青岛农业大学
毕 业 论 文（设计）

题　　目：3-羟基吡啶降解菌株的筛选及研究

姓　　名：许阳阳

学　　院：生命科学学院

专　　业：生物技术（食用菌）

班　　级：1401 班

学　　号：20144041

指导教师：于浩

2018 年 6 月 15 日

青岛农业大学
毕业论文（设计）诚 信 声 明

本人郑重声明：所呈交的本科毕业论文（设计）是本人在指导老师的指导下，进行研究工作所取得的成果，成果不存在知识产权争议。除文中已经注明引用的内容外，本论文不含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体在文中均作了明确的说明并表示了谢意。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

毕业论文（设计）作者签名：

年　　月　　日

目录

摘要 I
Abstract II
引言 1
1 材料与方法 2
1.1 实验材料 2
1.1.1 样品采集 2
1.1.2 化学试剂 2
1.1.3 实验器皿及用具 2
1.1.4 主要试验仪器 2
1.1.5 培养基及缓冲液 3
1.2 菌种的筛选 3
1.2.1 富集培养 3
1.2.2 多轮富集、选择性培养 3
1.2.3 分离单菌落 3
1.2.4 菌株鉴定 4
1.3 培养温度对 3-羟基吡啶降解的影响 5
1.4 pH 对 3-羟基吡啶降解的影响 5
1.5 菌株 DW-1 对不同浓度的 3-羟基吡啶的降解能力 6
1.6 菌株 DW-1 的底物谱 6
1.7 菌株 DW-1 的抗性研究 6
1.8 菌株 DW-1 降解 3-羟基吡啶动力学分析 6
2 结果与分析 7
2.1 菌株 DW-1 生理生化特性分析与 16S rRNA 基因序列分析鉴定 7
2.2 菌株 DW-1 降解 3-羟基吡啶的最适条件研究 7
2.2.2 pH 对菌株 DW-1 生长及 3-羟基吡啶降解的影响 9
2.2.3 初始 3-羟基吡啶的浓度对菌株 DW-1 生长及 3-羟基吡啶降解的影响 10
2.2.4 菌株 DW-1 的底物谱 12
2.2.5 菌株 DW-1 对抗生素的抗性 13
2.2.6 菌株 DW-1 降解 3-羟基吡啶动力学分析 14
3 讨论 14
参考文献 16
致谢 17

3-羟基吡啶降解菌株的筛选及研究

生物技术（食用菌） 许阳阳

指导教师 于浩

摘要：从辽河口受到污染的土壤中筛选出了一株能够以 3-羟基吡啶为唯一碳源、能源和氮源生长的菌株，经过菌落形态观察革兰氏染色、16SrRNA 基因序列比对鉴定该菌株为根瘤菌，并命名为 DW-1。本试验研究在不同的温度、pH 和底物浓度中菌株 DW-1 的生长情况，使用用分光光度计测定菌株 DW-1 在不同情况下菌液 OD_{600} 吸光值和 3-羟基吡啶的降解率，从而找到最适菌株 DW-1 降解 3-羟基吡啶的条件。结果表明，菌株 DW-1 降解 3-羟基吡啶的最适 pH 为 8，株 DW-1 降解 3-羟基吡啶的最适温度为 30℃，适底物浓度为 1 mg/mL。本次试验为 3-羟基吡啶降解提供理论依据。

关键字：3-羟基吡啶；菌种筛选；最适条件

Screening and Study of 3-Hydroxypyridine Degradation Strain

Student Majoring in Biotechnology Xu Yangyang

Tutor Yu Hao

Abstract: A strain, which could use 3-hydroxy pyridine as the sole carbon source, nitrogen and energy sources, was isolated from the polluted soil of Liao river. The strain designated as DW-1 was identified as *Rhizobium* by colonial morphology observation gram staining and 16S rRNA gene sequence alignment. This temperature, pH and substrate concentration in the DW-1 strain growth situation for strain growing were determined by spectrophotometry. The 3-hydroxy pyridine degradation rate of strain DW-1 was also investigated. Results show that the optimum condition for 3-hydroxypyridine degradation in strains DW-1 is pH of 8, at 30 ℃, and the suitable substrate concentration is 1 mg/mL. This experiment provides a theoretical basis for the degradation of 3-hydroxypyridine.

Keywords: 3-hydroxypyridine; Screening of strains; The optimal conditions;

引言

良好的生活环境是人类生存的必要条件，目前发现一些环境污染物的大量排放是造成环境恶化的主要原因之一，吡啶类化合物是最为常见的污染物之一[1]。吡啶类化合物的生物学毒性较大，并且由于吡啶环中存在的氮原子，更是使吡啶类化合物的催化性加强，因此在某种程度上来说，吡啶类化合物的降解可能难于芳香环的降解[2]。目前降解吡啶类化合物的微生物数量较少已成为减少吡啶类化合物污染问题的一个难题。羟基吡啶在吡啶类化合物降解中显得尤为重要，是因为羟基吡啶是微生物降解吡啶类化合物的核心代谢产物，这就使得寻找到一个能够降解羟基吡啶的菌株尤为重要[3]。吡啶类化合物及其衍生物是一种常用的工业原料，常被使用在染料、农药、制药的工业合成过程中[4]。而当人类在吸入或经过皮肤吸收进人体后会产生强烈的刺激性，并且能够麻醉中枢神经系统，影响人体肝脏、肾脏的功能，对人类产生严重危害。但是在对吡啶类化合物进行人工合成过程中或者是后期使用过程中总会不可避免地将吡啶类污染物泄漏到环境中[5]。

吡啶类化合物是一种较难降解的化合物，当其泄漏到环境中后，会污染土壤，并且通过雨水极易渗透到地下水系统中，这样便引起土壤与水环境的严重污染[6]。目前污染的土壤的处理办法包括物理法、化学法和生物法，物理法采用将污染的土壤挖出来，然后通过有氧的燃烧把土壤中的有机的污染物除去。但是因为土壤的燃烧点很低，所以燃烧时还需要添加一些染料，比如煤粉等，因此成本较高，而且对于一些重金属来说是无法除去的[7]。土壤的燃烧就和垃圾燃烧一样，如果在燃烧的过程中操作不得当可能会产生再次污染的危机[8]。同时由于吡啶的化学性质稳定，采用一些传统的生物处理方法很难将溶于水中的吡啶类化合物除掉，因此我们采用生物强化技术，使用能够降解吡啶类化合物的菌株来将吡啶类化合物降解，可以提高降解的效率[9]。根瘤菌是一种革兰氏阴性菌，目前对于根瘤菌降解 3-羟基吡啶的研究还较少，本实验为研究根瘤菌降解 3-羟基吡啶提供了基本的理论基础[10]。

本实验从污染的土壤中筛选到了一株能以 3-羟基吡啶为唯一碳源、氮源和能源的菌株 DW-1，可以用于有机合成方面、制药工业和染料的制作[11]。以其为研

究对象，从生理生化方面、形态学方面和分子水平对其进行鉴定，并进行其他因素对菌株 DW-1 生长的影响：研究菌株 DW-1 降解 3-羟基吡啶的最适温度、最适 pH 和最适的底物浓度，并对菌株 DW-1 的底物谱及抗性进行了研究[13]。旨在找到菌株 DW-1 降解 3-羟基吡啶的最适条件，从而降低吡啶类化合物对环境的污染。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 样品采集

实验样品采自辽河口污染的距地表 3～6cm 的土壤，呈黑褐色。

1.1.2 化学试剂

庆大霉素（Gen）、氨苄青霉素(Amp)、卡那霉素(Kan)、四环素(Tet)、氯霉素（Chol）3-羟基吡啶、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、吡啶（Aladdin Industrial Corporation）、3-甲基吡啶（Aladdin Industrial Corporation）、2-甲基吡啶（Aladdin Industrial Corporation）、4-甲基吡啶（Aladdin Industrial Corporation）、4-羟基吡啶（Aladdin Industrial Corporation）、2-羟基吡啶（Aladdin Industrial Corporation）

1.1.3 实验器皿及用具

250mL 三角瓶、不同规格移液枪、配套无菌枪头、接种环、称量纸、药匙等

1.1.4 主要试验仪器

主要使用仪器如表 1：

表 1 实验仪器设备

仪器名称	仪器型号	仪器厂家
高速微量离心机	E3115	安胜科技有限公司
双层全温摇床	QYC 2112	上海福玛实验设备有限公司
超净工作台	SW-CJ-2FD	苏州净化设备有限公司
超声波细胞破碎仪	JY92-2D	宁波新芝生物科技股份有限公司
微生物恒温培养箱	YHP-9162	姚氏仪器设备厂（Shanghai）
PCR 仪	T100	BIO-RAD
紫外分光光度计	UV2310II	上海天美公司
立式压力蒸汽灭菌锅	mLS-3750	三洋电机株式公社

1.1.5 培养基及缓冲液

1）LB 培养基

按照表 2 所列方法配置好后使用高压蒸汽灭菌锅 121℃灭菌 30 min。

表 2　LB 培养基配方

药品	质量（g/L）
胰蛋白胨	10.0
酵母粉	5.0
氯化钠	10.0
琼脂粉	20.0

按照表 2 所列方法配置好后使用高压蒸汽灭菌锅 121℃灭菌 30 min。

2）3PD-MSM 培养基

3PD-MSM 培养基（去离子水 1000 mL）：K_2HPO_4 12 g；KH_2PO_4 10 g；Na_2SO_4 2.0 g；NaCl 2.0 g；$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g；$(NH_4)_2SO_4$ 1 g；1 mg/mL 3-羟基吡啶，固体培养基加 2%琼脂，将以上药品配置好后加入氢氧化钠溶液调节培养基 pH 为 7.0 后使用高压蒸汽灭菌锅 115℃灭菌 30 min。

1.2 菌种的筛选

1.2.1 富集培养

取五份 1 g 土样，从每份中取处 0.2 g，混匀，加入到 50 mL 的 3PD-MSM 培养基中(终浓度 1 mg/mL 的 3-羟基吡啶)，再加入 5 mL LB 液体培养基，①放在 30℃、120 r/min 摇床中培养 5 天，进行第一轮富集培养。

1.2.2 多轮富集、选择性培养

1 轮富集结束后，将培养 5 天的培养物取 5 mL 转接到新鲜的 50 mL3PD-MSM 培养基中，置于 30℃恒温摇床中震荡培养，转速在 120r/min 继续培养 5 天进行 2 轮富集，待第 2 轮富集培养结束后，将变浑浊的培养液取 5 mL 加入新鲜的 50 mL3PD-MSM 培养基中继续培养，进行第 3 轮富集培养，重复此步骤直至第五轮培养结束。在每轮富集培养过程中都以 3-羟基吡啶为唯一碳氮源和能源，筛选出能够降解 3-羟基吡啶的菌株。

1.2.3 分离单菌落

① 将第 5 轮富集培养结束后菌液，通过平板稀释涂布方法将菌液稀释适当的倍数后涂布在 3PD-MSM 固体培养基上，培养三天后长出单菌落，将平板上的不同菌落分别挑取到 LB 摇管中，继续培养。

②待 LB 试管中的菌长到稳定期后，从 LB 摇管中转接 100 μL 到 3PD-MSM 液体培养基中，置于 30℃进行培养。

③将步骤②中菌株再次转接 100 μL 到新的 3PD-MSM 液体培养基中，置于 30℃进行培养，反复转接 2 次。

④将再次生长的培养物在 3PD-MSM 固体平板上面进行三区划线，培养三天后，挑取单菌落进行扩大培养，用于后续基因组提取实验、菌株 16S rRNA 鉴定和保藏菌株等实验。

1.2.4 菌株鉴定

1）提基因组

①将 500 mL 的细菌过夜培养液，5000 rpm 离心 10 分钟，然后去掉上清液。

②向沉淀中加入 4.75 mL TE，将沉淀彻底悬浮，然后加入 0.25 mL10%SDS，25 μL 20 mg/mL 的蛋白酶 K，充分颠倒混匀，37 摄氏度保温 1 小时。

③加入 0.75 mL 5 mol/L 的 NaCl，充分颠倒混匀。

④加入 0.75 mL CTAB/NaCl 溶液，充分颠倒混匀，65 摄氏度保温 20 分钟。加入 5 μL RNaseA(10 μg/μL)去掉菌液中的 RNA，37℃保温 10 分钟。

⑤用 6.5 mL 酚：氯仿：异戊醇(25:24:1)抽提反复震荡，500 rpm 离心 10 分钟，将上清液移至干净的离心管中。

⑥再用 6.5 mL 氯仿:异戊醇(24:1)抽提反复震荡，取上清液移至干净的离心管中。

⑦加入与上清等体积的异丙醇，颠倒混合，在室温下静止 10 分钟，沉淀 DNA，5,000 rpm 离心，5 分钟使 DNA 沉淀。

⑧加入 5 mL 70%乙醇漂洗(不要悬浮 DNA)，5,000 rpm 离心 3 分钟，重复漂洗一次。

⑨12,000 rpm 室温离心 2 分钟，去除乙醇。

⑩加入 60 mL 60℃预热的超纯水静置 3 分钟，12,000 rpm 室温离心 2 分钟，收集 DNA 溶液。

2）扩增 16S rRNA 采用的是用于 16S rRNA 扩增的通用引物 27F: 5’-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3’和 1492R:5’-TACCTTGTTACGACTT-3’。

3）构建 PCR 扩增体系：

表 3 菌液 PCR 体系

试剂	加入量（μL）
Primer1	1 .0
Primer2	1.0
基因组	1.0
2×Mix	15
水	14
Total	32.0

4）按表 3 建立扩增体系后进行 PCR 扩增，设置 PCR 反应程序如表 4 所示：

表 4 菌液 PCR 反应程序

程序/温度（℃）	时间（s）	
1 94	300	
2 94	30	34 个循环
3 58	30	
4 72	105	
5 72	300	
6 12	∞	

5）PCR 结束后从 PCR 产物中取出 4 μL 点样，提前 20 分钟配制 1%的琼脂糖凝胶，按照电压 100 V，电流 50 mA 条件进行琼脂糖凝胶电泳。

1.3 培养温度对 3-羟基吡啶降解的影响

按 1%的接种量将菌株 DW-1 接种于 50 mL 的 3PD-MSM 液体中（终浓度 1 mg/mL 3-羟基吡啶），分别置于 25℃、30℃和 37℃恒温摇床中震荡培养（120 r/min），每组设置 3 个平行实验，分别于 6 h、12 h、30 h、36 h、48 h、54 h、60 h 取样，分别测定培养液的 OD_{600} 吸光值，根据吸光值的大小判断菌株 DW-1 生长的最适温度。

1.4 pH 对 3-羟基吡啶降解的影响

使用磷酸氢二钾和磷酸二氢钾将 3PD-MSM 液体培养基调节 pH 分别为 4、5、6、7、8、9、10，按 1%的接种量将菌株 DW-1 接种于 3PD-MSM 液体培养基中，每组设置 3 个平行实验，置于 30℃恒温摇床中震荡培养，分别于 18 h、24 h、36 h、42 h、48 h、60 h、66 h 取样，分别测定培养液的 OD_{600} 吸光值和培养液中 3-

羟基吡啶的浓度计算降解率，综合菌株 DW-1 生长情况和 3-羟基吡啶的降解率，筛选出最适菌株 DW-1 生长的最适 pH。

1.5 菌株 DW-1 对不同浓度的 3-羟基吡啶的降解能力

在无机盐培养基中分别加入使质量终浓度为 0.2 mg/mL、0.5 mg/mL、0.75 mg/mL、1 mg/mL、1.25 mg/mL、1.5 mg/mL、2 mg/mL、2.5 mg/mL、3 mg/mL 的 3-羟基吡啶，分别按 1%的接种量接种 DW-1，每组设置 3 个平行实验，置于 30℃恒温培养箱中震荡培养，于 18 h、24 h、36 h、42 h、48 h、60 h、66 h、69 h 取样，分别测定培养液的 OD_{600} 吸光值和培养液中 3-羟基吡啶的浓度计算降解率，选择出最适菌株 DW-1 生长的最适 3-羟基吡啶浓度，需要综合培养时间和 3-羟基吡啶降解率等多方面考虑。

1.6 菌株 DW-1 的底物谱

为研究菌株 DW-1 是否能降解除 3-羟基吡啶外的其他化合物，因此向 30 mL 新鲜的无机盐培养基中加入终浓度为 1 mg/mL 不同底物：吡啶、3-甲基吡啶、2-甲基吡啶、4-甲基吡啶、4-羟基吡啶、2-羟基吡啶、3-羟基吡啶，按照 1%的接种量接种，每组设置 3 个平行实验，置于 30℃恒温震荡培养箱中培养，分别于 24 h、60 h、72 h 取样，分别测定培养液的 OD_{600} 吸光值和培养液中各种底物的浓度计算降解率。

1.7 菌株 DW-1 的抗性研究

为研究菌株 DW-1 的抗性，向 50 mL 新鲜的 3PD-MSM(终浓度为 1 mg/mL)培养基中加入不同的抗性，分别为庆大霉素、氯霉素、卡那霉素、四环素、氨苄青霉素，接种 1 mL 处于稳定期的菌株 DW-1，每组设置 3 个平行实验，置于 30℃恒温震荡培养箱中培养，培养 5 天后观察菌株 DW-1 在不同抗性中的生长状况，分别测定培养液的 OD_{600} 吸光值。

1.8 菌株 DW-1 降解 3-羟基吡啶动力学分析

为研究菌株 DW-1 降解 3-羟基吡啶的动力学特征，按 1%的接种量接种菌株 DW-1 与 3PD-MSM(终浓度为 1 mg/mL)培养基中，在 30℃培养，待菌株生长至稳定期时进行离心收集菌体，重悬使菌体的 OD600 达到 5，其中，3PD 的终浓度设置为 2 mg/mL，每两小时取一次样，待取至 8 h 时，统一对样品进行全波长扫描，波长范围设置为 200-400 nm，用超纯水调零。

2 结果与分析

2.1 菌株 DW-1 生理生化特性分析与 16S rRNA 基因序列分析鉴定

对辽河口污染的土壤进行采集，通过筛选得到一株能以 3-羟基吡啶为唯一碳源、氮源和能源的 3-羟基吡啶降解菌。菌株 DW-1 的菌落形态呈圆形，乳黄色，不透明，表面光滑，菌落边缘整齐，中间鼓起。菌株经革兰氏染色鉴定为革兰氏阴性菌。对该菌株进行 16S rRNA 进行扩增。

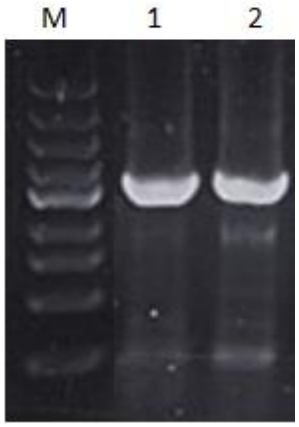

图 1 菌株 DW-1 基因组 16SrRNA 扩增结果。

M: Marker；1、2：菌株 DW-1 基因组

按照上述步骤提取的基因组进行 PCR 验证，按照表 3 的体系进行添加，按照表 4 的条件进行扩增，通过琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 1，1、2 为两管相同的 PCR 产物，通过于 Marker 对比，发现扩增出的基因片段大小约为 1,500 bp，与目的条带大小相同，将 1 号产物送至北京擎科生物技术有限公司进行测序。将测序所得基因序列用 NCBI 软件进行 Blast 比对，比对结果显示该菌株为根瘤菌，菌株 DW-1 的系统发育树如下所示：

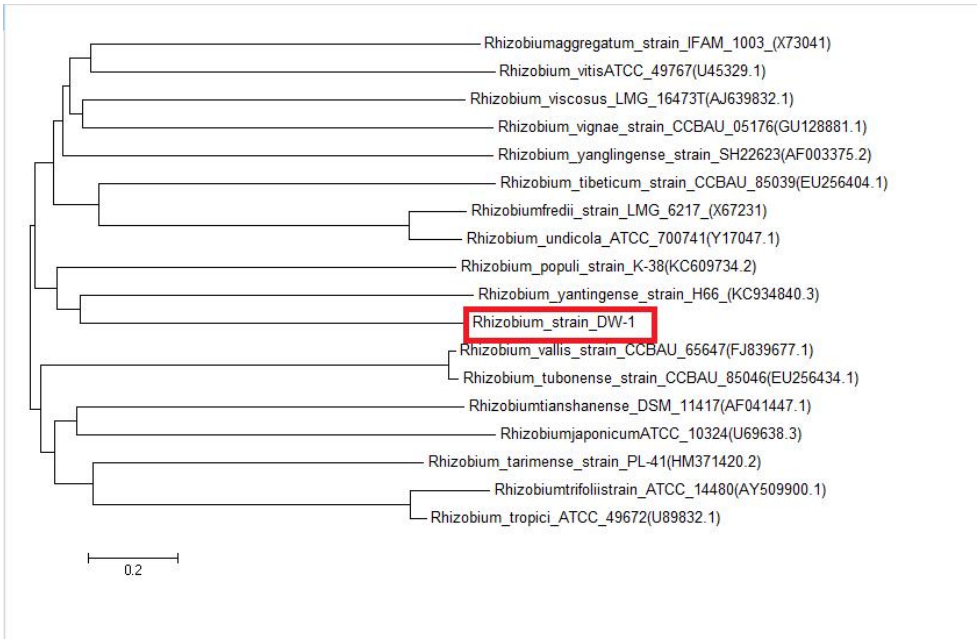

图 2　菌株 DW-1 系统发育树

2.2 菌株 DW-1 降解 3-羟基吡啶的最适条件研究

2.2.1 温度对菌株 DW-1 生长

研究温度对菌株 DW-1 生长的影响，实验温度梯度设计为 25℃、30℃和 37℃下，在相同浓度相同 pH 及相同转速的条件下培养，每隔一段时间进行取样测定 OD_{600} 下的吸光值，发现在培养的 30 h 内，在不同温度下，菌株的生长状况差别并不大，可能是由于菌株 DW-1 生长的延滞期较长，从而外界环境温度对他的影响不大，细菌的数目没有明显增加；在 36 h-54 h 后，菌株 DW-1 的生长状况在不同的温度下显示出明显差异，可以看出在 30℃培养的菌株 DW-1 在 30 h-48 h 这段时间呈现明显上升趋势，由此可见，细菌快速进入了对数期。在 37℃培养的菌株 DW-1 在 30 h-54 h 这段时间内处于对数生长期，相对于在 30℃培养的菌株，对数生长期延长，细菌的生长缓慢；在 25℃培养的菌株 DW-1 在 30 h-60 h 这段时间内一直呈现不断生长趋势，对数生长期相对于 30℃培养和 37℃培养的菌株延长，细菌生长缓慢。由此可见菌株 DW-1 的最适生长温度为 30℃。

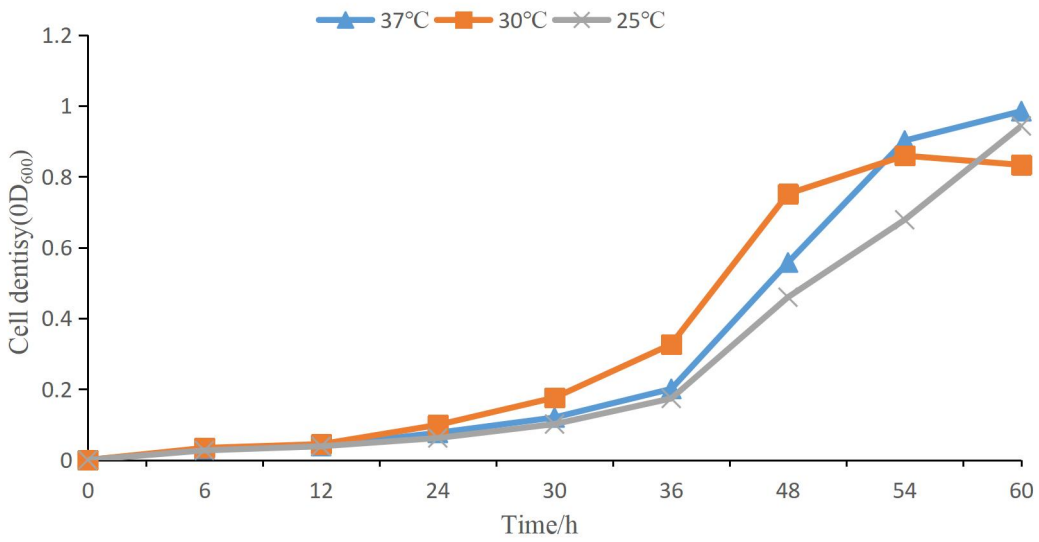

图3 温度对菌株生长的影响

2.2.2 pH 对菌株 DW-1 生长及 3-羟基吡啶降解的影响

按 1%的接种量将 DW-1 分别接种于 pH 为 4、5、6、7、8、9、10 的培养基中，在转速为 120 r/min 的 30℃摇床中培养。图 4 和图 5 分别表现了在不同 pH 下，菌株 DW-1 的生长情况和 3-羟基吡啶的降解率，其中图 4 与图 5 的变化趋势大体相同，说明菌株 DW-1 的生长与 3-羟基吡啶的降解率成线性关系。由图 4 可知在培养基的 pH 分别为 8、9、时，菌株 DW-1 随着培养时间的不断延长，菌株数量不断增加，并且菌株 DW-1 在 pH 为 8 和 9 时的最终生长浓度接近，由图 5 显示，当 pH 为 8 时 3-羟基吡啶的浓度在相同时间内降解最快，降解率最高达到 94.12%，而 pH 为 9 时，3-羟基吡啶的浓度下降不大，降解率不高，说明菌株 DW-1 较为适应生活在 pH 为 8 的环境中，当 pH 为 10 时菌株 DW-1 的生长极度缓慢，而且 3-羟基吡啶的浓度基本没有下降，降解率最高仅为 15.52%，说明菌株 DW-1 在强碱性环境中无法生长。在 pH 为 4、5、6、7 的培养基中，菌株 DW-1 的生长处于极度缓慢状态，在 pH 为 4 或 5 时，菌株 DW-1 几乎处于停止生长的状态，说明菌株 DW-1 在酸性环境中收到了抑制。当 pH 为 7 时，菌株 DW-1 生长缓慢，3-羟基吡啶的浓度基本没有下降，降解率最高仅为 9.78%，以此可知 pH 为 8 时更适合菌株 DW-1 的生长，而在酸性条件和中性条件下对菌株 DW-1 的生长是极为不利的。

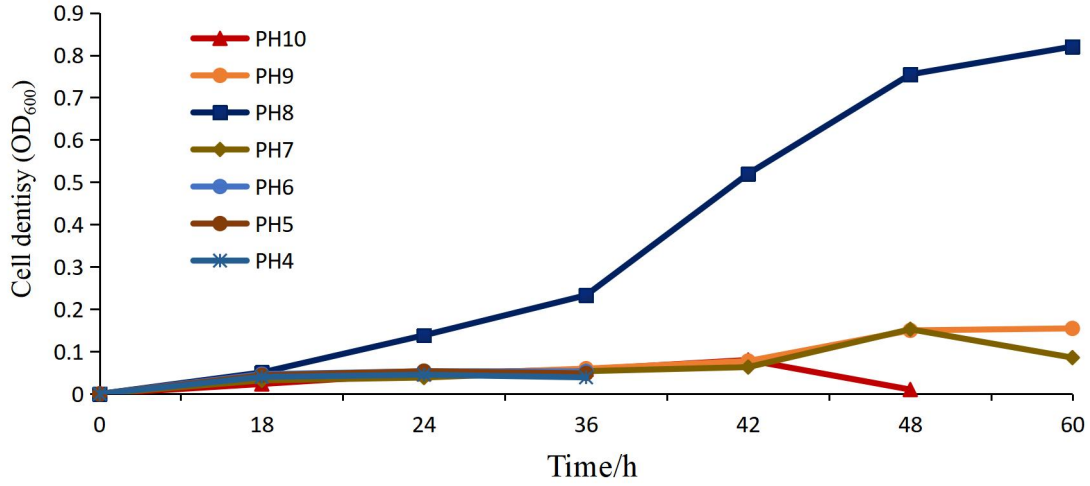

图4 pH对菌株DW-1生长的影响

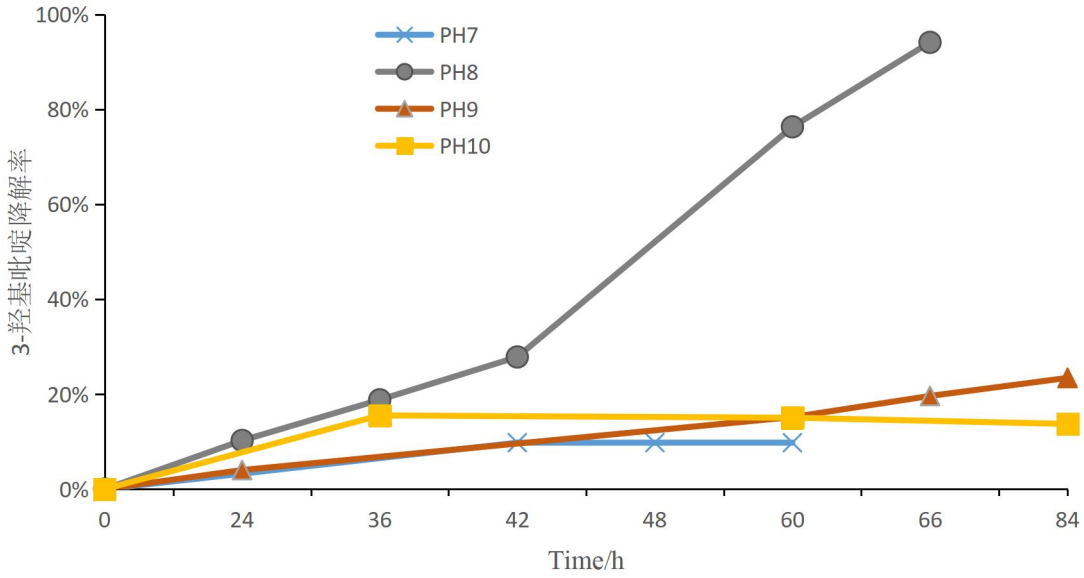

图5 pH对3-羟基吡啶降解率的影响

2.2.3 初始 3-羟基吡啶的浓度对菌株 DW-1 生长及 3-羟基吡啶降解的影响

在 50 mL 无机盐培养基中分别加入 3-羟基吡啶使终浓度为 0.2 mg/mL、0.5 mg/mL、0.75 mg/mL、1 mg/mL、1.25 mg/mL、1.5 mg/mL、2 mg/mL、2.5 mg/mL、3 mg/mL，分别接种 1%的菌株 DW-1，并于 30℃培养箱中培养。图 6 和图 7 分别表现了在不同底物浓度下，菌株 DW-1 的生长情况和 3-羟基吡啶的降解率，其中图 6 与图 7 的变化趋势大体相同，说明菌株 DW-1 的生长与 3-羟基吡啶的降解

率成线性关系。由图 6 可以看出，在浓度为 0.2 mg/mL、1.5 mg/mL、2 mg/mL 时，菌株 DW-1 的生长状况较差，其中在浓度为 0.2 mg/mL 时，其在 24 小时内的生长状况较好，并且在这一时间段内 3-羟基吡啶的浓度也变化较大，而且在此浓度时 3-羟基吡啶的最高降解率达到了 91.03%，然而在 0.2 mg/mL 的浓度 OD_{600} 吸光值较低的原因是因为在 36 小时内，培养基中的 3-羟基吡啶已经全部被菌株 DW-1 所利用，在 24h 后菌株因没有 3-羟基吡啶而无法生长。在 3-羟基吡啶浓度为 2 mg/mL 时，3-羟基吡啶的浓度基本没有变化，而且 3-羟基吡啶的降解率最高仅为 5.33%，可以看出菌株 DW-1 的长势微弱；在浓度为 1.5 mg/mL 时，图 6 显示菌株 DW-1 的生长较弱，但根据图 7 所示，3-羟基吡啶的浓度有所下降，而且降解率也达到了 76%，这说明可能有了可降解 3-羟基吡啶的杂菌污染，从而导致了数据的不符。在浓度为 2.5 mg/mL、3 mg/mL 时，菌株 DW-1 呈现不生长的状态。在 3-羟基吡啶浓度为 0.5 mg/mL、0.75 mg/mL 时，虽然有菌株 DW-1 生长，3-羟基吡啶也几乎全部被降解，降解率分别达到了 69.78%和 85.96%，但是在相同的时间内，这两个浓度的菌株 DW-1 的生长状况远达不到浓度为 1 mg/mL 时菌株 DW-1 的生长状况，其原因同浓度为 0.2 mg/mL 时基本相同，因 3-羟基吡啶被降解，所以导致菌株无法在生长。而在浓度为 1 mg/mL 时，菌株 DW-1 的生长状况最好，3-羟基吡啶几乎完全被降解，降解率高达 92.99%，这说明菌株 DW-1 生长的最适底物浓度为 1 mg/mL。

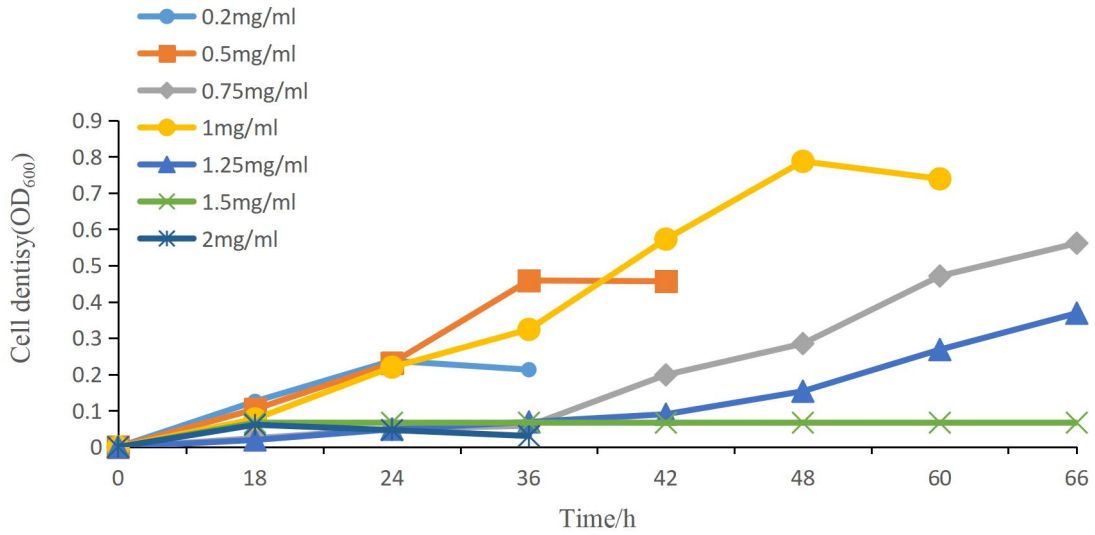

图6 不同底物浓度对菌株DW-1生长状况的影响

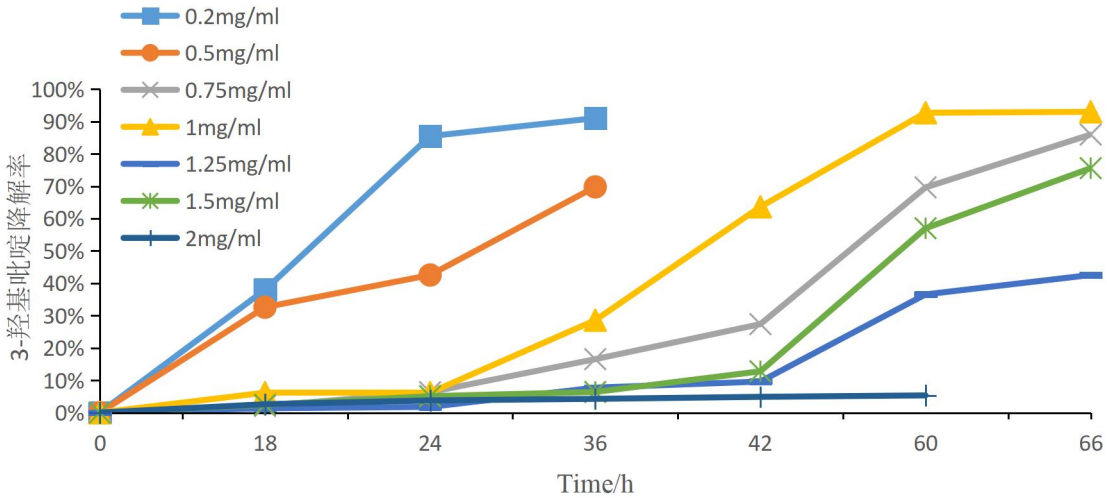

图7 不同浓度下3-羟基吡啶降解率的变化曲线

2.2.4 菌株 DW-1 的底物谱

研究菌株 DW-1 是否能降解其他吡啶类化合物，向 30 mL 新鲜的无机盐培养基中加入终浓度均为 1 mg/mL 的不同底物，包括吡啶、3-甲基吡啶、2-甲基吡啶、4-甲基吡啶、4-羟基吡啶、2-羟基吡啶、3-羟基吡啶，按 1%的接种量接种同一瓶中生长至稳定期的 DW-1 菌液，置于 30℃恒温震荡培养箱中培养，由图 8 可以看出，菌株在相同浓度，相同温度条件下，不同的底物，在 OD_{600} 吸光值均不超过 0.1，此结果说明菌株 DW-1 在吡啶、3-甲基吡啶、2-甲基吡啶、4-甲基吡啶、4-羟基吡啶、2-羟基吡啶、3-羟基吡啶多种底物中，仅能以 3-羟基吡啶为唯一的碳源、氮源和能源生长良好。

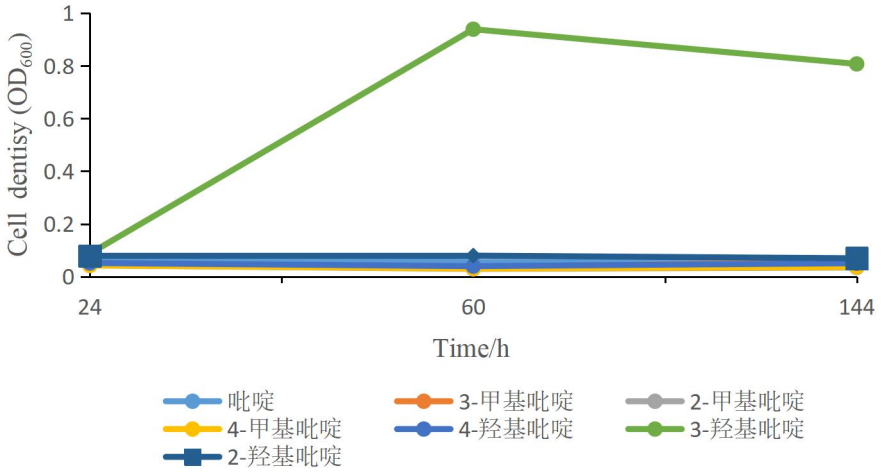

图8 菌株DW-1的底物谱

2.2.5 菌株 DW-1 对抗生素的抗性

在研究菌株 DW-1 的抗性时，向 50 mL 新鲜的 3PD-MSM(终浓度为 1 mg/mL)培养基中加入不同的抗性，分别为庆大霉素、氯霉素、卡那霉素、四环素、氨苄青霉素，按 1%的接种量接种，置于 30℃恒温震荡培养箱中培养，培养至第 3 天时，氨苄青霉素抗性下，菌株 DW-1 已经生长至稳定期，其他抗性条件下，菌株 DW-1 几乎没有生长，继续培养 5 天后取不同抗性中的菌液进行 OD_{600} 吸光值检测发现，菌株 DW-1 在含有氨苄抗性的培养基中生长良好，在卡那霉素抗性中仅表现出生长，而在其他抗性中则不生长，说明菌株 DW-1 对氨苄青霉素和卡那霉素具有抗性，后续实验可以选择氨苄青霉素作为抗性对菌株 DW-1 进行培养。

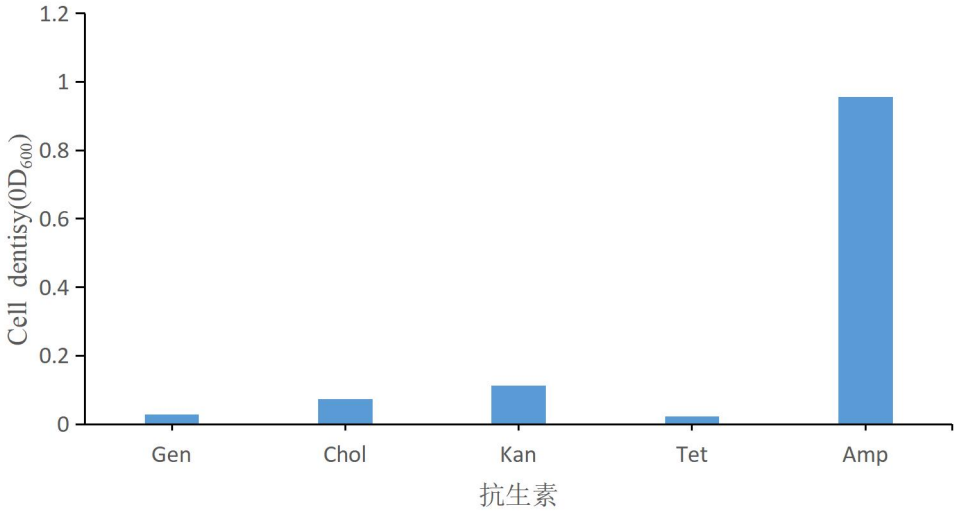

图9 菌株DW-1的抗性

2.2.6 菌株 DW-1 降解 3-羟基吡啶的浓度变化

将培养的菌株 DW-1 每两小时取样，分别取 0 h、2 h、4 h、6 h、8 h,在波长为 200-400 nm 的范围内进行扫描，因为在 280 nm-400 nm 没有吸收峰，截取了 210-280 nm 进行作图。结果如图 10 可以看出，0 h 样品中 3-羟基吡啶在 250 nm 处有吸收峰且最高，因此将 250 nm 看作 3-羟基吡啶的特有吸收峰，根据在 250 nm 处吸收峰的改变可以间接说明 3-羟基吡啶是否被降解。通过对 0 h、2 h、4 h、6 h、8 h 样品扫描结果发现，随着取样时间的延长，250 nm 处的峰值不断降低，说明 3-羟基吡啶不断被降解，在第 8 h 时，3-羟基吡啶在 250 nm 下的吸收峰最低，与 225-260 nm 的吸光值相近，说明 3-羟基吡啶基本被降解完全，进一步说明菌株 DW-1 可以降解 3-羟基吡啶。

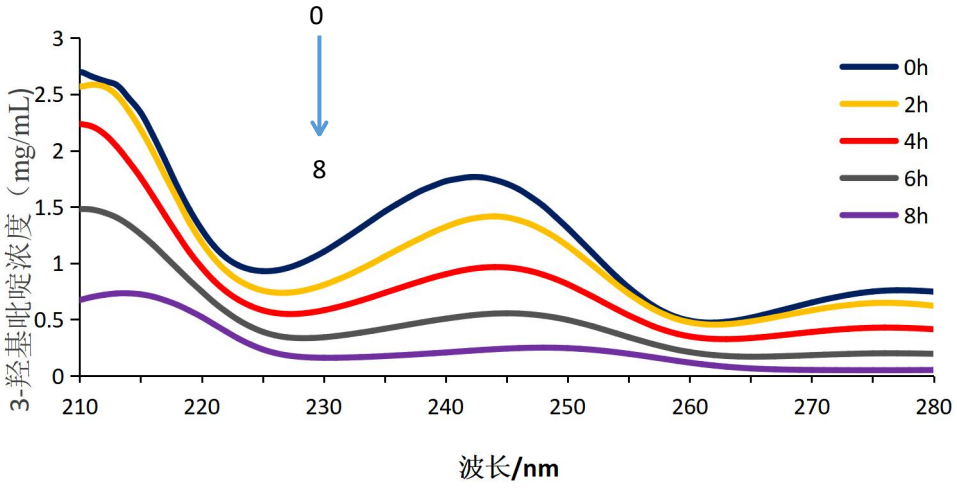

图10 3-羟基吡啶的扫描波长

3 讨论

本实验从辽河口污染的土壤中经过多轮富集培养，筛选到的一株能够以 3-羟基吡啶为唯一碳源生长的菌株 DW-1，经 16SrRNA 鉴定以及生理生化性质和形态学观察可知该菌株为 *Pseudomonas sp.*。通过实验发现培养的 pH 为 8，培养温度为 30℃时，菌株 DW-1 的降解活性较好，降解 3-羟基吡啶的效率最高。3-羟基吡啶的初始浓度过高会抑制菌株 DW-1 的生长，而初始浓度过低则不适合菌株的大量生长，菌株 DW-1 在 1 mg/mL 的浓度中生长较好。菌株 DW-1 的底物降解范围窄，能够专一性的用来降解 3-羟基吡啶。同时菌株 DW-1 在有氨苄青霉素的抗性中能够良好的生长，在卡那霉素中也可生长。通过休止细胞反应发现 3-

羟基吡啶的浓度随着菌株 DW-1 的生长不断被降解，间接体现在在 250 nm 处的峰值不断降低。

本实验主要研究了菌株 DW-1 降解 3-羟基吡啶的最适条件，但是对于菌株 DW-1 是如何降解 3-羟基吡啶的分子机理还不太清楚，我们后续将会把菌株 DW-1 基因组送到生物公司进行测序，并通过对比分析找到降解 3-羟基吡啶的基因，并对基因功能进行验证。

参考文献

[1]陈佩，颜家保，余永登，等.一株吡啶降解菌的筛选及其降解性能. 化工环保. 2015，35（6）：566-575.

[2]王书萍， 庹保华，马雄风，颜家保,等.吡啶降解菌的分离及降解动力学研究. 燃料与化工. 2013 ，44（6）：41-49.

[3]胡春辉,徐青,于浩.*Arthrobacter sp.* 2PR 降解 2-羟基吡啶动力学及降解特性研究.中国生物工程杂志,2017,37(8):31-38.

[4] 徐军祥，杨翔华，姚秀清，等. 生物强化技术处理难降解有机污染物的研究进展. 化工环保，2007，27（2）：129 - 134.

[5] 刘江江，陈吕军，温东辉，等.泥浆体系中吡啶的生物降解研究.生态环境，2006，l5(6)：1180-1184.

[6] 李济吾，蔡晶晶． 链霉菌(*Streptomyces sp*．)对吡啶的降解特性. 化工环保，2008，28(1)：8－11.

[7] Mathur A K， Majumder C B， Chatterjee S， et al. Biodegradation of Pyridine by the New Bacterial Isolates S. putrefaciens and B. spHaericus. J Hazard Mater， 2008，157：335 - 343.

[8] Li L，Li Q G，Li F L，et al. Degradation of Carbazole and Its Derivatives by a *Pseudomonas sp.*Appl Microbiol Biotechnol，2006，73：941 - 948.

[9] Qiao Lin，Wen Donghua，Wang Jianglong. Biodegradation of Pyridine by *Paracoccus sp.* KT-5 Immobilized on Bamboo-Based Activated Carbon. Bioresour Technol，2010，101：5229 - 5234.

[10] Watson G K , Houghton C , Cain R B .Microbial metabolism of the pyridine ring — metabolic pathways of pyridine biodeg radation by soil bacteria .Biochem J , 1975 , 146 : 157 -172 .

[11] Sims G K , Sommers L E , Konopka A .Degradation of pyridine by Micrococcus luteus isolated from soil .Appl Environ Microbiol , 1986 , 51(5):963 -968 .

[12] Zefirov N S , Agapova S R , Terentiev P B , et al .Degradation of pyridine by Arthrobacter crystallopoietes and Rhodococcus opacus strains .FEMS Microbiol Lett , 1994 , 118 :71-74 .

[13] Lee S T , Rhee S K , Lee G M .Biodegradation of py ridine by freely suspended and immobilized *Pimelobacter sp* .. Appl Microbiol Biotechnol , 1994 , 41 :652 -657 .

致谢

本试验论文能够得以顺利完成，首先要感谢于浩老师和郭立忠老师给予我实验上的指导，这次实验并不是一直顺利的，在此期间，也遇到了很多困难，最后能够顺利的完成此次实验是在很多人的帮助以及自己的努力中完成的。在实验前期在实验室积累了一些实验基础，为本次实验的顺利完成有很大的帮助。在实验过程中，遇到了没有预料到的困难，令我感到烦躁和担忧，直到论文结束，或许本次实验的过程没有我想象的那般完美，但是在此期间，我也学到了很多，包括老师和师姐传授的经验，也使我对即将到来的研究生生活有了初步的了解和认知。试验室的师兄师姐在我毕业设计的过程给予我很多的帮助，其中最要感谢赵书雪师姐能够在她百忙时刻对我提出的问题给出解答，同时在实验遇到障碍时，和我一起分析错误的原因，找到解决的办法。老师和师兄师姐在我毕业设计的这段时间给予很多帮助和关照，在实验操作上的细心指导，以及传授给我的实验知识。除此之外，还要感谢试验室的同届毕业生们，在他们忙自己的毕业设计过程中也解答了我一些问题。这三年中得到众多老师的关心支持和帮忙。在此，再次向以上提到的所有的老师和同学致以崇高的敬意和衷心的感谢，祝老师工作顺利，万事如意！祝师兄师姐工作顺利，学业有成！

在感恩之余，我在此诚恳的请各位老师对我的论文进行批评和指正，使我认识到论文的不足并及时完善论文。

谨以此致谢最后，我要向百忙之中抽取时间对本文进行审阅的各位老师表示由衷的感谢。