平板划线分离与纯化后,得到 7 株可以在含吡啶的无机盐固体培养基上生长的菌株.进一步对各菌株在液体培养基中的生长情况及吡啶分解利用情况进行监测,从中挑选出 1 株降解能力最强且能以吡啶为唯一碳、氮源及能源进行生长的菌株 BC026.实验发现该菌株在液体培养基中具有自絮凝的特性,絮凝活性达到 60%,这种特性将有助于其在污水处理系统中形成菌胶团,增强生物处理系统的冲击性.

2.2 菌株生理生化特征

BC026 是革兰氏阴性杆菌,好氧,有运动性;在固体培养基中呈黄褐色、表面光滑的圆形小菌落;在液体培养基中有自絮凝现象;对氨苄青霉素、卡那霉素、壮观霉素有抗性,对氯霉素、四环素、头孢敏感.图 1 为 BC026 的扫描电镜照片.

2.3 菌种鉴定结果

将 BC026 的 16S rRNA 测序结果导入 GenBank 中进行同源性比对,结果表明它与 *Crabtreeella saccharophila*、*Zoogloea ramigera*、*Mycoplana* sp. 的同源性均为 99%.中国科学院微生物研究所对其以 Biolog 微生物鉴定系统进行鉴定的结果为 *Shinella zoogloeoides*,同种异名为 *Crabtreeella saccharophila* 和生枝状胶菌(*Zoogloea ramigera*),2006 年重新分类后命名为 *Shinella zoogloeoides*^[24],暂无中文译名.因此,本研究正式命名该菌为 *Shinella zoogloeoides* BC026,现已送中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中

心保存,登记号为 CGMCC No.2224.

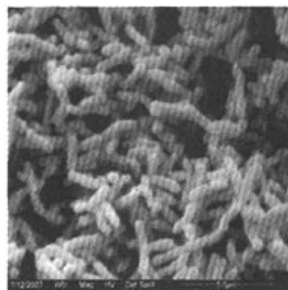


图 1 BC026 扫描电镜照片

Fig.1 Image of *Shinella zoogloeoides* BC026 by SEM

2.4 BC026 对吡啶的生物降解

在以吡啶为唯一碳、氮源的条件下,考察 BC026 对吡啶的降解能力.细菌接种量为 $0.1\ \text{g/L}$.实验结果见图 2.

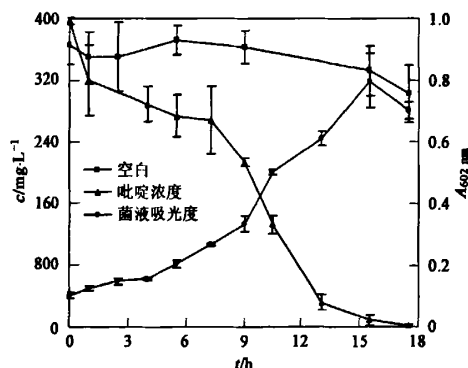


图 2 BC026 菌对吡啶的生物降解

Fig.2 Biodegradation of pyridine by the strain BC026

由图 2 可见,随着吡啶浓度的降低,菌密度增长,当吡啶消耗完全后,菌密度快速衰减.这说明 BC026 菌以吡啶为唯一碳、氮源,并且可在较短时间内将吡啶完全降解.前 4 h 吡啶浓度的衰减速率比随后的 2 h 快,这是因为细菌具有吸附作用,BC026 菌接种到入培养液后,立即吸附部分吡啶,使吡啶浓度在开始的 4 h 迅速降低.此时由于 BC026 菌暂时不能很好地适应新的生长环境,菌密度的增长在前 4 h 非常缓慢,远小于吡啶浓度降低的速率.在 4~6 h 内,菌密度增长速率开始加快,这说明 BC026 菌逐渐适应了生长环境,开始降解吡啶.6 h 之后,细菌达到对数生长期,降解吡啶的速度加快.在 15.5 h,吡啶去除率达到 98.7%,此时作为碳、氮源的吡啶缺乏,细菌因得不到足够的营养而死亡,因此菌密度迅

速下降,由于吡啶的碳氮比为 4.3:1,远小于细菌生长的最适碳氮(20~30):1,所以推测,此时微生物的死亡可能与缺乏碳源有关,这一推测在氮转化实验中得到证实.

2.5 BC026 降解特性的影响因素

2.5.1 吡啶初始浓度

实验投菌量为 0.06 g/L,在 1 896 mg/L 的浓度下设置空白对照.结果见图 3.

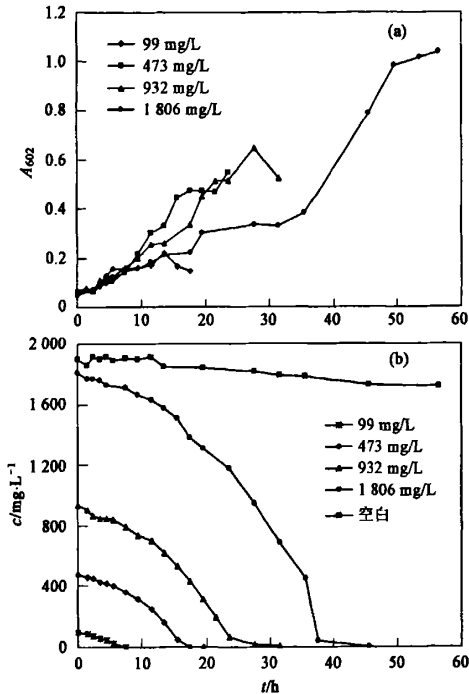


图 3 BC026 菌对不同浓度吡啶的降解情况
Fig.3 Effect of initial pyridine concentration on the degradation by the strain BC026

由图 3(b)可以看出,在 99~1 806 mg/L 的浓度下,BC026 都可降解吡啶,但抑制期的长短和降解速率不同.浓度为 99 mg/L 的吡啶溶液浓度低,BC026 很容易适应生长环境,因此几乎没有表现出抑制期,吡啶浓度直线下降.随着吡啶初始浓度的升高,抑制期时间变长,说明吡啶浓度越高,细菌适应越慢.但是一旦进入降解期,吡啶初始浓度高的培养液中微生物降解速率快,即为斜率绝对值较大,这是因为抑制期结束后,细菌已经完全适应了生长环境,浓度高的吡啶给细菌提供更充足的营养物质从事生命活动并大量繁殖,而细菌数量增大后,所需的碳、氮源较多,吡啶的降解速率相应提高,二者相互促进.

实验同时测定菌密度的变化.从图 3(a)可以看

出,4 个浓度下,菌量都随着吡啶的降解而升高.在 99 mg/L 的吡啶溶液中,菌密度曲线很快达到最高点,与图 3(b)对照发现在吡啶浓度降到 20 mg/L 时,可利用的基质过少成为细菌生长的限制因素,菌量开始下降.从初始浓度为 1 806 mg/L 的曲线可以看出:实验初期细菌生长速度较慢,吡啶的降解速率也比较慢,但随着吡啶的降解,高浓度吡啶对细菌生长的抑制作用逐渐减弱;当吡啶浓度降为 400 mg/L 左右时,细菌生长进入对数期,菌量迅速增大.在不同的吡啶浓度下,所能达到的最大菌密度及所需时间各不相同,4 条曲线中,最大菌密度分别为:0.217、0.623、0.857 和 1.375 g/L,所需时间分别为:15.5、17.5、27.5 和 56.5 h.随着初始吡啶浓度的升高,培养液中碳、氮源的量变大,最大菌密度递增,但是这种增长并不成正比,这说明,细菌的生长的限制因素不仅有营养物质吡啶的浓度,还有其它的因素^[25],例如与代谢产物的积累以及细菌对生存空间的竞争有关.

2.5.2 温度

根据报道^[26],动胶菌的最适生长温度为 28~30℃,根据预实验,BC026 在 37.5℃ 几乎不生长,因此设计实验的温度梯度为 20、25、30 和 35℃.实验投菌量为 0.14 g/L.因为温度越高,吡啶挥发越快,所以在 35℃ 的条件下设置空白对照.实验结果见图 4.

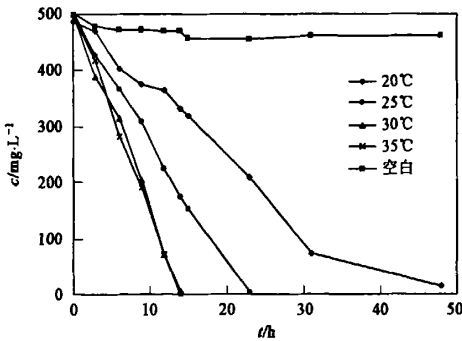


图 4 不同温度下吡啶的降解特性研究
Fig.4 Effect of temperature on pyridine degradation by the strain BC026

由于实验加大了投菌量,因此细菌直接进入对数降解期.从图 4 看,20℃ 时的降解速度最慢,25℃ 时的速度稍快,30℃ 和 35℃ 时的降解速率最高.总体看,30℃ 与 35℃ 的降解能力相差很小,在 12 h 左右降解速率几乎同时达到 85%.这说明细菌最适的生长、降解温度处于 30~35℃ 之间,结合报道^[26],

BC026 菌的培养温度选择 30℃. 温度会影响微生物膜的液晶结构、酶及蛋白质的合成与活性, 进而影响降解等生命活动. 在 20~35℃ 之间, 随着培养温度升高, BC026 中的蛋白质和酶活性增强, 生化反应加快, 生长及降解速率提高; 当温度继续升高到 37℃, 细胞中某些温度敏感的物质受到不可逆的破坏, 生命活动受到抑制.

2.5.3 pH 值

设计实验的 pH 值在 4~10 之间, 实验投菌量为 0.13 g/L, 降解实验结果见图 5.

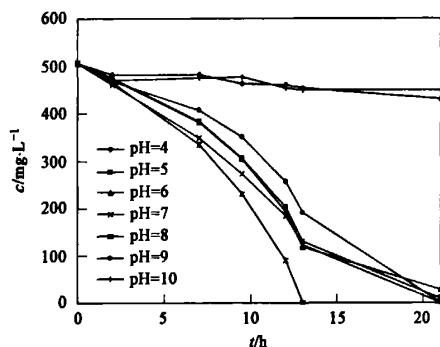


图 5 不同 pH 下 BC026 菌对吡啶的生物降解特性

Fig.5 Effect of pH on pyridine degradation by the strain BC026

从图 5 分析得出, pH 值为 4 和 10 时, BC026 对吡啶没有降解作用, 这是因为: 在 pH 为 4 的过酸条件下, 细胞质的理化性质可能受到影响, 酶的分子结构发生不可逆的破坏, 并且微生物对营养物质的摄取也会受到影响. pH 为 4 的培养液中, 溶液很清亮, 细胞凝聚成小颗粒沉淀. pH 值为 10 时, 一部分 OH^- 离子与培养基中的离子生成沉淀, 破坏了培养基组成. 实验中测定在 pH 值为 4 和 10 的条件下菌量略有降低. 在 pH 为 5~9 的条件下, 细菌都能以吡啶为唯一的碳、氮源生长, 只是降解的速率不同, 降解最快的 pH 值为 8, 其他依次为 $\text{pH } 7 > \text{pH } 6 \approx \text{pH } 5 > \text{pH } 9$.

2.6 代谢途径的探索

不同细菌对同种物质的降解途径不尽相同^[27], 因此研究 BC026 对吡啶的降解途径十分必要. 氮是吡啶中的杂原子, 研究氮的脱除及转化机制将有助于找到吡啶的降解途径. 实验先以阿须贝无氮培养基培养 BC026, 验证其为 1 株自生固氮菌, 其后在降解过程中监测吡啶及氨氮的浓度变化, 同时尝试检测有机中间产物. 实验投菌量为 0.1 g/L. 结果见图 6.

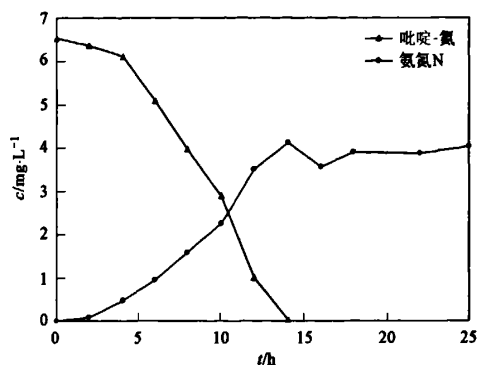


图 6 BC026 菌降解过程中吡啶与氨氮的浓度变化

Fig.6 Variation of pyridine-N and NH_4^+ -N concentrations during the degradation of pyridine

图 6 结果表明: 在反应体系中, 吡啶浓度开始降低的同时, 氨氮浓度明显升高, 说明吡啶降解的第 1 步就脱去杂原子氮, 并以氨氮的形式释放到溶液中, 这与文献[3,11]报道相同. 当吡啶全部降解后氨氮浓度即不再增加, 说明没有其他的中间产物可以脱氮转变成氨氮, 吡啶中 59.5% 的氮转化为氨氮.

在上述实验过程中以 GC/MS、紫外-可见分光光度计及 HPLC 对不同时间段的样品进行检测, 没有发现吡啶降解的有机中间产物, 这与文献[16]的研究结果相同, 该文献认为吡啶能促使与戊二醛、戊二酸脱氢酶有关的辅酶产生; 文献[28,29]指出吡啶的中间代谢产物有戊二酸, 而它可能由戊二醛氧化而来. 在实验过程中监测溶液 pH 值发现: pH 值随吡啶降解而降低, 当吡啶完全分解后才开始升高, 这说明吡啶降解时产生酸性中间产物, 当吡啶完全消失后, 该酸性中间产物又很快被转化. 因此, 本研究推断 BC026 对吡啶的代谢途径为: 吡啶环在两处 C—N 键断开, 脱除的杂原子氮生成氨氮, 脱氮后吡啶经羟基化生成戊二醛, 戊二醛进一步氧化为戊二酸. 由于生枝动胶菌为化能异养菌^[26], 结合图 2 的微生物菌生长量的变化, 可以认为在吡啶分解的同时, 戊二酸被菌快速利用和分解, 生成细菌不能再利用的无机物.

综上所述, 推测当 BC026 以吡啶为唯一碳、氮源生长代谢时的途径如图 7.

继续对菌液进行培养, 氨氮浓度基本没有变化. 但进一步的实验表明, 当向培养液中补加一定的葡萄糖后, 溶液氨氮浓度快速降低至零, 这说明在单质条件下, 由于吡啶自身的碳氮比(4.3:1)较低, 使得体系中碳源不足, 造成产物氨氮不能继续被微生

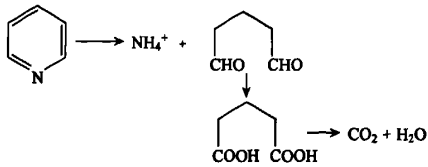


图7 BC026 菌对吡啶的可能代谢途径

Fig.7 Proposed pathway for pyridine metabolism by the strain BC026

物利用,而加入可利用的外加碳源后,氮氮即可被微生物继续利用。

3 结论

(1)由焦化污泥中分离出1株高效降解菌BC026,能以吡啶为唯一的碳、氮源生长,且具有自絮凝的特性。该菌株为革兰氏阴性菌,好氧,有运动性,可在阿须贝无氮培养基上良好生长。对氨基青霉素、硫酸卡那霉素及壮观霉素有抗性。经16S rRNA序列分析、Biolog微生物鉴定系统以及部分生理生化反应,确定BC026为 *Shinella zoogloeoides*。

(2)当吡啶浓度为400 mg/L,投菌量为0.1 g/L时,BC026可在17 h内将吡啶完全降解;当吡啶浓度为1 806 mg/L,投菌量为0.06 g/L时,BC026可在46 h内将吡啶完全降解;吡啶初始浓度升高对BC026产生一定抑制,但菌株在适应之后,降解速率更快。最适降解温度为30~35℃左右,最适pH为8。

(3)BC026降解吡啶时,吡啶环首先在C—N键断开,59.5%的氮生成氨氮;虽未检测到代谢有机中间产物,但推断BC026对吡啶代谢的有机中间产物为戊二醛和戊二酸,并最终分解为二氧化碳和水。

参考文献:

- [1] 温洪宇,廖银章,李旭东. 微生物降解多环芳烃的研究进展[J]. 微生物学杂志, 2005, 25(6): 73-75.
- [2] Dovgilevich E V. The microbiological transformation and degradation of pyridine and alkyl pyridines[J]. Nauchnye Doklady Vyshe Shkoly Biologicheskoe Nauki, 1990, (8): 5-19.
- [3] Padoley K V, Rajvaidya A S, Subbarao T V, et al. Biodegradation of pyridine in a completely mixed activated sludge process[J]. Bioresource Technology, 2006, 97(10): 1225-1236.
- [4] Wang J L, Quan X C, Wu L B, et al. Bioaugmentation as a tool to enhance the removal of refractory compound in coke plant wastewater[J]. Process Biochemistry, 2002, 38(5): 777-781.
- [5] Mohan S V, Sistla S, Curu R K, et al. Microbial degradation of pyridine using *Pseudomonas* sp. and isolation of plasmid responsible for degradation[J]. Waste Management, 2003, 23(2): 167-171.
- [6] 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[J]. Letters in Applied Microbiology, 2006, 42(5): 495-500.
- [7] Ramana Ch V, Arunasri K, Sasikala C. Photobiodegradation of pyridine by *Rhodospseudomonas palustris* JA1[J]. Indian Journal of Experimental Biology, 2002, 40(8): 967-970.
- [8] Agapova S R, Andreeva A L, Starovoitov I I, et al. Plasmids for biodegradation of 2,6-dimethylpyridine, 2,4-dimethylpyridine, and pyridine in strains of *Arthrobacter* [J]. Molekuliarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya, 1992, (5-6): 10-13.
- [9] O'Loughlin E J, Sims G K, Traina S J. Biodegradation of 2-methyl, 2-ethyl, and 2-hydroxypyridine by an *Arthrobacter* sp. isolated from subsurface sediment[J]. Biodegradation, 1999, 10(2): 93-104.
- [10] Lee J J, Rhee S K, Lee S T. Degradation of 3-methylpyridine and 3-ethylpyridine by *Gordonia nitida* LE31 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(9): 4342-4345.
- [11] Uma B, Sandhya S. Pyridine degradation and heterocyclic nitrification by *Bacillus coagulans* [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1997, 43(6): 595-598.
- [12] 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. [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1996, 44(6): 816-822.
- [13] Brinkmann U, Babel W. Simultaneous utilization of pyridine and fructose by *Rhodococcus opacus* UFZ B408 without an external nitrogen source[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1996, 45(1-2): 217-223.
- [14] 钱城,田沅,杨秀山. 焦化废水的微生物降解研究进展[J]. 上海环境科学, 2003, 22(2): 129-131.
- [15] 白晓平. 一组优势菌对焦化废水中吡啶、吡啶的降解条件的实验研究[J]. 微生物学杂志, 2004, 24(3): 36-39.
- [16] Rhee S K, Lee G M, Yoon J H, et al. Anaerobic and aerobic degradation of pyridine by a newly isolated denitrifying bacterium[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(7): 2578-2585.
- [17] 任大军,颜克亮,刘延杰,等. 白腐菌在固体培养基下对吡啶和吡啶的降解[J]. 环境污染与防治, 2006, 28(9): 658-661.
- [18] 韩力平,王建龙,刘恒,等. 固定化及游离态皮氏伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia pickettii*)降解吡啶的试验研究[J]. 环境科学学报, 2000, 20(3): 379-381.
- [19] Lee J J, Yoon J H, Yang S Y, et al. Aerobic biodegradation of 4-methylpyridine and 4-ethylpyridine by newly isolated *Pseudonocardia* sp. strain M43[J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 254(1): 95-100.
- [20] Kilbane II J J. Metabolic engineering to develop a pathway for the selective cleavage of carbon-nitrogen bonds[R]. Pittsburgh: Gas Technology Institute, 2005. 14.
- [21] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W 著,黄培堂等译. 分子克隆实验指南[M]. (第三版). 北京:科学出版社, 2002. 1595.
- [22] 沈萍,范秀荣,李广武. 微生物学实验[M]. (第三版). 北京:高等教育出版社, 1998. 28-31.
- [23] Devereux R, Wilkinson S S. Amplification of ribosomal RNA sequences. Molecular Microbial Ecology Manual [M]. (2nd). Netherland: Kluwer Academic Publishers, 2004. 509-522.
- [24] An D S, Im W T, Yang H C, et al. *Shinella granuli* gen. nov., sp. nov., and proposal of the reclassification of *Zoogloea ramigera* ATCC 19623 as *Shinella zoogloeoides* sp. nov. [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56: 443-448.
- [25] 沈萍. 微生物学[M]. 北京:高等教育出版社, 2000. 130-149.
- [26] 布钦南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 北京:科学出版社, 1984. 323-325.
- [27] Kaiser J P, Feng Y C, Bollag J M. Microbial metabolism of pyridine, quinoline, acridine, and their derivatives under aerobic and anaerobic conditions[J]. Microbiological Reviews, 1996, 60(3): 483-498.
- [28] Watson G K, Cain R B. Microbial metabolism of the pyridine ring [J]. The Biochemical Journal, 1975, 146: 157-172.
- [29] Fetzner S. Bacterial degradation of pyridine, indole, quinoline, and their derivatives under different redox conditions [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1998, 49(3): 237-250.