

青岛农业大学

毕业论文(设计)

题目: 一个混合菌群的吡啶降解条件优化

姓名: 田博文

学院: 生命科学学院

专业: 生物技术

班级: 1402 班

学号: 20144114

指导教师: 于浩

2018 年 6 月 6 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

中文摘要:	I
Abstract:	II
引言	1
1 材料与方法	1
1.1 实验材料	1
1.1.1 土样及培养基	1
1.1.2 主要设备与试剂	2
1.2 筛选吡啶降解菌	2
1.2.1 吡啶降解菌的分离	2
1.2.2 吡啶优势菌的鉴定	3
1.3 研究培养条件对菌株降解吡啶的影响	3
1.3.1 培养基初始 pH 值	3
1.3.2 培养温度	3
1.3.3 浓度耐受范围及降解动力学研究	3
1.3.4 底物谱	4
1.3.5 抗生素耐受性	4
1.4 吡啶浓度的检测	4
2 结果与分析	4
2.1 菌株生理生化特性分析及 16S rDNA 基因序列分析鉴定	4
2.2 研究不同生长环境对菌株 PDC-1 吡啶降解能力及生长的影响	5
2.2.1 pH 对菌株 PDC-1 吡啶降解能力及生长的影响	5
2.2.2 温度对菌株 PDC-1 吡啶降解能力及生长的影响	7
2.2.3 吡啶初始质量浓度对菌株 PDC-1 吡啶降解能力及生长的影响	8
2.2.4 PDC-1 菌株对抗生素的抗性	10
2.2.5 研究菌株 PDC-1 的底物谱	10
2.3 研究不同生长环境对菌株 HPD-2 及生长的影响	11
2.3.1 菌株 HPD-2 的底物谱研究	11
2.3.2 HPD-2 菌株对抗生素的抗性	11
2.3.3 pH 对菌株 HPD-2 降解 2-羟基吡啶能力及生长的影响	12
2.3.4 温度对菌株 HPD-2 降解 2-羟基吡啶能力及生长的影响	14
2.3.5 菌株 HPD-2 浓度耐受范围及降解动力学研究	16
2.4 研究混合菌对吡啶的降解能力	18
2.4.1 底物浓度对混合菌吡啶降解能力及生长的影响	18
2.4.2 PDC-1 和混合菌的生长情况比较	20
3.讨论	22
参考文献	23
致谢	24

一个混合菌群的吡啶降解条件优化

生物技术

田博文

指导教师

于浩

摘要：吡啶是一种典型的含氮杂环污染物，易于在环境中扩散，具有致癌性、致畸性、致突变和难生物降解等特点，给人类和其他生物带来了巨大危害。微生物降解是去除环境中吡啶污染的最有效手段之一。本研究采用选择性富集培养的方法，从石油污染土壤样品中，分离得到降解吡啶污染物的高效降解菌群，并从中筛选获得 2 株吡啶降解菌命名为菌株 PDC-1 和 HPD-2，通过菌落形态观察和 16S rDNA 基因序列分析对菌株进行菌种鉴定，确定菌株 PDC-1 属于节杆菌属 (*Arthrobacter* sp.)，菌株 HPD-2 属红球菌属 (*Rhodococcus* sp.)。并对混合菌群和两株单菌的降解条件进行了研究，经过证明，混合菌群的降解效率要高于单菌落的降解效率，36 h 时混合菌株已经达到 71.48% 的降解率，而 PDC-1 和 HPD-2 仅仅达到 34.37% 和 14.04% 的降解率。通过对上述菌株培养条件的研究，为吡啶的降解提供了一定的理论依据。

关键词：吡啶；降解；混合菌群；菌株鉴定

Optimization of pyridine degradation conditions for a mixed cluster

Biotechnology
Tutor

Tian Bowen
Yu Hao

Abstract:Pyridine is a typical nitrogen-containing heterocycle contaminant that is easily diffused in the environment. It is carcinogenic, teratogenic, mutagenic, and difficult to biodegrade. It poses significant hazards to humans and other organisms. Microbial degradation is one of the most effective means to remove pyridine contamination from the environment. In this study, a selective enrichment culture method was used to separate high-efficiency bacterial groups that degraded pyridine contaminants from oil-contaminated soil samples. Two strains of pyridine degrading bacteria named PDC-1 and HPD-2 were obtained by screening them. The bacterial strains were identified by colony morphology observation and 16S rDNA gene sequence analysis. It was confirmed that the strain PDC-1 belonged to the genus *Arthrobacter* and the strain HPD-2 belonged to the genus *Rhodococcus*. The degradation conditions of the mixed bacteria and the two single bacteria were studied. It was proved that the degradation efficiency of the mixed bacteria group was higher than that of the single colony, and the mixed strain had reached a degradation rate of 71.48% at the 36th hour, while the PDC-1 and HPD-2 only reached degradation rates of 34.37% and 14.04%. By studying the culture conditions of the above strains, it provides a theoretical basis for the degradation of pyridine.

Key words: pyridine; degradation; Mixed flora; Identification strains

引言

含氮杂环化合物广泛应用于石油、食品、医药等行业。含氮杂环化合物在自然环境中分解缓慢，半衰期长，不容易被生物体降解^[1,4,5]。杂环化合物比非杂环化合物具有更高的毒性。作为一种具有广泛污染的难降解有机物，可能对生态系统和人类健康造成潜在的长期危害^[2,6]。

吡啶是一种典型的含氮杂环化合物，广泛应用于化工、制药、农药生产等行业，具有较强的毒性、致畸性、致癌性和难生物降解等特点^[3,9]。由于吡啶的水溶性和扩散性都较好，已成为土壤和废水中常见的污染物，吡啶污染会导致环境质量的下降，进而危害人类的身体健康^[4,8]。生物修复是解决这类污染物的有效方法。利用从环境中筛选的降解微生物能够有效去除环境和污水中的吡啶^[2,5]。

对于废水中吡啶的生物降解实验国内外已经有了大量报道，研究表明微生物可以有效去除废水中含有的吡啶。对于石油污染土壤中的吡啶，仅仅依靠土壤中原有菌群进行降解处理，短时间内很难达到理想的效果，所以可以通过添加特异性吡啶降解菌群进行生物强化降解^[10]。本实验从石油污染的土壤中筛选到了两株能以吡啶为唯一碳源、氮源和能源的菌株，以其为研究对象，研究菌株降解吡啶的最适温度、最适 pH 和最适的底物浓度，并对两株菌株的底物谱及抗性进行了研究。旨在找到降解吡啶的最适方法，从而降低吡啶类化合物对环境的污染，为吡啶污染土壤、水体的生物修复提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 土样及培养基

1) 样品：辽河河口受原油污染的距地表 3-6 cm 的土壤，呈黑褐色。

2) MSM 培养基

按照表 1 所列配方将药品配置好后调整 pH7.0；115℃湿热灭菌 30 min。固体培养基加 2%琼脂。

表 1 无碳 MSM 培养基（无菌蒸馏水 1000 mL）

药品	质量/g
K ₂ HPO ₄	12 g
KH ₂ PO ₄	10 g
Na ₂ SO ₄	2.0 g
NaCl	2.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g

3) LB 培养基

按照表 2 所列配方将药品配置好后调整 pH 值 7.0；121℃湿热灭菌 20 min。固体培养基加 2%琼脂。

表 2 LB 培养基（无菌蒸馏水 1000 mL）

药品	质量/g
胰蛋白胨	10 g
酵母粉	5 g
NaCl	10 g

1.1.2 主要设备与试剂

表 3 实验仪器设备

仪器名称	仪器型号	仪器厂家
高速冷冻离心机	GTR22-1	时代北利离心机有限公司（北京市）
高速微量离心机	D2012 Plus	安胜科技有限公司
双层全温震荡培养箱	QYC 2112	上海市福玛实验设备有限公司
高压蒸汽灭菌锅	MLS-3750	SANYO
超净工作台	SW-CJ-2FD	苏州市净化设备有限公司
PCR 仪	T100	BIO-RAD
紫外可见分光光度计	UV2310II	天美（Techcomp）
微培养箱	YHP-9162	姚氏仪器设备厂（Shanghai）

PCR 扩 增 相 关 试 剂：16S rDNA 扩 增 通 用 引 物：27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'，1492R 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。

吡啶（Pyridine），天津市科密欧化学试剂开发中心出品，含量≥99.5%。

1.2 筛选吡啶降解菌株

1.2.1 吡啶降解菌的分离

取 10 g 土壤样品加入到 250 mL 锥形瓶(内装 100 mL 无菌蒸馏水)中,置于 30℃、120 r/min 恒温摇床富集培养 24 h。静置沉淀后取 5 mL 上清液接种到装有 50 mL 无

菌 MSM 培养基的 250 mL 锥形瓶中,并向其中加入 0.5 mg/mL 吡啶, 30°C, 120 r/min 摇床培养 18~24 h。待培养液明显浑浊后转入无机盐培养基,以吡啶为唯一碳源、氮源和能源进行驯化培养,驯化中吡啶浓度依次为 0.5、0.8、1、1.5、2、2.5 mg/mL,待含吡啶培养液明显浑浊后进行稀释涂布分离。挑取边缘清晰,形态明显的单个菌落,反复划线纯化 3~4 次,得到 2 个能以吡啶为唯一碳源和能源进行生长代谢的菌株。

1.2.2 吡啶优势菌的鉴定

对获得的两株吡啶降解菌进行革兰氏染色、形态学观察、生理生化特性研究和 16S rDNA 序列鉴定。采用细菌 16S rDNA 扩增通用引物: 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R(5'-TACCTTGTTACGACTT-3'), 扩增体系(总体积 30 μ L)为:无菌超纯水 12 μ L, 上、下游引物各 1 μ L, 基因组 DNA 模板 1 μ L, TaqDNA 聚合酶 15 μ L。扩增条件: 95°C 预变性 5 min; (95°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 1.5 min 共 35 个循环); 72°C 延伸 5 min; 4°C 保存。琼脂糖凝胶电泳分离纯化后送至上海生工进行测序,测序结果采用 DNAsist 拼接后在 NCBI 中进行同源性比对。

1.3 研究培养条件对菌株降解吡啶的影响

1.3.1 培养基初始 pH 值

吡啶初始浓度为 1 mg/mL, 温度 30°C, 摇床转速 120 r/min, 接种量 2% 时, 不同初始 pH 值的环境对 PDC-1 降解吡啶的影响。采用 K_2HPO_4/KH_2PO_4 调整不同浓度 pH (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10), 间隔 12 小时取一次样, 测定光波 600 nm 下的 OD 值以及培养液中剩余吡啶的质量浓度。

1.3.2 培养温度

吡啶浓度 1 mg/mL、初始 pH8.0、接种量 2%、转速 120 r/min 时, 不同温度(25°C, 30°C, 37°C)环境对吡啶降解的影响。间隔 12 小时取一次样, 测定 OD₆₀₀ 值以及培养液中剩余吡啶的质量浓度。

1.3.3 浓度耐受范围及降解动力学研究

将新鲜菌液按 2% 的接种量接入不同浓度的吡啶-无机盐培养基中, 在温度 30°C, 初始 pH8.0, 摇床转速 120 r/min, 进行降解反应, 间隔 4 小时取样, 测定 OD₆₀₀ 值以及培养液中剩余吡啶的质量浓度。

1.3.4 底物谱

配置 MSM 培养基，添加不同的底物（2-羟基吡啶，3-羟基吡啶，4-羟基吡啶，2-甲基吡啶，3-甲基吡啶，4-甲基吡啶，吡啶），终浓度为 1 mg/mL，设 3 个平行。在温度 30°C，初始 pH8.0，摇床转速 120 r/min，接种量 2%条件下进行降解反应，培养 135 小时后测定 600 纳米下吸光值。

1.3.5 抗生素耐受性

配置含有吡啶的 MSM 培养基，终浓度为 1 mg/mL，添加不同的抗生素四环素(Tet)、氨苄青霉素(Amp)、庆大霉素(Gen)、卡纳霉素(Kan)、氯霉素(Chol)，每种 3 个平行，在温度 30°C，初始 pH8.0，摇床转速 120 r/min，接种量 2%条件下进行降解反应。

1.4 吡啶浓度的检测

取 1 mL 待测菌液装入 1.5 mL 离心管中，以 8,000 r/min 转速，将待测菌液离心沉淀 1 min；根据吡啶浓度大小，对上清液稀释处理；将稀释样品和超纯水混匀置于比色皿中，以超纯水调零，测定其在 260 nm 处的吸光度 A 值；根据吡啶标准曲线和稀释倍数确定吡啶浓度。

2 结果与分析

2.1 菌株生理生化特性分析及 16S rDNA 基因序列分析鉴定

对石油污染土壤进行采集，从中分离筛选能够以吡啶作为唯一碳源、氮源和能源的吡啶降解菌。经分离纯化和吡啶降解能力测定，得到两株能高效降解吡啶的细菌菌株，将其命名为 PDC-1 和 HPD-2。菌株 PDC-1 菌落形态呈圆形，淡黄色，不透明，边缘整齐。经革兰氏染色鉴定为革兰氏阳性菌。通过 16S rDNA 序列比对分析，确定菌株 PDC-1 属于节杆菌属 (*Arthrobacter* sp.)，菌株 HPD-2 属红球菌属 (*Rhodococcus* sp.)。（如图 1、图 2 所示）

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Arthrobacter crystallopoietes strain 2-16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2577	2577	99%	0.0	99%	KY368136.1
☐	Arthrobacter sp. ITCr03 partial 16S rRNA gene, isolate ITCr03	2571	2571	99%	0.0	99%	FR823397.1
☐	Arthrobacter sp. strain OBYHD1-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2569	2569	99%	0.0	99%	KX645729.1
☐	Arthrobacter crystallopoietes strain HT7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2569	2569	97%	0.0	99%	JQ687119.1
☐	Arthrobacter crystallopoietes strain MR-15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2567	2567	99%	0.0	99%	KY753214.1
☐	Arthrobacter crystallopoietes strain KUDC1702 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2567	2567	99%	0.0	99%	KC414682.1
☐	Arthrobacter crystallopoietes strain DSM 20117 chromosome, complete genome	2566	12830	99%	0.0	99%	CP018863.1
☐	Arthrobacter crystallopoietes strain M415 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2566	2566	99%	0.0	99%	KU285616.1
☐	Arthrobacter crystallopoietes strain M412 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2566	2566	99%	0.0	99%	KU285614.1
☐	Uncultured bacterium clone 5-666 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2566	2566	99%	0.0	99%	KC554275.1

图 1 PDC-1 序列比对

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Rhodococcus zopfii strain Z12-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2566	2566	97%	0.0	99%	KJ571108.1
☐	Rhodococcus sp. PNP-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2566	2566	97%	0.0	99%	FJ539088.1
☐	Rhodococcus sp. WTZ-R1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2560	2560	98%	0.0	99%	HM037906.1
☐	Rhodococcus sp. Y-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2560	2560	97%	0.0	99%	HM008918.1
☐	Rhodococcus sp. IBT2679-024 gene for 16S rRNA	2560	2560	97%	0.0	99%	AB010902.1
☐	Rhodococcus zopfii strain DSM 44108 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2560	2560	97%	0.0	99%	NR_041775.1
☐	Rhodococcus sp. strain P8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2556	2556	97%	0.0	99%	MF062576.1
☐	Rhodococcus zopfii gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NCCP-312	2555	2555	97%	0.0	99%	AB734812.1
☐	Rhodococcus sp. BY44 partial 16S rRNA gene, strain BY44	2555	2555	97%	0.0	99%	FR690460.1
☐	Rhodococcus sp. strain DB33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2547	2547	98%	0.0	99%	KY056169.1

图 2 HPD-2 序列比对

2.2 研究不同生长环境对菌株 PDC-1 吡啶降解能力及生长的影响

2.2.1 pH 对菌株 PDC-1 吡啶降解能力及生长的影响

设置吡啶初始浓度 1 mg/mL，温度 30℃，摇床转速 120 r/min，接种量 2%时，不同初始 pH 值对 PDC-1 降解吡啶的影响。图 3 和图 4 显示了菌株 PDC-1 在不同 pH 值条件下菌体生长情况及对吡啶的降解。在 pH 分别为 7.0，8.0，9.0 条件下，菌株 PDC-1 随着培养时间的不断延长，培养基中菌株数量不断增加，OD₆₀₀ 值可以达到 1.5 以上，同时吡啶质量浓度逐渐下降，在第 45h 时降解率分别达到了 88.68%、97.92%、77.08%。然而，把菌株 PDC-1 培养在初始 pH 为 6.0，10.0 的培养基中，菌株的生长变得极为缓慢，对吡啶的降解能力也急剧降低，培养至第 45h 时培养基

中吡啶的质量浓度仍高达 1.3 mg/mL，降解率仅为 17.47%，OD₆₀₀ 值只能达到 0.035。将菌株 PDC-1 在这 5 个 pH 梯度环境下对吡啶的降解速率，进行排序依次为：pH8.0 > pH7.0 > pH9.0 > pH6.0 > pH10.0。菌株 PDC-1 在 pH8.0 培养条件下达到了最优生长速率，在吡啶质量浓度降至 0.033 mg/mL 时，菌体 PDC-1 的 OD₆₀₀ 也达到了高值。在不同 pH 条件下菌体生长速率与吡啶降解速率呈现出相同的趋势。以上结果说明，菌株对吡啶的降解与其生长成正比，该菌株在 pH8.0 的培养条件下降解吡啶效率最高，在 45h 即可达到 97% 以上的吡啶降解率（如图 5 所示），pH8.0 是菌株 PDC-1 的最适 pH 培养条件。

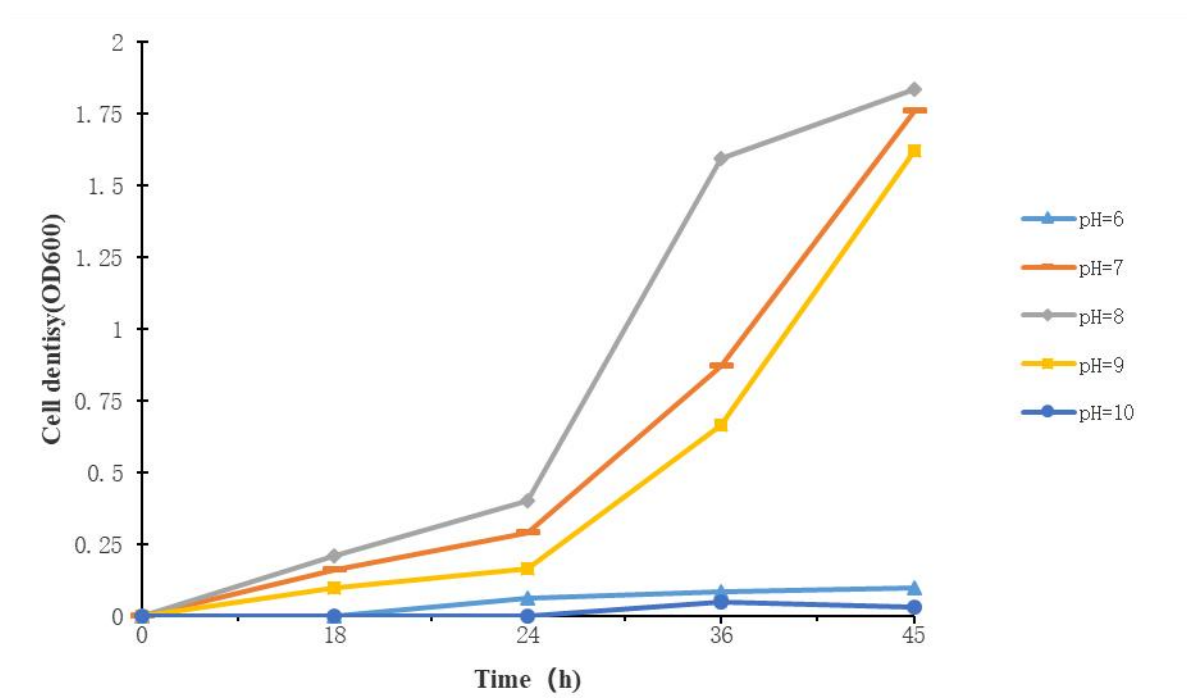


图 3 不同 pH 对菌株 PDC-1 生长的影响

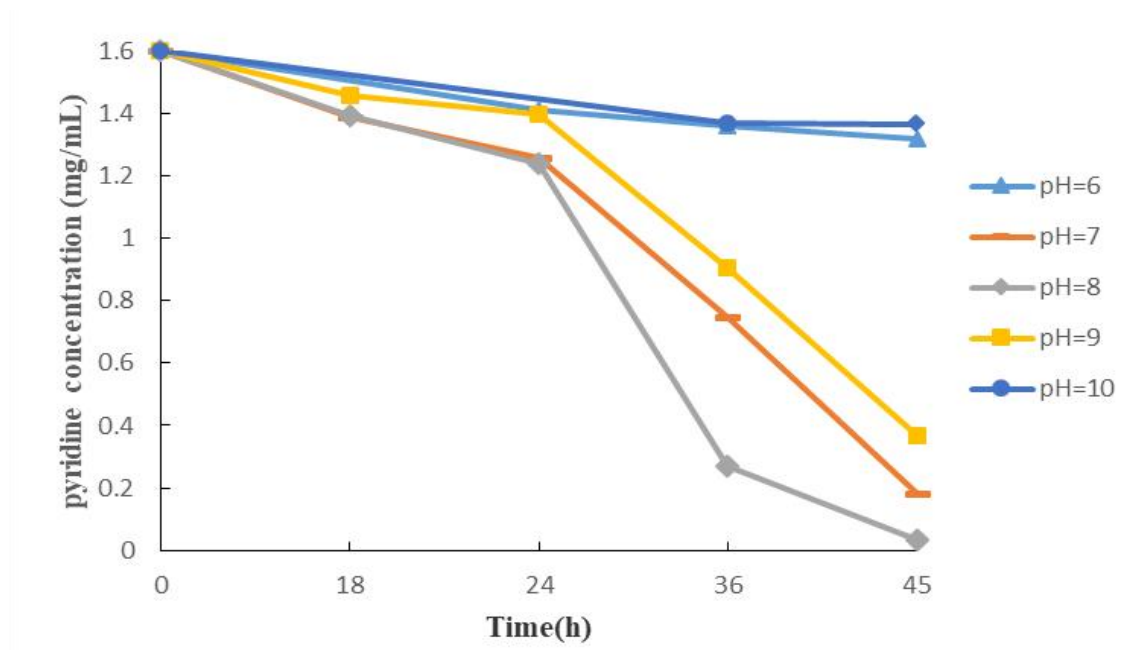


图 4 不同 pH 对 PDC-1 吡啶降解的影响

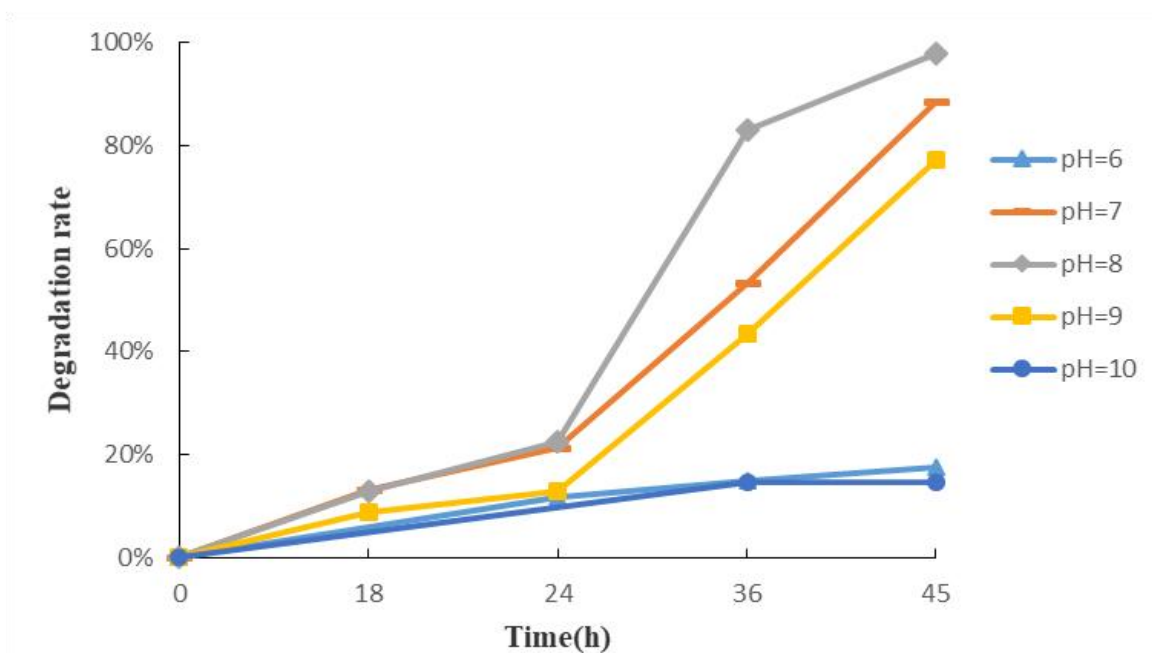


图 5 不同 pH 下 PDC-1 对吡啶的降解率

2.2.2 温度对菌株 PDC-1 吡啶降解能力及生长的影响

在吡啶浓度 1 mg/mL、初始 pH8.0、接种量 2%、转速 120 r/min 的条件下，分别试验了菌株 PDC-1 在 25、30 和 37°C 条件下的生长量和吡啶降解情况。如图 6 所示，在 25°C 培养条件下，菌株 PDC-1 对数生长期显著延长，菌体生长缓慢，在相同培养

时间下,菌体浓度明显低于 30℃培养的菌株。当培养温度升高至 30℃时,菌株 PDC-1 生长速率显著提高,到了 54 h 即进入稳定期。当培养温度上升到 37℃时,菌体的生长受到了极大的抑制,培养 72 h 时 OD₆₀₀ 值才达到 0.731。综上所述,菌株 PDC-1 在 30℃条件下更有利于生长。

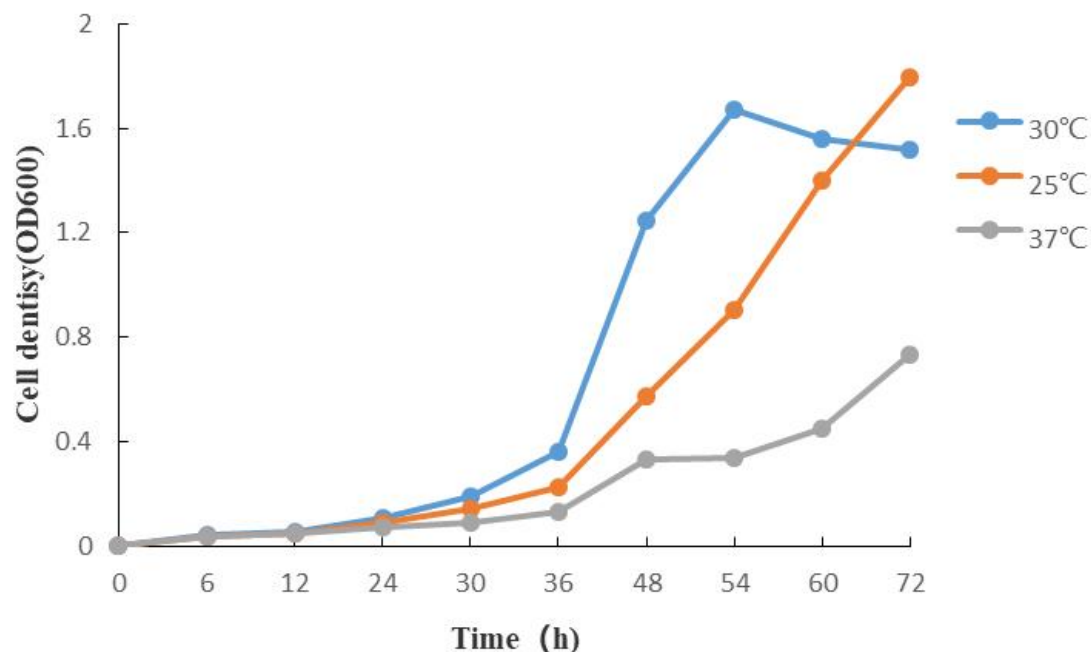


图 6 不同温度对 PDC-1 生长的影响

2.2.3 吡啶初始质量浓度对菌株 PDC-1 吡啶降解能力及生长的影响

将培养基中的吡啶初始质量浓度设置了 8 个梯度 (0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、3、4 mg/mL), 在最适培养条件下进行培养。如图 7 所示, 随着吡啶初始质量浓度的升高, 菌株 PDC-1 的对数生长期逐渐延长, 其菌液 OD₆₀₀ 值也逐渐升高。在吡啶初始质量浓度为 4 mg/mL 的培养基中, 菌株 PDC-1 的 OD₆₀₀ 值可达到 2.162。与此同时, 随着培养基中初始吡啶质量浓度的不断提高, 菌株 PDC-1 将吡啶的质量浓度降解至 0.1 mg/mL 以下所用的时间也会相应增加, 但最终都可降解掉 90% 以上的吡啶。在吡啶初始质量浓度分别为 0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、3、4 mg/mL 的培养基中, 降解率分别为 97%、96%、90%、89%、88%、96%、98%、99% (图 9), 降解吡啶所用的时间分别为 18、24、36、36、36、48、85、96 h。结果得出, 虽然任一浓度梯度都可以达到 90% 以上降解率, 但是为了在最短时间内达到最优的降解率, 吡

吡啶初始质量浓度为 2 mg/mL 是菌株 PDC-1 降解吡啶的最适底物浓度。

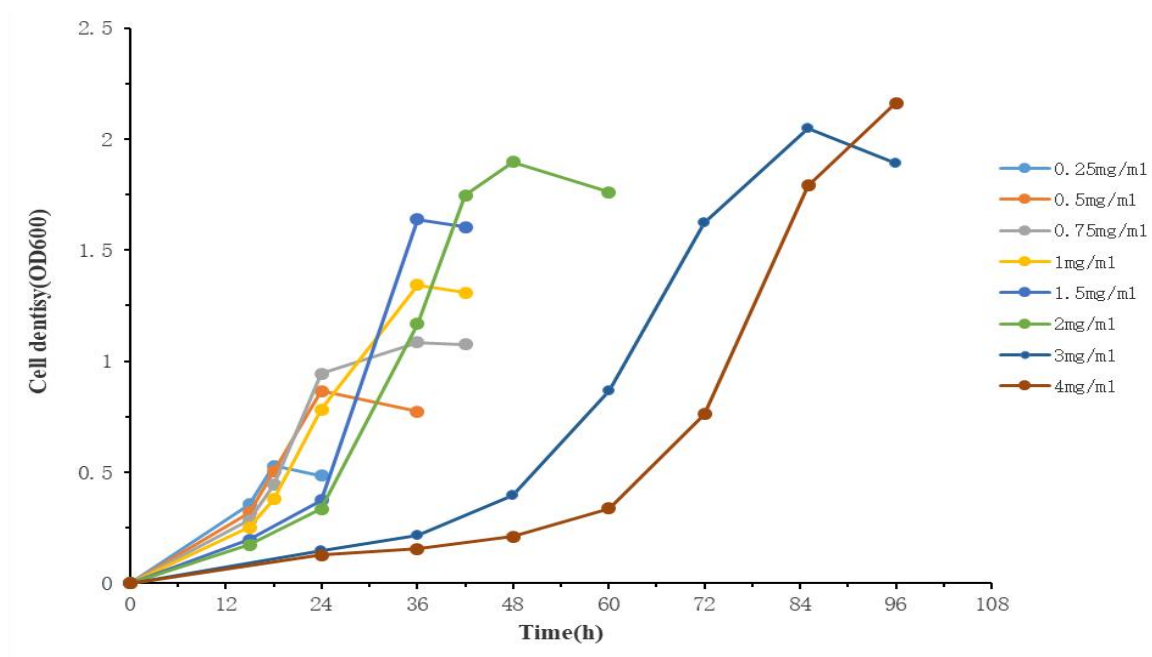


图 7 不同底物浓度对 PDC-1 生长的影响

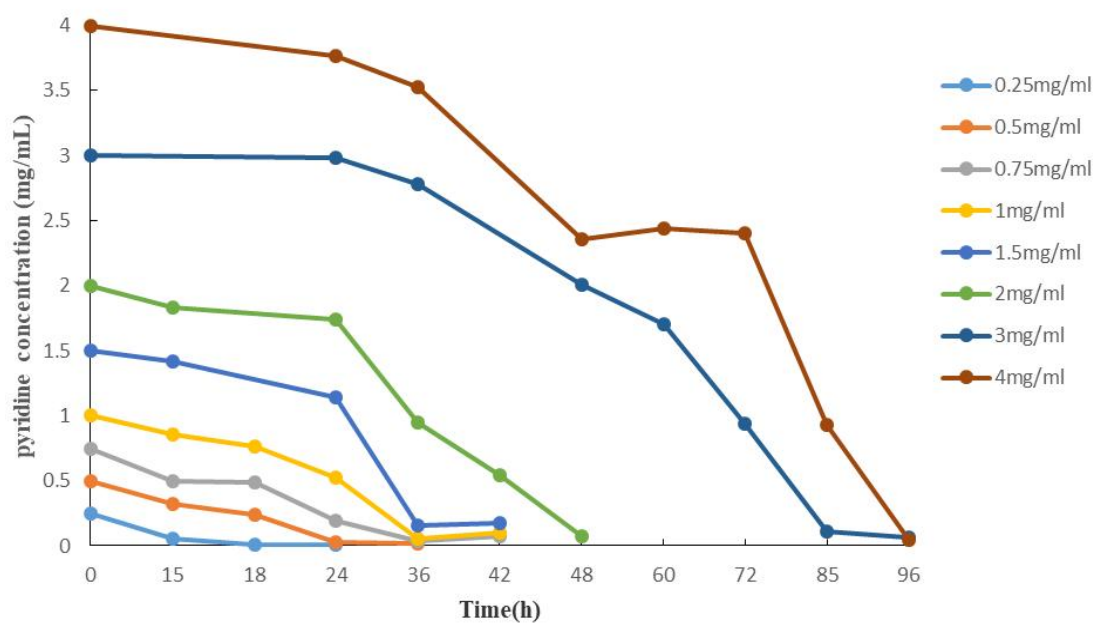


图 8 不同初始浓度中 PDC-1 对吡啶降解的影响

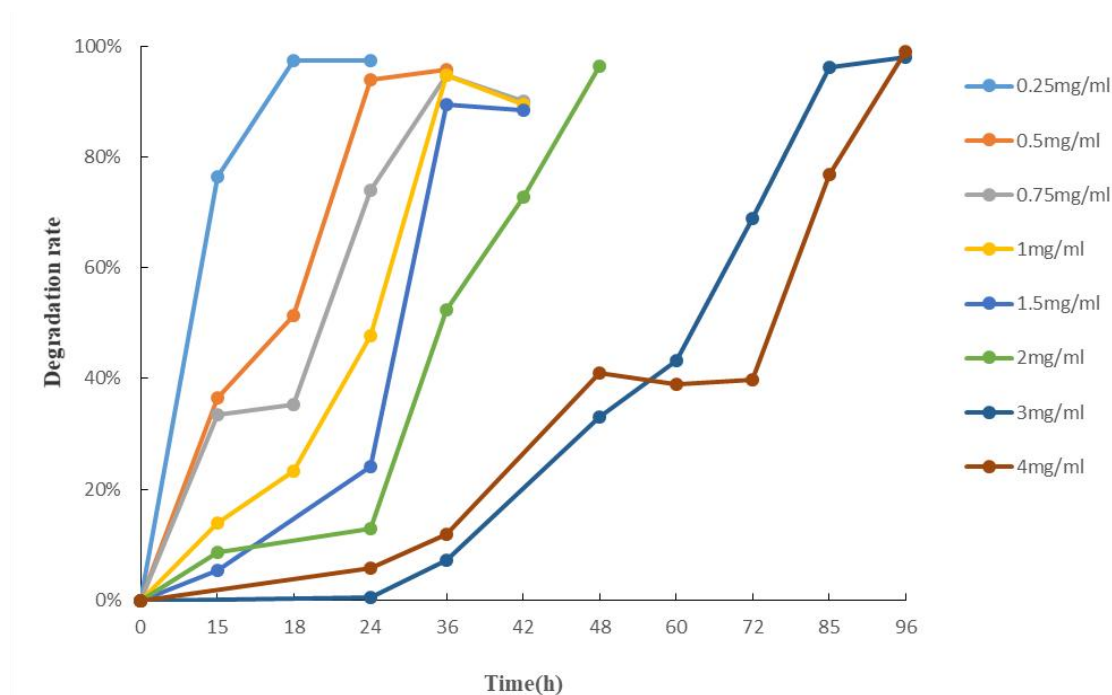


图 9 不同初始浓度下 PDC-1 对吡啶的降解率

2.2.4 PDC-1 菌株对抗生素的抗性

为了研究菌株 PDC-1 对抗生素的抗性,将新鲜菌株 PDC-1 接种到含千分之一不同抗生素四环素(Tet)、氨苄青霉素(Amp)、庆大霉素(Gen)、卡纳霉素(Kan)、氯霉素(Chol)的吡啶培养基中,吡啶浓度为 1 mg/mL,在最适生长条件下(30℃, pH8.0, 摇床转速 120 r/min)培养一周,取样测量在 600 nm 下的吸光值,如下表所示。菌株 PDC-1 只能在 Kan 中进行生长。

表 4 PDC-1 对抗生素的抗性

抗生素	OD ₆₀₀
Kan	0.967
Amp	0.033
Gen	0.077
Chol	0.072
Tet	0.091

2.2.5 研究菌株 PDC-1 的底物谱

为了了解菌株 PDC-1 能在哪些底物上生长,将其放入不同底物中培养(吡啶, 2-甲基吡啶, 3-甲基吡啶, 4-甲基吡啶, 3-羟基吡啶, 4-羟基吡啶),终浓度为 1mg/mL,在最适生长条件下(30℃, pH8.0, 摇床转速 120 r/min)培养一周,培养 135 小时后测定 600 nm 下吸光值。如下表,菌株 PDC-1 只有在吡啶中生长。

表 5 PDC-1 的底物谱

底物	OD ₆₀₀
吡啶	1.182
2-甲基吡啶	0.036
3-甲基吡啶	0.032
4-甲基吡啶	0.031
2-羟基吡啶	0.026
3-羟基吡啶	0.025
4-羟基吡啶	0.039

2.3 研究不同生长环境对菌株 HPD-2 及生长的影响

2.3.1 菌株 HPD-2 的底物谱研究

将菌株放入含不同底物（吡啶，2-羟基吡啶，3-羟基吡啶，4-羟基吡啶，2-甲基吡啶，3-甲基吡啶，4-甲基吡啶，2-吡啶甲酸，4-吡啶甲酸，烟酸，烟酰胺）的无碳无机盐培养基中培养，终浓度为 1 mg/mL，培养 6 天后测定 600 nm 下吸光值。如下表。

表 6 HPD-2 的底物谱

底物	OD ₆₀₀
吡啶	0.845
2-羟基吡啶	1.404
3-羟基吡啶	0.045
4-羟基吡啶	0.064
2-甲基吡啶	0.054
3-甲基吡啶	0.053
4-甲基吡啶	0.057
2-吡啶甲酸	0.050
4-吡啶甲酸	0.045
烟酸	0.075
烟酰胺	0.071

由此表可以看出，菌株 HPD-2 在 2-羟基吡啶中生长的比在吡啶中生长的好，所以在接下来的试验中菌株 HPD-2 改为在 2-羟基吡啶中培养。

2.3.2 HPD-2 菌株对抗生素的抗性

为了研究菌株 HPD-2 对抗生素的抗性，将新鲜菌株 HPD-2 接种到含不同抗生素四环素(Tet)、氨苄青霉素(Amp)、庆大霉素(Gen)、卡纳霉素(Kan)、氯霉素(Chol)的 2-羟基吡啶培养基中，在最适生长条件下培养一周，取样测量在 600 nm 下的吸光值，如下表所示。菌株 HPD-2 在 5 种抗生素中都停止生长，5 种抗生素都对菌株 HPD-2

有拮抗作用。

表 7 HPD-2 对抗生素的抗性

抗生素	OD ₆₀₀
Kan	0.038
Amp	0.024
Gen	0.034
Chol	0.058
Tet	0.096

2.3.3 pH 对菌株 HPD-2 降解 2-羟基吡啶能力及生长的影响

图 10 和图 11 显示了菌株 HPD-2 在不同 pH 值条件下对 2-羟基吡啶的降解及生长情况。在 pH 分别为 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 条件下, 随着培养时间的延长, pH 为 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 的培养基中 2-羟基吡啶质量浓度逐渐下降, 在第 36h 时降解率分别达到了 85.23%、97.29%、98.45%、98.84%、90.17%。然而, 把菌株 HPD-2 培养在初始 pH 为 4.0, 5.0, 6.0 的培养基中, 其对 2-羟基吡啶的降解能力急剧降低, 培养至第 36 h 时培养基中 2-羟基吡啶的质量浓度仍高达 0.84、0.76、0.43 mg/mL, 降解率仅为 15.19%、23.39%、56.67%, OD₆₀₀ 值只能达到 0.147、0.211、1.027。将菌株 PDC-1 在这 8 个 pH 梯度环境下对 2-羟基吡啶的降解速率, 进行排序依次为: pH10.0 > pH9.0 > pH8.0 > pH11.0 > pH7.0 > pH6.0 > pH5.0 > pH4.0。从结果得出, 菌株 HPD-2 在 pH10.0 培养条件下达到了最优生长速率, 在 2-羟基吡啶质量浓度降至 0.011 mg/mL 时, 菌体 HPD-2 的 OD₆₀₀ 也达到了高值。在不同 pH 条件下菌体生长速率与底物降解速率呈现出相同的趋势。以上结果说明, 菌株对 2-羟基吡啶的降解与其生长成正比, 该菌株在 pH10.0 的培养条件下降解 2-羟基吡啶效率最高, 在 36h 即可达到 98.84% 以上的底物降解率 (如图 12 所示), 菌株 HPD-2 适合生存在碱性环境下。

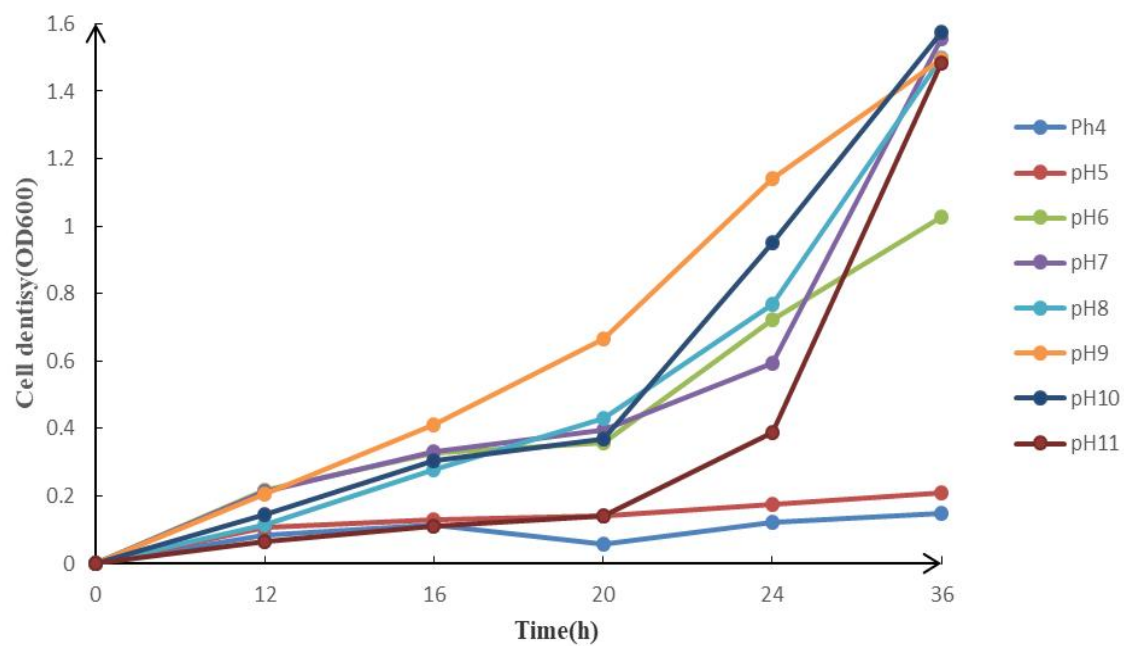


图 10 不同 pH 对 HPD-2 生长的影响

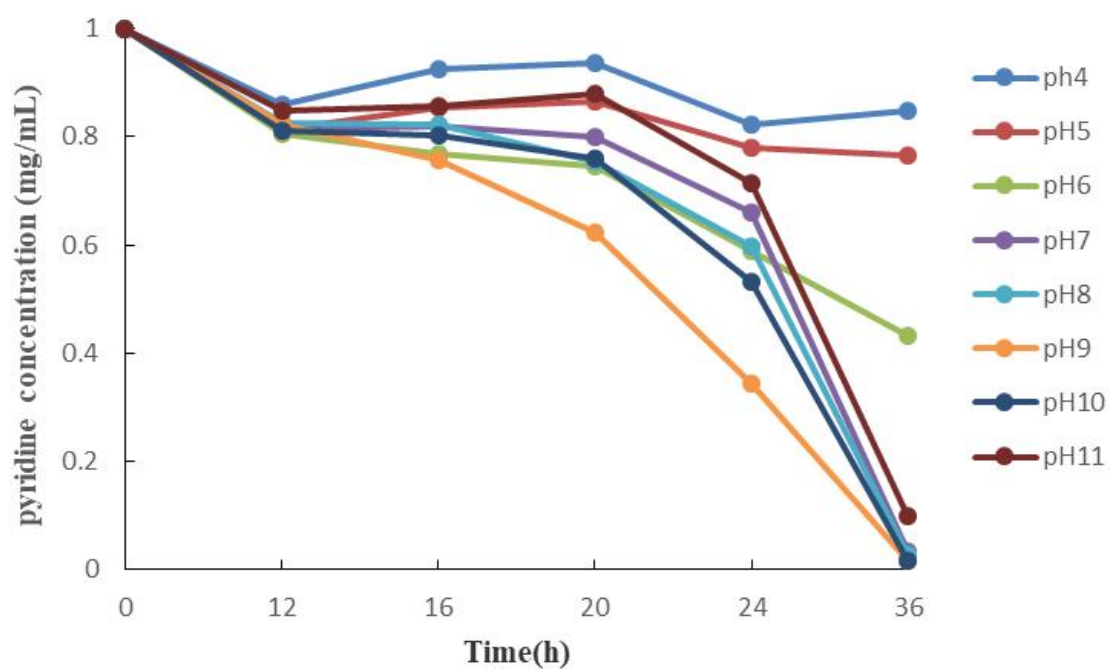


图 11 不同 pH 对 HPD-2 底物降解的影响

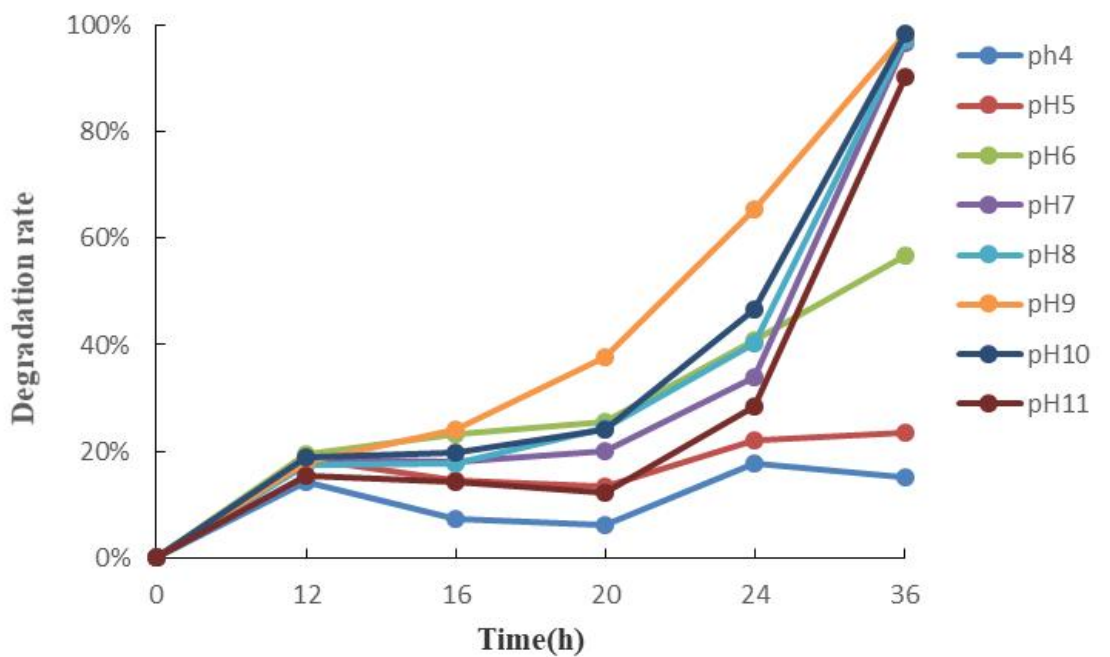


图 12 不同 pH 下 HPD-2 对底物的降解率

2.3.4 温度对菌株 HPD-2 降解 2-羟基吡啶能力及生长的影响

在初始底物浓度 1 mg/mL、初始 pH8.0、接种量 2%、转速 120 r/min 的条件下，分别试验了菌株 HPD-2 在 25、30 和 37°C 条件下的生长量和吡啶降解情况。由图 13 可知，菌株 HPD-2 降解 2-羟基吡啶能力受温度的影响，30°C 菌株降解能力最好。25°C 时温度低，菌株 HPD-2 对数生长期显著延长，代谢活动迟缓，降解率低，在相同培养时间下，菌体浓度明显低于 30°C 培养条件。随着温度升高至 30°C 左右，吡啶降解率增加；当温度进一步升高至 37°C，菌株 HPD-2 生长速率要比 25°C 时要快，但跟 30°C 相比略有差距，其达到的高 OD₆₀₀ 值和 30°C 培养条件下的菌液 OD₆₀₀ 值相当。因此菌株 HPD-2 的最佳培养温度选择为 30°C。

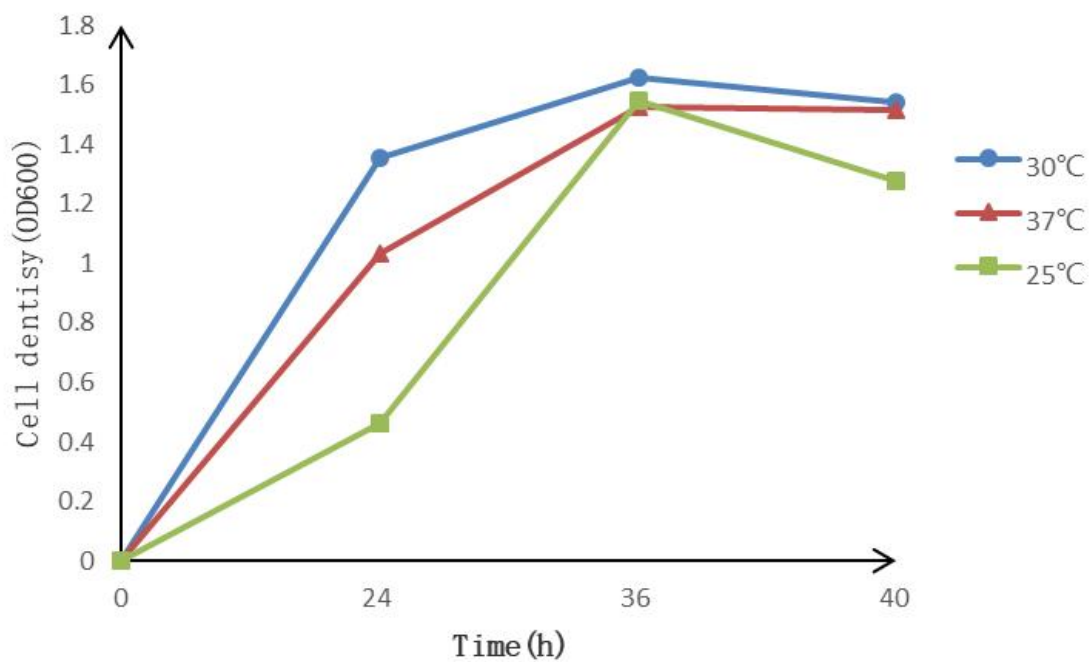


图 13 不同温度对菌株 HPD-2 生长的影响

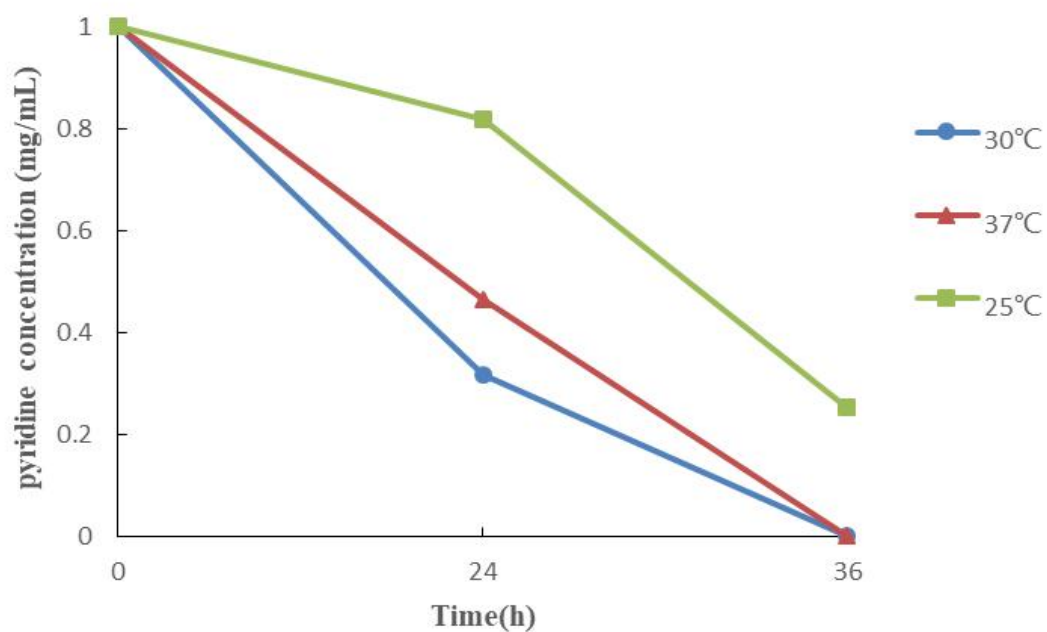


图 14 不同温度下菌株 HPD-2 对底物降解的影响

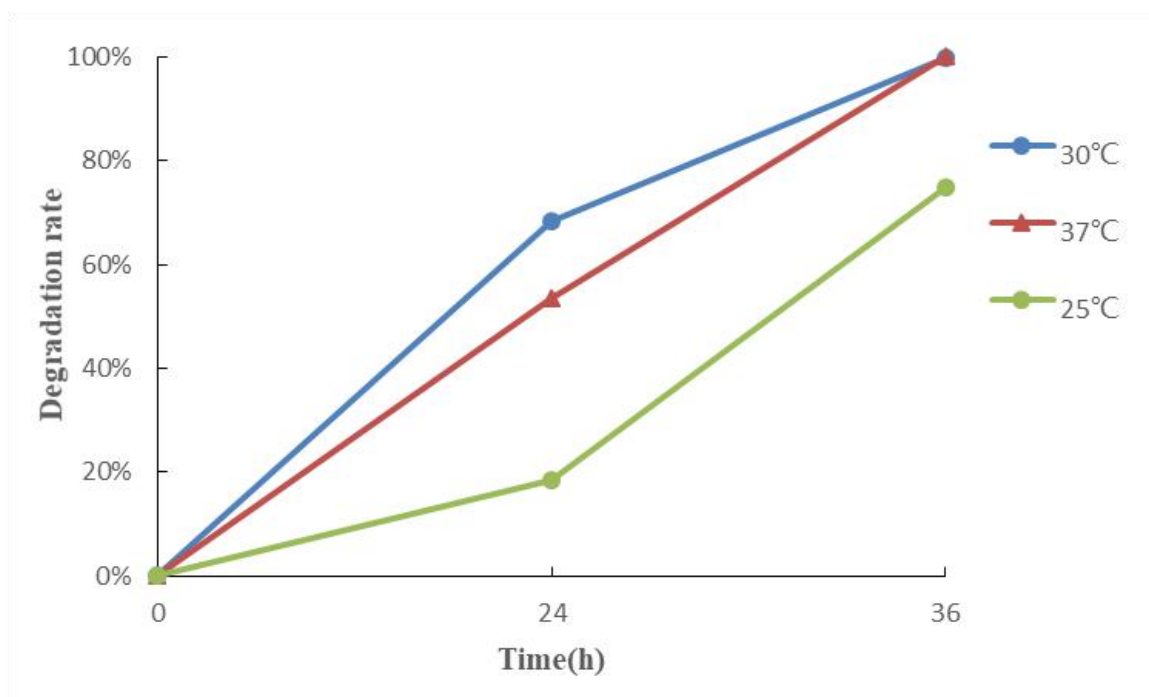


图 15 不同温度下菌株 HPD-2 对底物的降解率

2.3.5 菌株 HPD-2 浓度耐受范围及降解动力学研究

为了验证菌株 HPD-2 的 2-羟基吡啶降解量，培养基中的底物初始质量浓度设置了 10 个梯度 (0.1、0.25、0.5、0.75、1、1.25、1.5、2、3、4 mg/mL)。如图 16 所示，底物质量浓度越低，菌株 HPD-2 进入稳定期所需的时间越短，底物质量浓度为 0.1 mg/mL 时，菌株仅仅 16 h 即进入稳定期。随着底物质量浓度的升高，菌株 HPD-2 的对数生长期也逐渐延长，且菌液 OD₆₀₀ 值也逐渐升高。在 2-羟基吡啶初始质量浓度为 4 mg/mL 的培养基中，菌株 HPD-2 的 OD₆₀₀ 值可达到 5.187 (图 16)。与此同时，随着培养基中底物初始质量浓度的不断提高，菌株 HPD-2 将其质量浓度降解至 0.1 mg/mL 以下所用的时间也会相应延长，大多数都可达到 95% 以上的降解率。在吡啶初始质量浓度分别为 0.1、0.25、0.5、0.75、1、1.25、1.5、2、3、4 mg/mL 的培养基中，菌株 HPD-2 降解掉 95% 以上 2-羟基吡啶所用的时间分别为 16、24、36、36、36、36、44、48、60、60 h (图 18)。结果得出，所有浓度梯度的 2-羟基吡啶的培养基都可以达到 95% 以上降解率，但是为了在最短时间内达到最优的降解率，吡啶初始质量浓度为 1.5 mg/mL 是菌株 HPD-2 降解 2-羟基吡啶的最适底物浓度。

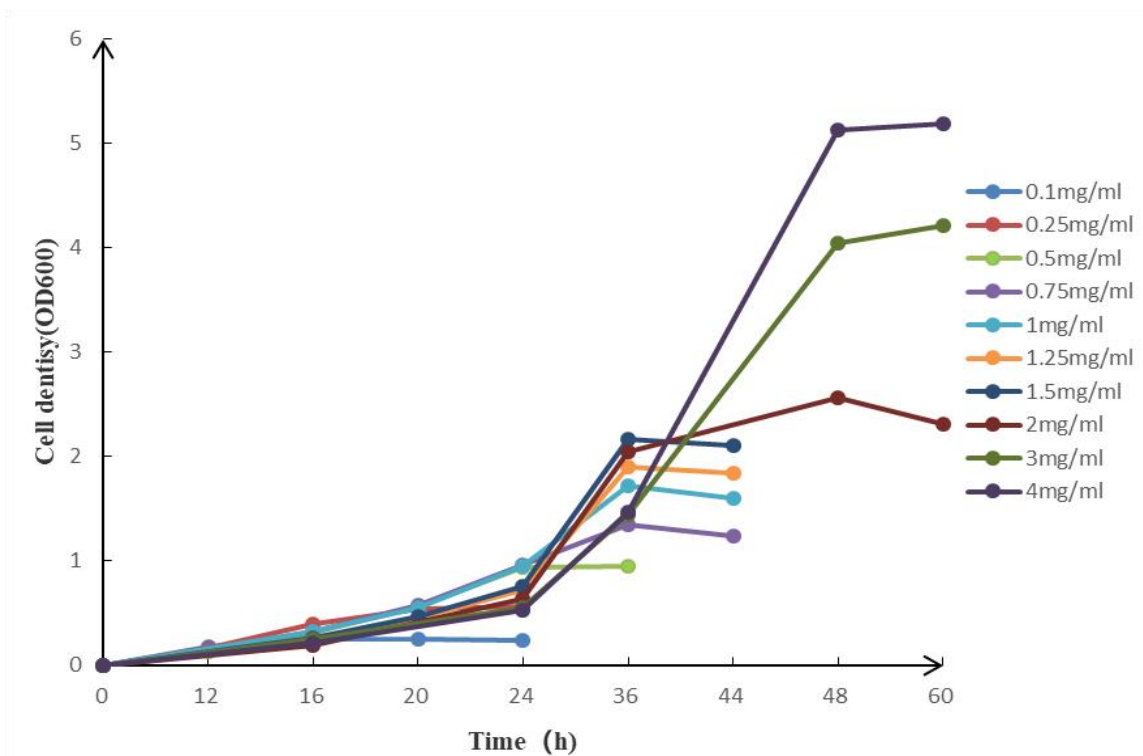


图 16 不同浓度底物对菌株 HPD-2 生长的影响

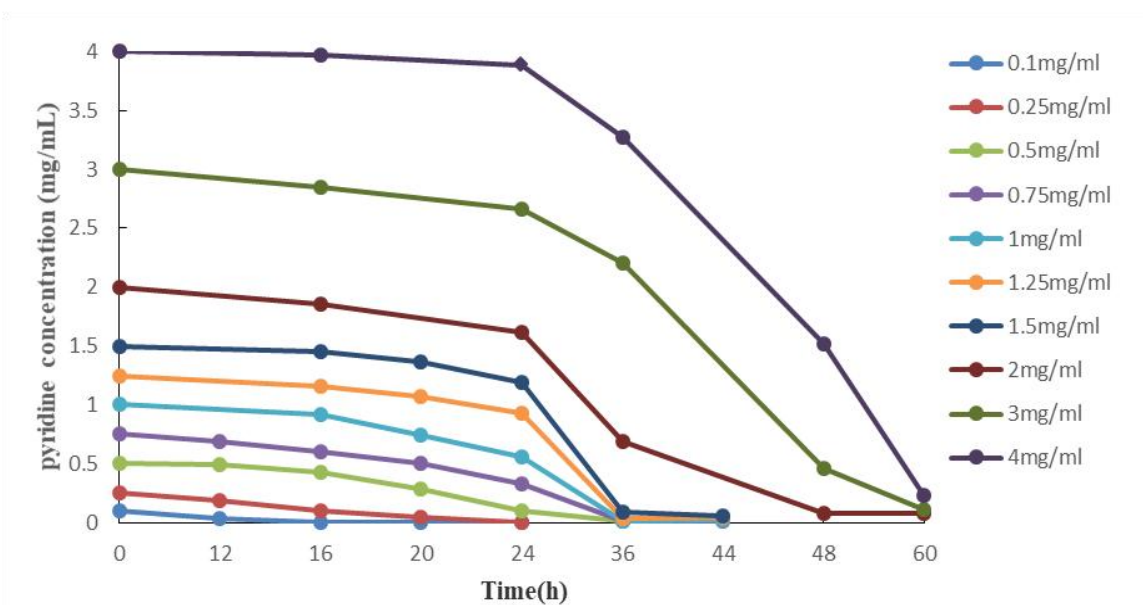


图 17 不同初始浓度中 HPD-2 对底物降解的影响

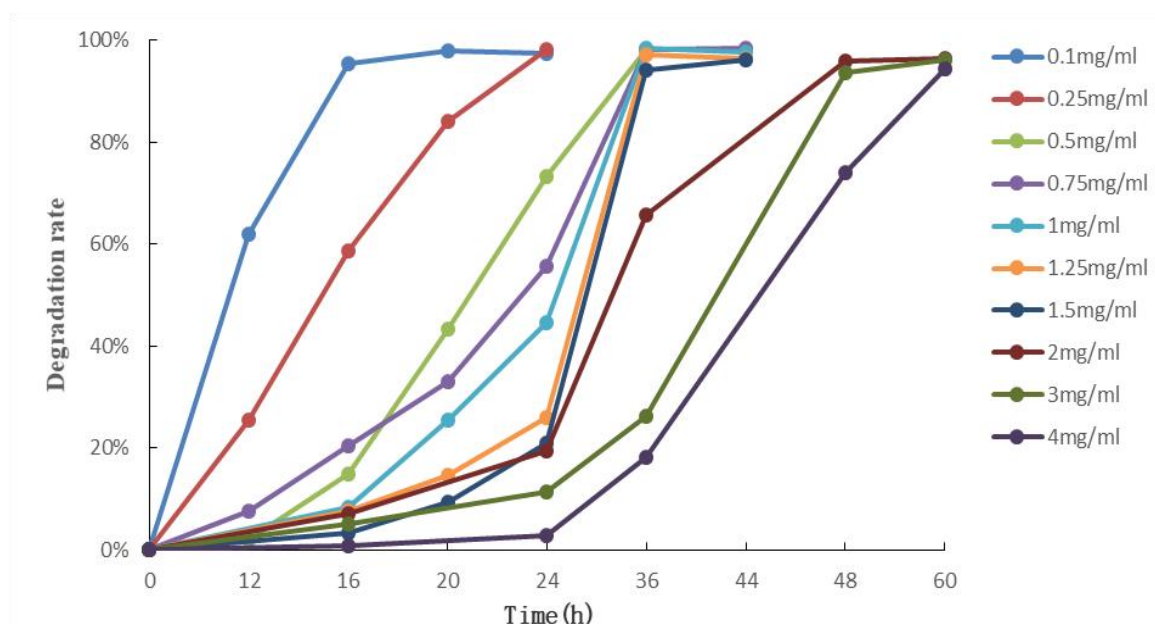


图 18 不同初始浓度下 HPD-2 对底物的降解率

2.4 研究混合菌对吡啶的降解能力

为了寻找降解吡啶的最优条件，探究两株单菌降解吡啶能力强还是混合菌降解吡啶能力强，将上述得到的两株单菌按照 1:1 的菌数混合，研究混合菌对吡啶的降解能力。

2.4.1 底物浓度对混合菌吡啶降解能力及生长的影响

为了验证混合菌的吡啶降解量，培养基中的底物初始质量浓度设置了 9 个梯度（0.1、0.25、0.5、0.75、1、2、3、4、5 mg/mL）。如图 19 所示，底物质量浓度越低，混合菌群进入稳定期所需的时间越短，底物质量浓度为 0.1 mg/mL 时，菌株仅仅 21 h 即进入稳定期。随着底物质量浓度的升高，混合菌群的对数生长期也逐渐延长，且菌液 OD₆₀₀ 值也逐渐升高。在吡啶初始质量浓度为 5 mg/mL 的培养基中，菌株 HPD-2 的 OD₆₀₀ 值可达到 2.059（图 19）。与此同时，随着培养基中底物初始质量浓度的不断提高，混合菌群将其质量浓度降解至 0.01 mg/mL 以下所用的时间也会相应延长，且大多数都可达到 95% 以上的降解率。在吡啶初始质量浓度分别为 0.1、0.25、0.5、0.75、1、2、3、4、5 mg/mL 的培养基中，降解率分别为 95%、95%、100%、100%、98%、100%、100%、100%、100%，吡啶降解所用的时间分别为 26、31、34.5、38、48、61、79、97、121 h（图 21）。结果得出，所有浓度梯度的吡啶的培养基都可以达到 95% 以上降解率，但是为了在最短时间内达到最优的降解率，吡啶初始质

量浓度为 2 mg/mL 是混合菌株降解吡啶的最适底物浓度。而之所以降解时间长，是因为此次使用的是处于衰退期的菌株，导致前期生长缓慢。

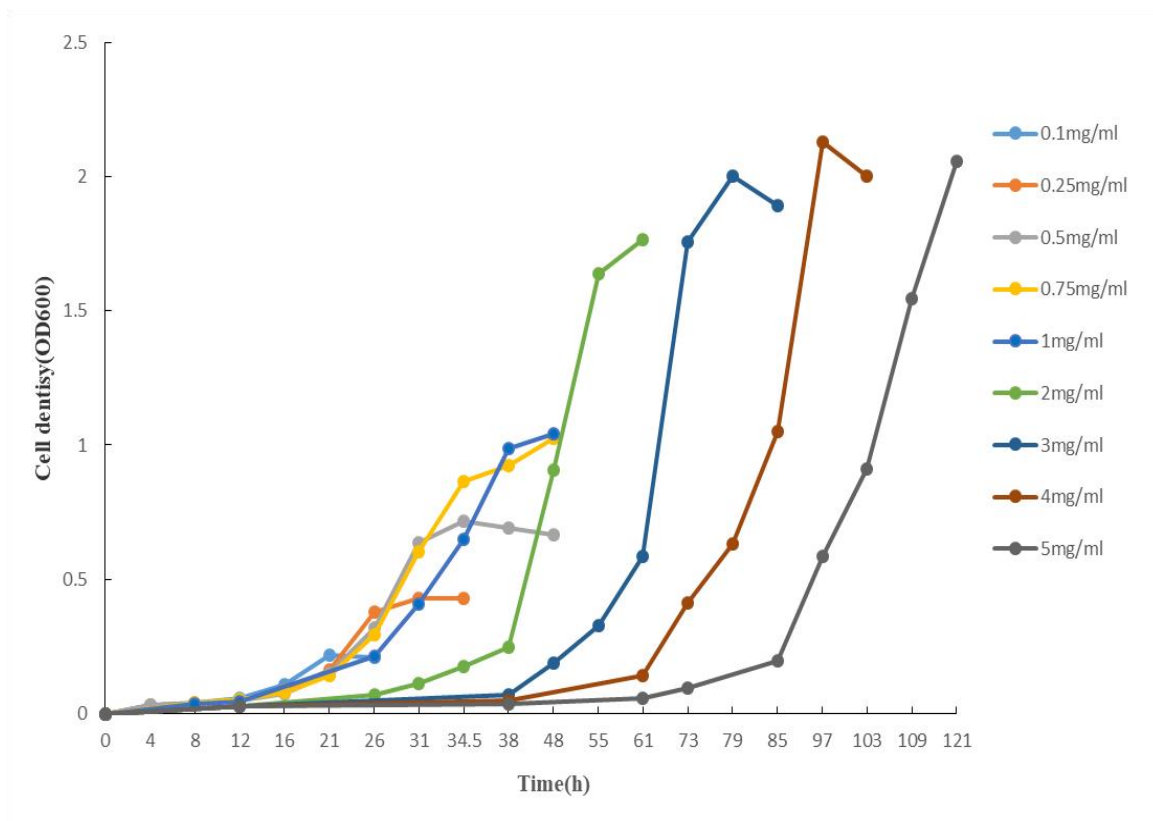


图 19 不同初始浓度对混合菌生长情况的影响

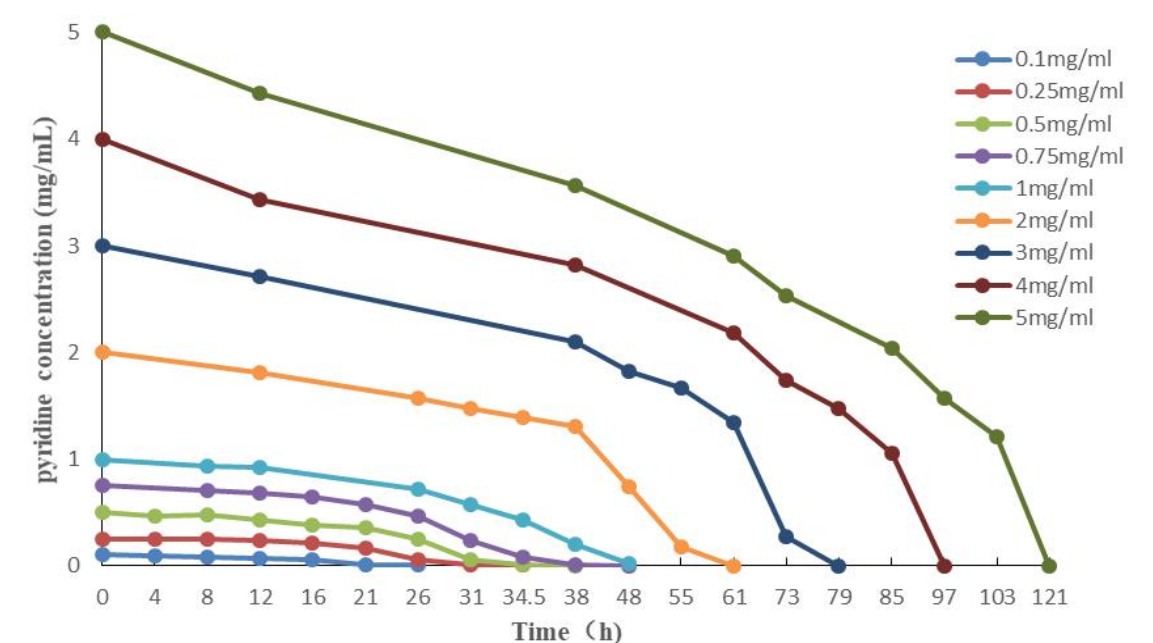


图 20 不同初始浓度中混合菌对吡啶降解的影响

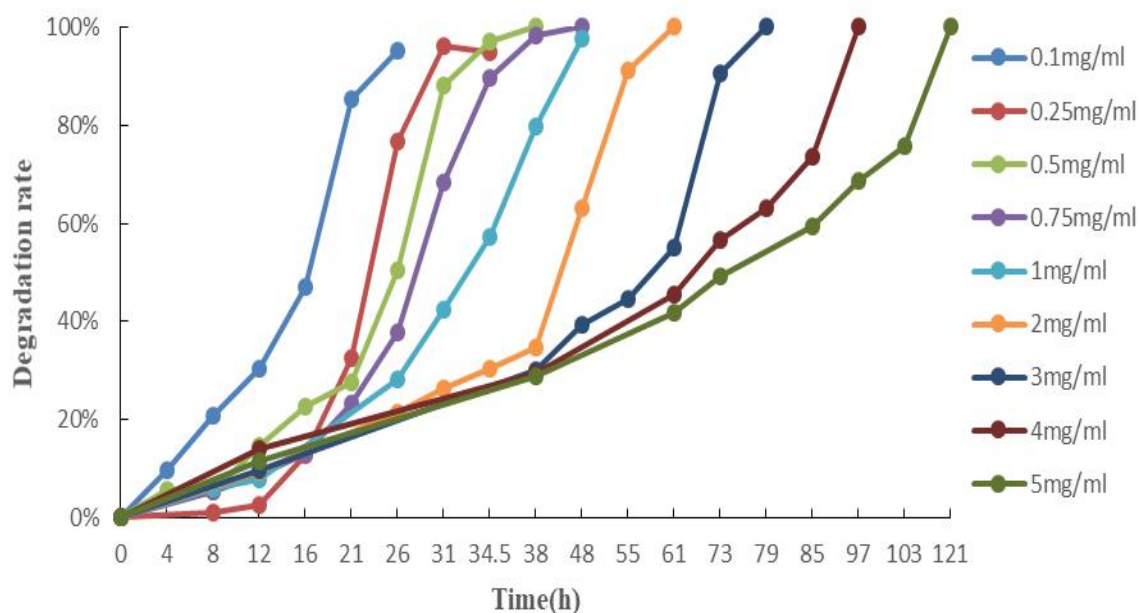


图 21 不同初始浓度下混合菌对吡啶的降解率

2.4.2 PDC-1、HPD-2 与混合菌的生长情况比较

取相同生长周期的新鲜单菌 PDC-1, HPD-2 和混合菌群按 2% 的接种量接种到以吡啶为唯一碳源和能源的无机盐培养基中, 在最适培养条件下 (温度 30°C, pH8.0, 摇床转速 120 r/min) 培养, 间隔一定时间取一次样, 测定 OD₆₀₀ 值以及培养液中剩余吡啶的质量浓度, 并计算降解率。

结果如图 22 所示, 相同培养时间时混合菌要比 PDC-1、HPD-2 生长的更加快速, 到第 36 小时即进入生长高峰, PDC-1 和 HPD-2 的对数生长期要比混合菌的长, 但最终都能达到跟混合菌一样的 OD 值。从吡啶降解率来看, 混合菌在生长前期降解速率极快, 但进入稳定期后变得迟缓甚至停滞, 虽说最终有 89.40% 的降解率, 略低于 PDC-1 的 99.22% 和 HPD-2 的 96.21% (如图 23 和 24)。原因可能是菌株在生长过程中受到了环境的影响。

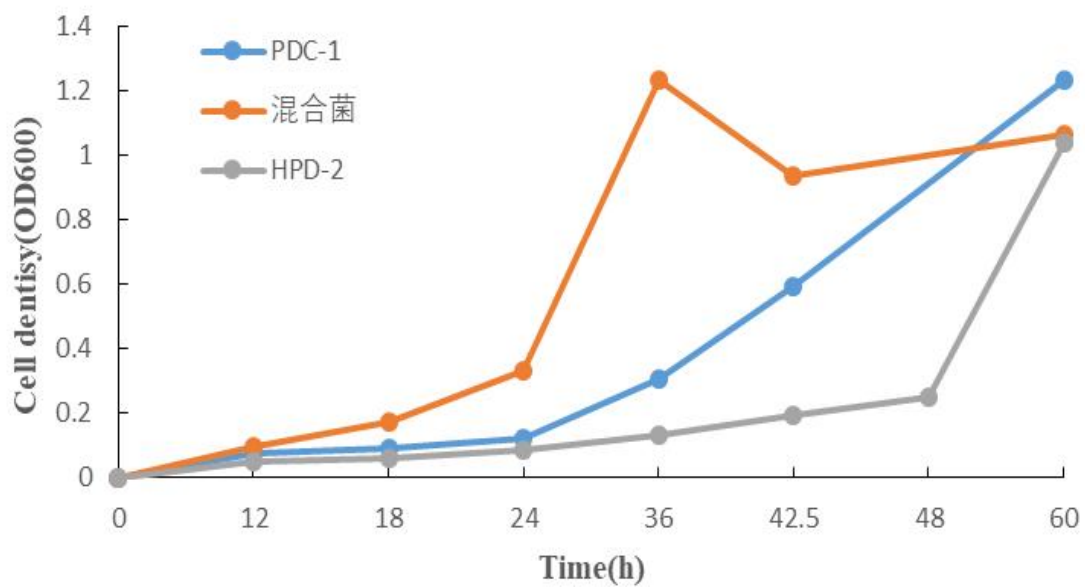


图 22 PDC-1、HPD-2 和混合菌的生长曲线

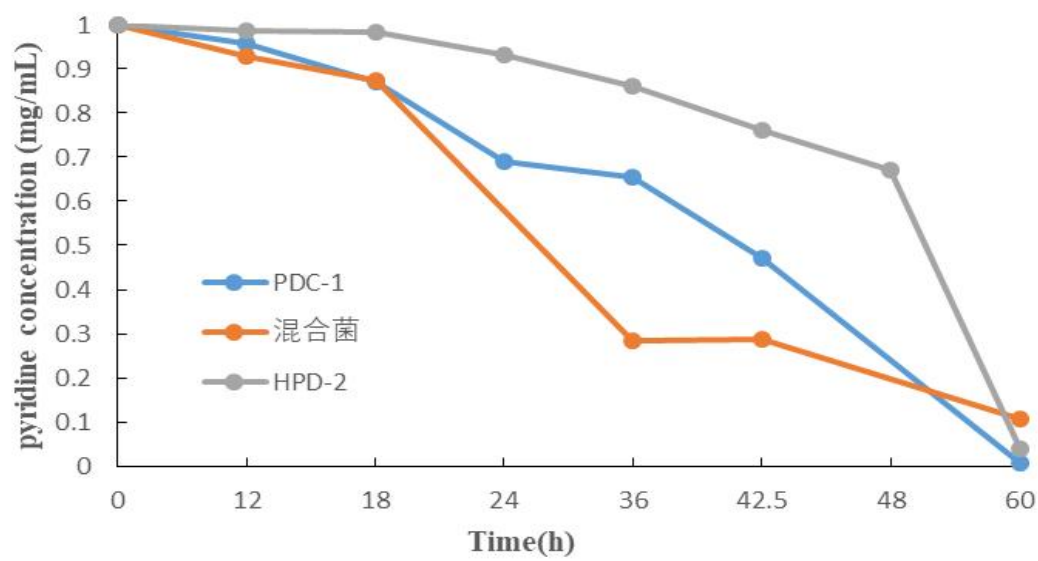


图 23 PDC-1、HPD-2 和混合菌的吡啶质量浓度变化

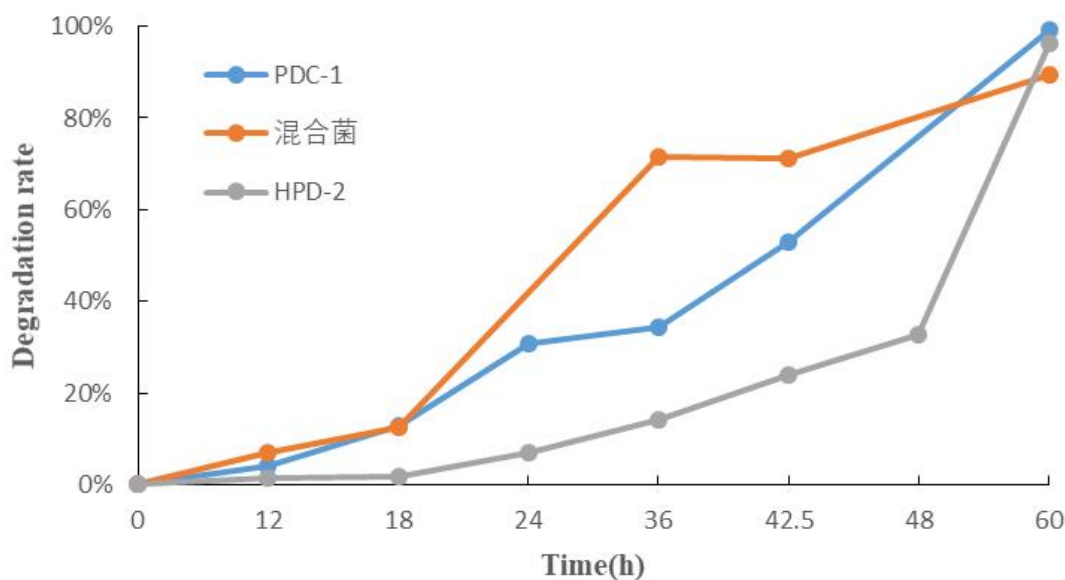


图 24 PDC-1、HPD-2 和混合菌的吡啶降解率

3 讨论

本实验从石油污染过的土壤中筛选到了一个吡啶降解菌群，从该菌群中分离得到了两株可以以吡啶为唯一碳源、氮源和能源进行生长和繁殖的菌株，分别命名为 PDC-1 和 HPD-2，通过 16S rDNA 序列比对分析，确定菌株 PDC-1 属于节杆菌属 (*Arthrobacter* sp.)，菌株 HPD-2 属红球菌属 (*Rhodococcus* sp.)。经过一系列的实验表明，菌株 PDC-1 的培养条件为，培养基初始 pH8.0，初始底物浓度 2 mg/mL，温度 30℃，摇床转速 120 r/min 时菌株生长活性最好，降解率最高，菌株 HPD-2 在培养条件为，初始 pH10.0，初始底物浓度 1.5 mg/mL，温度 30℃时菌株生长活性最好，降解率最高。通过查阅参考文献发现，王书萍等筛选到的菌株吡啶降解能力较强，在吡啶初始浓度为 4 mg/mL 的环境下，菌株的生长活性受到了较强的抑制作用，而我们筛选到的菌株在吡啶初始浓度 5mg/mL 环境下依然能降解 99% 以上的吡啶，只是生长周期受到了延长，但也只需要 4 天时间即可降解完全。甚至在之后的扩展实验中，将初始吡啶浓度提升到 10 mg/mL，菌株 PDC-1 依然能够进行有效的降解，可见，本实验筛选到的菌株吡啶降解能力高于大多数吡啶降解菌，是一株吡啶高效降解菌。将 PDC-1 和 HPD-2 混合之后得到的菌落降解吡啶的能力还在菌株 PDC-1 之上，并且混合菌群通常比单个细菌具有更强的环境适应能力，因此可以更好的应用于污染水体、土壤中吡啶的降解，可以为吡啶污染的生物修复提供优良菌种资源。

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,庾保华,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]乔琳,王建龙等.吡啶降解菌的生物降解特性.清华大学学报(自然科学版),2010,50(6):869-872.
- [4]王基成,张秀霞,房苗苗,等.两株吡啶降解菌的分离与鉴定.生态环境,2008,17(1):117-121.
- [5]孙庆华,柏耀辉,赵翠,等.*Shinella zoogloeoides* BC026 对吡啶的降解特性研究.环境科学,2008,29(10):2938—2943.
- [6]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.环境污染与防治,2006,28(9):658-661.
- [7]孙丽娟,李咏梅,顾国维.含氮杂环化合物的生物降解的研究进展.四川环境,2005,24(1):61-73.
- [8]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.
- [9]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,2006,15(6):1180-1184.
- [10]晋婷婷,任嘉红,张晖,孙莎,陈艳彬,白凤麟.一株吡啶高效降解菌的鉴定及其降解特性.生态环境学报,2016,25(7):1217-1224.
- [11]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.
- [12]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.
- [13]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.
- [14]Watson G K , Houghton C , Cain R B .Microbial metabolism of the pyridine ring — metabolic pathways of pyridine biodegradation by soil bacteria.Biochem J ,1975,146:157-172.
- [15]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.

致谢

本实验论文能够得以顺利完成，多亏来自各位老师和同学的贴心帮助，以及实验室提供了充足的器材跟药品。

首先，我要感谢于浩老师的亲切关怀和耐心指导，从论文的设计和实验的过程中遇到的困难和疑惑，于老师都给予我特别大的帮助，使我受益匪浅。于老师在科学实验中严谨的科学态度，渊博的理论知识，生活中和蔼可亲，为人尽职尽责，都是我们学习的榜样。在此，对于老师致以崇高的敬意和衷心的感谢。

其次，我要感谢实验室的赵书雪师姐。在我实验过程中，她也多次给予我帮助，帮我解决了很多我不懂的知识，多次询问我实验的进展和结果，帮助我度过了很多实验上的困难。

最后，感谢同实验室的其他同学在生活中对我的关心和实验过程中的帮助和支持，再次诚挚的感谢所有帮助我和鼓励我的老师和同学。