

邓冬梅,梁秀芬,李 晴,等. 1 株喹啉降解菌的筛选及其降解特性[J]. 江苏农业科学,2018,46(15):298-300.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.15.073

# 1 株喹啉降解菌的筛选及其降解特性

邓冬梅,梁秀芬,李 晴,何 劼,万美玲,吴桂珍,韦 烽,陈业祖,孙宇飞

(广西科技大学生物与化学工程学院/广西糖资源绿色加工重点实验室,广西柳州 545006)

**摘要:**以难降解有机物喹啉作为唯一碳源,从焦化废水活性污泥中筛选分离出 1 株喹啉降解菌 L-F。根据菌落和菌体形态的观察、革兰氏染色以及 16S rDNA 序列分析,初步鉴定 L-F 为普罗威登斯菌(*Providencia* sp.)。进一步通过单因素法考察喹啉初始浓度、pH 值及温度对 L-F 降解喹啉的影响,并通过响应面法确定 L-F 降解喹啉的最优环境条件。结果表明,喹啉初始浓度为 700 mg/L、温度 30 ℃、pH 值为 7.5 时,L-F 对喹啉的降解效果最好。在该最优条件下,50 h 时喹啉降解率达 80%。本研究结果可为土壤等环境中喹啉的生物降解实践提供理论依据。

**关键词:**喹啉;降解菌;筛选;降解特性

**中图分类号:** Q939.9;S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)15-0298-03

喹啉是一类降解性能很差的复杂有机物,是很多杀虫剂的主要成分,会导致土壤农药残留污染<sup>[1]</sup>。作为一种典型的氮杂环芳烃化合物,喹啉具有较大的毒性和间接的致突变性<sup>[2]</sup>,对环境有很大的潜在危害,应使污染土壤中的喹啉进行有效降解。目前喹啉的降解有物理、化学和生物方法,其中生物降解喹啉具有成本低、对环境无二次污染、易于操作等优点,是目前研究喹啉降解的热点<sup>[3]</sup>。自从从土壤中分离出能降解喹啉的莫拉氏菌(*Moraxella* sp.)<sup>[4]</sup>及假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)<sup>[5]</sup>菌株后,目前已有多种喹啉降解菌被分离,如红球菌(*Rhodococcus* sp.)<sup>[6]</sup>、假伯克霍尔德菌(*Burkholderia pickettii*)<sup>[7]</sup>、丛毛单胞菌属(*Comamonas* sp.)<sup>[8]</sup>、脱硫微菌(*Desulfobacterium indolicum*)<sup>[9]</sup>、白腐真菌<sup>[10]</sup>等。

为达到稳定高效的去除效果,菌株间的复配已成为共识,为此需要更多高效喹啉降解菌提供复配菌源。此外,环境因素也是实际处理工程中影响去除效果的主要因素。因此本研究希望通过筛选喹啉降解菌,并考察环境因素对降解菌的影响,以期生物固定化等方法去除环境中的喹啉提供菌源。

## 1 材料与与方法

### 1.1 试验材料

**1.1.1 菌株** 菌株筛选自柳钢焦化废水 A/O 生物处理系统的 O 池中活性污泥。

收稿日期:2017-04-14

基金项目:广西自然科学基金(编号:2017GXNSFBA198099);广西高校重点实验室开放课题(编号:2016TZYKF10);广西高校科学技术研究项目(编号:YB2014201);广西高等学校高水平创新团队及卓越学者计划资助(编号:桂教人[2014]7号);2016年广西国家级大学生创新创业训练计划(编号:201610594042);广西研究生教育创新计划项目(编号:GKYC201607)。

作者简介:邓冬梅(1980—),女,山东曹县人,博士,副教授,主要从事环境微生物研究。E-mail:deng-dongmei@163.com。

通信作者:孙宇飞,博士,副教授,主要从事环境微生物酶工程研究。Tel:(0772)2687033。E-mail:3893@163.com。

**1.1.2 培养基** 细菌富集培养使用 LB 培养基,包含 10 g/L 胰蛋白胨、3 g/L 牛肉膏、5 g/L NaCl,pH 值为 7.2~7.6。细菌分离和降解试验中,培养基为无机盐培养基(mineral salt medium,MSM)<sup>[11]</sup>,包含 4.26 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·0.2 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、0.02 g/L CaCl<sub>2</sub>·0.05 mg/L KI、2 mg/L MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O、0.2 mg/L CuSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O、2 mg/L ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、2.5 mg/L Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O、0.082 mg/L H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>、1 mg/L FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O,喹啉(根据需要加入),pH 值为 7.2~7.6。固体培养基为在液体培养基中投加 15 g/L 琼脂。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 菌种的驯化和分离** 取 5 mL 活性污泥,至 LB 培养基中富集培养,培养 24 h 后依次转移到含喹啉 50、100、200、300、400、500 mg/L 的 MSM 培养基中,30 ℃、120 r/min 各驯化培养 6 d。驯化后菌液经在 LB 培养基上涂布稀释分离及平板划线纯化后得到纯菌株,编号为 L-F。将 L-F 菌接种于 LB 培养基中富集培养,富集的纯菌保存在 15% 的甘油中,存于 -60 ℃ 冰箱中待用。

**1.2.2 16S rRNA 鉴定** 利用细菌鉴定的通用引物 27F 和 1492R<sup>[12]</sup>对菌液进行 PCR 片段基因扩增,引物由上海生工生物工程有限公司合成。反应体系(50 μL)包括 25 μL DNA 聚合酶 mix、菌液模板 4 μL、去离子水 17 μL、上下游引物各 0.5 μL。PCR 温度程序为:94 ℃ 预变性 8 min;94 ℃ 变性 1 min,58 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1 min,循环 29 次;最后 72 ℃ 终延伸 10 min,4 ℃ 保存。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,并利用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒(中国康宁生命科学有限公司)对 PCR 产物进行纯化。将回收的 DNA 送往上海立菲生物技术有限公司广州分公司进行序列测定,并将序列在 NCBI 网页上进行 Blast 同源性比对。

**1.2.3 菌株降解条件及降解特性研究** 以喹啉降解率为指标,利用单因素试验研究 pH 值、温度和初始苯酚浓度对菌株生长及降解喹啉的影响,根据环境单因素试验结果,用 Design-Expert 软件生成 3 水平 3 因素组合条件(表 1),根据所生成的各组合条件摇床培养菌株,测定培养 6 d 后喹啉浓度,计算降解率,所得结果输入 Design-Expert 软件,生成成分

析。将 L-F 菌在响应面法所确定的最优条件下进行摇床培养,每隔 2 h 测定喹啉浓度和菌液浓度,绘制生长曲线和喹啉降解曲线。

表 1 响应面分析因素与水平

因素水平	试验因素		
	温度(℃)	pH 值	底物浓度(mg/L)
-1	25	6.5	500
0	30	7.5	700
1	35	8.5	900

1.2.4 分析方法 菌种浓度的测定采用比浊法,使用分光光度计于波长 600 nm 处测定其 *D* 值<sup>[13]</sup>。喹啉含量测定采用紫外分光光度法<sup>[14]</sup>,使用分光光度计于波长 313 nm 处测定其 *D* 值。

喹啉降解率 =  $\frac{\text{喹啉降解前浓度} - \text{喹啉降解后浓度}}{\text{喹啉降解前浓度}} \times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 喹啉降解菌筛选与鉴定

驯化过程中,培养液出现由无色→粉红色→紫红色→浅褐色的变化,与假单胞菌(*Pseudomonas* sp. QG6)降解喹啉过程中颜色变化<sup>[15]</sup>相似,其颜色变化是降解喹啉的中间产物所

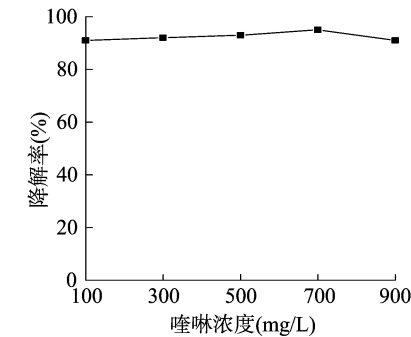


图1 底物浓度与降解率关系

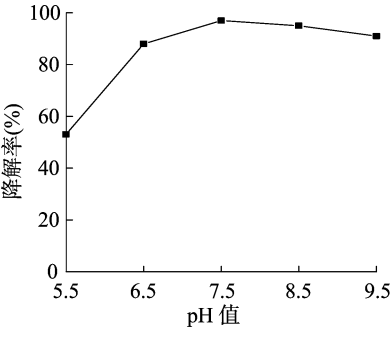


图2 pH 值与降解率关系

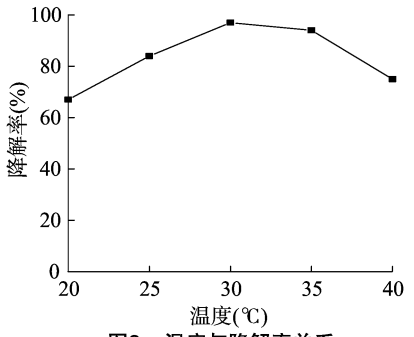


图3 温度与降解率关系

2.2.4 响应面法优化菌株喹啉降解条件 如表 2 所示,在设计的试验条件下,喹啉最大降解率达到 96%,最小降解率为 67%。将表 2 中的结果导入 Design-Expert 软件,固定 1 个环境因素的情况下,以另外 2 个环境因素为 *x* 和 *y* 轴,以降解率为 *z* 轴作图,得到在不同降解条件下的喹啉降解率响应曲面。如图 4 所示,温度和 pH 值对降解率的交互影响最显著,而温度和底物浓度、pH 值和底物浓度对降解率的交互影响不太显著。

由图 3 还可知,L-F 菌株降解喹啉的最优条件为:温度 30 ℃,pH 值 7.5,底物浓度 700 mg/L,在此条件下培养 6 d 后,对喹啉的降解效率达 96%,和发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)<sup>[18]</sup>等高效喹啉降解菌株的降解能力相当。

2.2.5 菌种生长曲线及降解特性 由图 5 可知,0~15 h 时 L-F 生长缓慢,可能是由于喹啉抑制了菌株的生长;15~42 h 之间为对数生长期。但喹啉降解速度基本稳定,喹啉浓度逐步降低,50 h 时喹啉降解率已达 80%,此降解规律和恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)有一定差异。王培明等发现,恶臭假单胞菌(*P. putida*)在对数生长期喹啉降解率最高<sup>[19]</sup>。降解特性的不同可能和菌株对喹啉的降解机制有关。

致,初步说明摇瓶中的菌也具有喹啉降解特性。经平板划线分离,得到 1 株菌,命名为 L-F 菌株。L-F 的 16S rRNA 序列与数据库 GenBank 中的 *Providencia* sp. 序列同源性达 99%,初步鉴定 L-F 菌株为普罗威登斯菌(*Providencia* sp.)。普罗威登斯菌(*Providencia* sp.)中雷氏普罗威登斯菌(*Provideacia rettgeri*)<sup>[16]</sup>被证明有脱氮性能,而喹啉属于氮杂环类化合物,其降解与脱氮<sup>[17]</sup>有关,但该菌并未研究其喹啉降解特性,其降解喹啉的机制有待进一步研究。

2.2 L-F 菌株降解条件研究

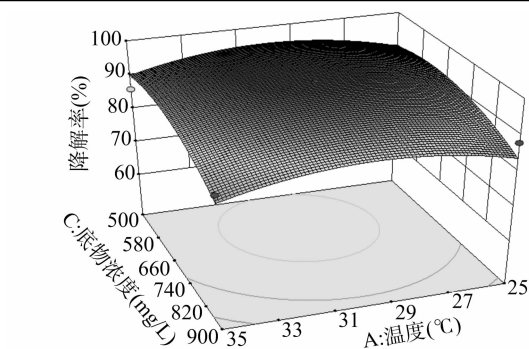
2.2.1 喹啉初始浓度对降解率的影响 由图 1 可知,喹啉初始浓度由 100 mg/L 增加到 900 mg/L,L-F 对喹啉降解率先增大后减小,但增大或减小幅度并不是很明显,其中喹啉浓度 700 mg/L 时 L-F 的降解率最高。

2.2.2 pH 值对菌株喹啉降解率的影响 如图 2 所示,当 pH 值 < 7.5 时,L-F 对喹啉的降解率随 pH 值的增加而增大;当 pH 值为 7.5 时,喹啉降解率达最高值 97%;当 pH 值 > 7.5 时,降解率呈现缓慢下降趋势,但下降幅度不大,降解率依然高于 90%。

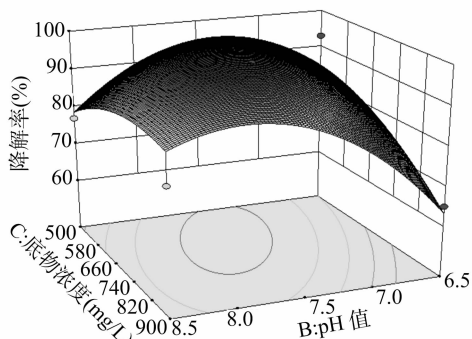
2.2.3 温度对菌株喹啉降解率的影响 如图 3 所示,温度由 20 ℃增加到 40 ℃时,L-F 对喹啉的降解效率先增大后减小,30 ℃时,L-F 对喹啉降解率最强。

表 2 响应面组合条件及对应降解率

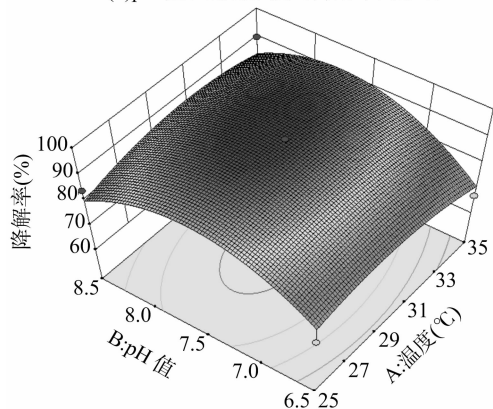
序号	温度(℃)	pH 值	底物浓度(mg/L)	降解率(%)
1	25.00	7.50	500.00	88
2	30.00	7.50	700.00	96
3	35.00	8.50	700.00	90
4	35.00	6.50	700.00	67
5	30.00	7.50	700.00	95
6	25.00	6.50	700.00	70
7	30.00	7.50	700.00	96
8	30.00	8.50	500.00	77
9	30.00	8.50	900.00	79
10	30.00	6.50	500.00	93
11	25.00	8.50	700.00	84
12	25.00	7.50	900.00	88
13	30.00	6.50	900.00	65
14	30.00	7.50	700.00	96
15	35.00	7.50	500.00	86
16	35.00	7.50	900.00	85
17	30.00	7.50	700.00	96



(a) 温度和底物浓度对降解率的影响



(b) pH 值和底物浓度对降解率的影响



(c) 温度和 pH 值对降解率的影响

图4 L-F 菌株降解喹啉环境条件响应面曲线

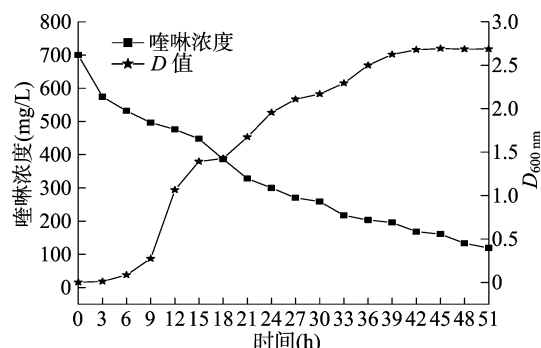


图5 L-F 降解喹啉曲线

### 3 结论

经过以喹啉为唯一碳源,从柳钢焦化废水中筛选出了 1 株具有降解喹啉能力的菌株 L-F,经 16S rDNA 测序鉴定为普罗威登斯菌 (*Providencia* sp.)。L-F 降解喹啉的最优条件

为:温度 30 ℃,pH 值 7.5,喹啉初始浓度 700 mg/L。该条件下摇床培养 6 d 后,喹啉降解率高达 96%。

### 参考文献:

- [1] 任源,韦朝海,吴超飞,等. 焦化废水水质组成及其环境学与生物学特性分析[J]. 环境科学学报,2007,27(7):1094-1100.
- [2] Asakura S, Sawada S, Sugihara T, et al. Quinoline-induced chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in rat liver[J]. Environmental and Molecular Mutagenesis,1997,30(4):459-467.
- [3] 张晓君,谢珍,马晓军. 难降解污染物喹啉微生物降解的国内研究进展. 微生物学通报,2014,41(3):476-481.
- [4] Grant D J, Al-Najjar T R. Degradation of quinoline by a soil bacterium[J]. Microbiology,1976,15(61-62):177-189.
- [5] Shukla O P. Microbial transformation of quinoline by a *Pseudomonas* sp. [J]. Applied and Environmental Microbiology,1986,51(6):1332-1442.
- [6] Loughlin E J, Kehtmeier S R, Sims G K. Isolation characterization and substrate utilization of a quinoline-degrading bacterium[J]. International Biodeterioration and Biodegradation,1996,38(2):107-118.
- [7] Wang J L, Wu W Z, Zhao X. Microbial degradation of quinoline: kinetics study with *Burkholderia pidettii* [J]. Biomedical and Environmental Sciences,2004,17(1):21-26.
- [8] Cui M C, Chen F Z, Fu J M, et al. Microbial metabolise of quinoline by *Camamonas* sp. [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology,2004,20(6):539-543.
- [9] Licht D, Johansen S S, Arvin E, et al. Transformation of indole and quinoline by *Desulfobacterium indolicum* (DSM 3383) [J]. Applied Microbiology and Biotechnology,1997,47(2):167-172.
- [10] Zhang X Y, Yan K L, Ren D, et al. Studies on quinoline biodegradation by a white rot fungus (*Pleurotus ostreatus* BP) in liquid and solid state substrates [J]. Fresenius Environmental Bulletin. 2007,16(6):632-638.
- [11] 柏耀辉,赵翠,肖亚娜,等. 降解喹啉的假单胞菌 BW003 菌株的分离、鉴定和降解特性[J]. 环境科学,2008,29(12):3546-3553.
- [12] Devereux R, Wilkinson SS. Amplification of ribosomal RNA sequences, molecular microbial ecology manual[M]. Netherlands: Kluwer Academic Publishers Press,2004,300-301.
- [13] 王春荣,高振凤,王建兵,等. 焦化废水处理系统中苯酚降解菌及其动力学研究[J]. 工业水处理,2013,33(6):25-28.
- [14] 李亚新,赵晨红. 紫外分光光度法测定焦化废水的主要污染物[J]. 中国给水排水,2001,17(1):54-56.
- [15] 王培明. 低温下喹啉降解菌的筛选及其对喹啉废水的生物强化处理研究[D]. 长春:东北师范大学,2013.
- [16] 张晓健,雷晓玲. 好氧生物处理对焦化废水中有机的去除[J]. 环境保护,1994,12(8):7-10.
- [17] Loh K C, Chung T S, Ang W F. Immobilized-cell membrane bioreactor for high-strength phenol wastewater [J]. Journal of Environmental Engineering,2000,1:75-79.
- [18] 张秀霞,吴伟林,单宝来,等. 固定化降解菌 Q5 降解喹啉动力学[J]. 石油学报,2009,25(3):442-446.
- [19] 王培明,明昕,朱遂一,等. 低温喹啉降解菌的筛选及降解性能[J]. 环境工程学报,2013,7(1):154-158.