

网络出版日期:2019-03-15 doi: 10.7606/j.issn.1004-1389.2019.03.018 网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1220.S.20190314.1022.026.html

喹啉高效降解菌株 Alcaligenes sp. WUST-qu的筛选、鉴定及降解特性

刘建忠,易红磊,翟 赟,黄 皓,陈 俊,周 卫,秦晓蓉 (武汉科技大学化学与化工学院,武汉 430081)

摘 要 从某焦化厂污水处理系统的活性污泥中筛选到一株喹啉高效降解菌 WUST-qu,对其形态、分类地 位、降解特征和生长动力学进行表征。结果表明,该菌株为革兰氏阴性菌,有芽孢,长为 1.15 μ m±0.08 μ m(n=20),宽为 0.26 μ m±0.01 μ m (n=20);16S rRNA 基因核苷酸序列比对结果表明,该菌株属产碱杆菌 属微生物(*Alcaligenes* sp)。菌株 WUST-qu 能在初始 pH 为 5.0~9.0 内有效降解喹啉,最适初始 pH 为中性 到略偏碱性(7.0~8.0)。在该条件下,菌株能在接种后的 48 h 内将最高初始质量浓度为 700 mg·L⁻¹ 的喹 啉完全降解。进一步研究表明,菌株 WUST-qu 不仅能够有效降解喹啉,还能有效降解苯酚,在 MSM 初始 pH 为 8.0 的条件下,菌株 WUST-qu 能在 32 h 内将初始质量浓度为 700 mg·L⁻¹ 的苯酚完全降解。其以喹 啉为唯一碳源生长时的动力学参数为 μ_{max} = 1.657 6 h⁻¹, K_s = 36.42 mg·L⁻¹, K_i = 81.418 mg·L⁻¹。 **关键词** 喹啉;苯酚;生物降解;*Alcaligenes* sp;生长动力学

中图分类号 Q939.99 文献标志码 A

喹啉及其衍生物是一类重要的工业原材料和 溶剂,广泛存在于煤焦油、页岩、石油等物质 中^[1-2],用途包括医药、染料、油漆、木材加工等行 业。喹啉在医药上主要用于制造烟酸系、8-羟基 喹啉系和奎宁系三大类药物,其中的代表之一就 是为众人所熟知的、全球广泛使用的抗疟疾特效 药奎宁。与之同时,喹啉及其衍生物又是一类典 型的环境污染物,具有难降解、有毒、致畸甚至致 癌的作用。研究表明,4-硝基喹啉-1-氧化物不仅 会对小麦和蚕豆的发芽率、出苗率和苗高有明显 的抑制作用,而且会诱发其根尖细胞染色体发生 畸变^[3-4],该物质还能诱发大鼠舌黏膜发生癌 变^[5]。

微生物生物技术用于环境污染的治理具有生态友好和经济有效等特点,已成为现代工业可持续发展的重要技术保障之一。筛选能高效降解一种或几种特定有机污染物的菌株,并添加到活性污泥中以实现对特定污染物高效降解的生物强化作用具有重要意义^[1-2,6]。本研究从武汉某焦化厂污水处理系统曝气池的活性污泥中筛选到一株喹

文章编号 1004-1389(2019)03-0452-07

啉高效降解菌,并对该菌株进行形态学、分类地 位、降解特性和生长动力学研究。

1 材料与方法

1.1 活性污泥的采集

用于分离目标菌株的活性污泥采集自武汉某 焦化厂污水处理系统曝气池,具体做法为采用长 柄勺舀曝气池面上 0~20 cm 处的活性污泥,盛入 事先准备好的塑料桶,带回实验室用于后续处理。

1.2 培养基

培养基包括 LB 液体培养基,无机盐培养基 (Mineral salt medium, MSM), MSM 固体/斜面 培养基,微量元素培养液等,其各自的成分和配制 参照文献[7]完成,经高压灭菌后待用。

1.3 菌种的富集、驯化和分离

采用文献[8]介绍的筛选苯酚降解菌的方法 完成菌种的富集、驯化和分离。

- 1.4 菌株的革兰氏和芽孢染色 参照文献[7]完成。
- 1.5 扫描电镜样品的制备及观察

用于扫描电镜观察的样品经戊二醛(2.5%)

收稿日期:2018-07-03 修回日期:2018-08-31

基金项目:国家自然科学基金(31301675)。

固定、磷酸盐缓冲溶液洗涤(3次,每次5min)、体积分数依次增加的乙醇脱水(20%,50%,70%, 85%,95%,100%;每体积分数下脱水10min)、 叔丁醇置换2~3次(φ =100%,每次10min)、真 空干燥40~60min,喷金观察。扫描电镜为Nova400NanoSEM,FEI(美国),工作电压为15 kV。

1.6 菌株 16S rRNA 基因部分核苷酸序列的测 定及系统发育树的构建

菌株 16S rRNA 基因部分核苷酸序列由武汉 擎科创新生物技术有限公司测定。扩增所使用的 引物 的核 苷酸序列为: 27F(5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3')和 1492R(5'-TACG-GCTACCTTGTTACGACTT-3'),扩增产物的 大小约为1 400 bp。使用 BLAST 程序对美国国 家生物技术信息中心(NCBI)数据库中 的 16S rRNA 基因核苷酸序列进行搜索,并使用 "分子进化遗传分析(MEGA 5.0)"软件分析序 列,应用 ClustalW 算法进行逐对和多重序列比 对,利用邻接法(Neighbour-joining method)构建 系统发育树。

1.7 菌体生物量、喹啉和苯酚质量浓度的测定

菌体生物量是采用分光光度计(UV-2000,日本)测定培养液于 600 nm 处的吸光值,并通过事 先建立的菌体干质量与 OD₆₀₀ 的校正曲线进行计 算;喹啉的测定方法是比色法,参比为不含喹啉的 MSM,测定波长为 277 nm;苯酚的测定采用 4-氨 基安替吡啉法,参比为不含苯酚的 MSM,测定波 长为 510 nm。

1.8 种子液的制备

在 500 mL 三角瓶中,加入质量浓度为 500 mg • L⁻¹ 的 喹 啉/苯 酚 的 MSM 200 mL,接入 1 mL 菌株 WUST-qu 培养液,在中性 pH 和 37 ℃、150 r • min⁻¹ 培养条件下培养,直到对数生长晚期。将培养液转入 50 mL 离心管,以 8 000 r • min⁻¹ 的转速离心 5 min 以回收菌体,用 20 mL MSM 重新悬浮沉淀,以相同的条件离心回收菌体,重复 2 次。以适量 MSM 重悬沉淀,并将悬液的 OD₆₀₀ 调整至 1.0,以之为降解试验中的种子液,接种量为培养液总体积的 5%。

1.9 菌体生长动力学

测定每个喹啉质量浓度下不同时间的生物质 质量浓度,通过对指数生长期的生物质质量浓度 与培养时间的半对数作图做线性最小二乘回归 (Linear least-square regression), 拟合出菌体的 比生长速率;采用软件 Origin 8.0, 将菌株的比生 长速率与对应的底物质量浓度进行非线性最小二 乘拟合得到 Haldane 方程中的各参数。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离及鉴定

经过连续的富集、驯化和梯度稀释涂布添加 500 mg・L⁻¹ 喹啉的 MSM 琼脂平板,获得 55 个 单菌落,经在添加相同质量浓度喹啉的 MSM 琼 脂平板上划线纯化后,将每一菌落分别于 MSM 斜面培养基和添加 $\varphi = 20\%$ 甘油的 MSM 中 于一80 °C保存。之后对获得的所有菌落逐一进 行以喹啉为唯一碳源的摇瓶培养试验。结果表 明,编号为 Qu-12 的菌株显示突出的喹啉降解能 力,将其命名为 WUST-qu,并用于后续的研究。 该菌株革兰氏、芽孢染色结果如图 1 和图 2 所示, 扫描电镜放大 20 000 倍和 50 000 倍的结果如图 3 所示。



图 1 菌株 WUST-qu 革兰氏染色结果 Fig. 1 The Gram stain of the bacterial strain WUST-qu



图 2 菌株 WUST-qu 芽孢染色结果 Fig. 2 The spore stain of the bacterial strain WUST-qu





Fig. 3 The scanning electron microscope image of bacterial strain WUST-qu (A. 20 $000 \times$; B. 50 $000 \times$)

由图 1 可见, 菌株经革兰氏染色后呈粉红色, 表明该菌株为革兰氏阴性菌; 由图 2 可见, 菌株经 芽孢染色后呈绿色, 表明该菌株产芽孢。由图 3 可见, 该菌株呈典型的杆状菌的特征, 长为 1.15 μ m±0.08 μ m, 宽为 0.26 μ m±0.01 μ m, 无可见 的鞭毛。菌株 WUST-qu 16S rRNA 基因部分核 苷酸序列 (1 435 bp)已提交到 GenBank,登录号 为 MF099860。核苷酸序列比对结果表明,该菌株 16S rRNA 基因与产碱杆菌属菌株 M14 和 JASI 的同源性均高达 99%,故将该菌株鉴定为 产碱杆菌属(Alcaligenes faecalis),采用邻接法 构建的系统发育树如图 4 所示。





Fig. 4 The phylogenetic tree of bacterial strain WUST-qu based on the nucleotide homology of its 16S rRNA gene

2.2 菌株 WUST-qu 在不同初始 pH 降解喹啉的 特征

环境 pH 是影响受污染地点生物修复效果的 重要因素之一,因而测定菌株 WUST-qu 在不同 初始 pH 降解喹啉的降解特征。菌株 WUST-qu 于 MSM 初始 pH 为 5.0~9.0 时降解不同初始 质量浓度喹啉的特征以及在降解过程中生物质增 长的特征如图 5 所示。 由图 5 可见, MSM 初始 pH 为 5.0 时, 菌株 WUST-qu 能在 24、30、36 和 60 h 之内分别将初 始质量浓度为 100、200、300 和 400 mg \cdot L⁻¹ 的 喹啉完全降解, 在降解不同初始质量浓度的喹啉 时均呈现出明显的生长延滞期(12~30 h), 延滞期有 随喹啉初始质量浓度提高而延长的趋势; 与 MSM 初 始 pH 为 5.0 相 比, MSM 初 始 pH 为 6.0 时,酸性环境对菌株WUST-qu所产生的胁迫作



图 5 菌株 WUST-qu 在 MSM 初始 pH 为 5.0~9.0、降解不同初始质量浓度喹啉时的降解曲线和生物量的增长曲线 Fig. 5 The biodegradation and biomass growth curves of bacterial strain WUST-qu degrading quinoline at different initial mass concentrations at initial pH of between 5.0-9.0

用明显减弱,菌株降解喹啉的活力得到明显提升。 能够完全降解喹啉的最高质量浓度由之前的 400 mg • L⁻¹ 提升到 600 mg • L⁻¹,完全降解低质量 浓度喹啉所需要的时间明显缩短,延滞期也有所 缩短,但对于初始质量浓度为 $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的喹 啉,菌株依旧呈现出较长的生长延滞期(30 h);中 性 pH 明显有利于菌株 WUST-qu 对喹啉的降 解,能够在接种后48h内将初始质量浓度为700 $mg \cdot L^{-1}$ 的喹啉完全降解,700 mg · L⁻¹ 是该菌 株能够完全降解喹啉的最高质量浓度,菌体生长 的延滞期较之 pH 5.0 和 6.0 时大为缩短;菌株 WUST-qu在MSM初始pH为8.0时降解不同 初始质量浓度喹啉和在降解过程中生物质的变化 特征与 MSM 初始 pH 为 7.0 时如出一辙,不再 赘述。这在很大程度上表明,中性或者略偏碱性 (7.0~8.0)是该菌株降解喹啉的理想 pH 范围; MSM 初始 pH 为 9.0 时,菌株 WUST-qu 降解初 始质量浓度为 600 mg • L⁻¹ 以下的喹啉都尚属 顺畅,只是完全降解初始质量浓度为 600 mg • L⁻¹ 的喹啉所需的时间较初始 pH 为 7.0 时延长 6 h, 而完全降解初始质量浓度为 700 mg • L⁻¹ 的喹啉所需的时间则大幅度延长 24 h 之多。菌

体生物质增长特征与初始 pH 为 7.0 时相比,差 异很小,最明显的差异莫过于初始喹啉质量浓度 为 700 mg • L⁻¹ 的试验组的延滞期延长 30 h 之 多,但一旦越过延滞期之后,菌体生物质呈指数增 长,与之相伴随的是喹啉被快速降解。

2.3 菌株 WUST-qu 降解苯酚的特征

关于菌株 WUST-qu 底物广谱性的研究表明,该菌株不仅能够有效降解喹啉,还能有效降解 苯酚。菌株于 MSM 初始 pH 为 8.0,于 35 ℃和 150 r•min⁻¹的旋转摇床上培养时,降解不同初 始质量浓度苯酚以及在降解过程中生物质的增长 特征如图 6 所示。

由图 6 可见, 菌株 WUST-qu 能够在 8、20、24 和 32 h 之内分别将初始质量浓度为 100、300、500 和 700 mg • L⁻¹ 的苯酚完全降解, 但即便是降解 初始质量浓度仅为 100 mg • L⁻¹ 的苯酚, 菌株 WUST-qu 也显示出 4 h 的延滞期, 而且随着苯酚 初始质量浓度的提高, 延滞期逐渐延长。

2.4 菌株 WUST-qu 以喹啉为唯一碳源时的生 长动力学

菌株比生长速率与喹啉初始质量浓度的关系 如图 7 所示。



图 6 MSM 初始 pH 为 8.0 时菌株 WUST-qu 降解不同初始质量浓度苯酚时的降解曲线和生物量的增长曲线 Fig. 6 The biodegradation and biomass growth curves of bacterial strain WUST-qu degrading phenol at different initial mass concentrations at initial pH of 8.0

从图 7 可见,比生长速率先是随着喹啉初始 质量浓度的提高而增加,到达某一质量浓度后(即 到达 Sm 值后),随喹啉质量浓度的升高而降低, 最大比生长速率对应的喹啉质量浓度为 55.545 mg·L⁻¹。其他参数如下: $\mu_{max} = 1.657 \ 6 \ h^{-1}$, $K_s = 36.42 \ mg \cdot L^{-1}$, $K_i = 81.418 \ mg \cdot L^{-1}$, $R^2 = 0.968$ 。

3 讨论

本研究报道的菌株 WUST-qu 能够完全降解 喹啉的最高质量浓度为 700 mg • L⁻¹,虽不及郑 中原等^[9]和 Sun 等^[2]的结果,但高于绝大多数公 开报道的结果^[1,10-11]。这些较低的数值与喹啉 在水中的溶解性较差有关,也充分反映出喹啉的





难降解性;与其同属含氮杂环化合物的吡啶,能与 水以任意比例互溶,文献[12]报道的微生物能够 完全降价吡啶的浓度高达 70 mmol·L⁻¹(质量 浓度 5 537 mg·L⁻¹)。关于微生物降解喹啉的 机理,已有很多有益的探索。不同种属的微生物 降解喹啉的途径可能不尽相同,但大的方面是一 致的。概括的途径是喹啉经两次羟基化,产物分 别为 2-羟基喹啉和 2,8-二羟基喹啉,后者被转化 为 8-羟基香豆素和 3-(2,3-二羟基苯基)丙酸,并 进一步被矿化为 CO₂ 和 H₂O。在本研究中,也 采用 GS/MS 对代谢产物进行监测,检测到 2-羟 基喹啉的存在,但没有检测到其他代谢中间产物。

尽管菌株 WUST-qu 也能有效降解苯酚,但 其降解效率却不及笔者之前筛选到的以降解苯酚 为目标的菌株 Pseudomonas sp. WUST-C1^[8], 后者能在接种后4h和32h内将初始质量浓度 分别为200 mg·L⁻¹和为1200 mg·L⁻¹的苯 酚完全降解,而且在降解较低质量浓度的苯酚(< 400 mg·L⁻¹)时不表现出延滞期。有研究表 明^[13],在有氧条件下,微生物降解苯酚的第一步 是在羟化酶的作用下,将苯酚转化为邻苯二酚,随 后,邻苯二酚通过邻位或间位裂解途径开环。而 喹啉微生物降解的起始也包含两步连续的羟基 化,并进而转化为2,8-二羟基喹啉。这种代谢途 径上的相似性是解释菌株 WUST-qu既能有效降 解喹啉又能有效降解苯酚可能的机理之一。

生长动力学知识对于了解微生物降解喹啉的 能力是极其重要的。Haldane 动力学方程常用于 描述抑制性底物在纯培养或混合培养时的细胞生 长速率。为了获得菌体生长的动力学模型参数, 测定喹啉初始质量浓度为 50~700 mg • L⁻¹ 时 不同时间的生物质质量浓度,通过线性最小二乘 回归拟合出菌体的比生长速率,通过非线性最小 二乘拟合得出 Haldane 方程中的 μ_{max} 、Ks 和 K_i 值。Zhu 等^[10] 采用 Haldane 模型研究一株红球 菌属菌株 QL2 以喹啉为底物生长时的动力学,获 得的相关参数分别为: $\mu_{max} = 0.499 h^{-1}$, $K_s =$ 68.7 mg • L⁻¹, $K_i = 387.1$ mg • L⁻¹;李静等^[14] 报道一株嗜酸菌属菌株降解喹啉的 Haldane 动 力学参数: $\mu_{\text{max}} = 0.640 \text{ h}^{-1}$, $K_s = 164 \text{ mg}$ • L^{-1} , $K_i = 253$ mg • L^{-1} 。本研究中的菌株 WUST-qu的最大比生长速率远高于 Zhu 等^[10] 和李静等^[14]报道的结果,这意味着 WUST-qu 可 以在含高质量浓度喹啉的工业废水中快速生长, 并因此迅速降解喹啉,显示出在应对喹啉污染突 发事件中较大的应用潜力。

参考文献 Reference:

- [1] TUO B H, YAN J B, FAN B A, et al. Biodegradation characteristics and bioaugmentation potential of a novel quinoline-degrading strain of Bacillus sp. isolated from petroleum-contaminated soil[J]. Bioresource Technology, 2012, 107:55-60.
- [2] SUN Q H, BAI Y H, ZHAO C, et al. Aerobic biodegradation characteristics and metabolic products of quinoline by a *Pseudomonas* strain [J]. Bioresource Technology, 2009,100(21):5030-5036.
- [3] 朴铁夫,高山,李国全,等.4-硝基喹啉-1-氧化物对小麦损 伤效应的研究[J].吉林农业大学学报,1995,17(3):26-28.
 PIAOTF,GAOSH,LIGQ,et al. Studies on damage effect of 4-NQO to wheat[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 1995,17(3):26-28.
- [4] 朴铁夫,韩秀云,原亚萍,等. 4-NQO 对蚕豆损伤效应的研究[J]. 核农学通报,1995,16(4):186-187.
 PIAO T F,HAN X Y,YUAN Y P,et al. Studies on damage effect of 4-NQO to horsebean[J]. Nuclear Agriculture Bulletin,1995,16(4):186-187.
- [5] 陈万涛.4-硝基喹啉-1-氧化物诱发大鼠舌黏膜鳞癌模型和 分子发病机制研究进展[J].中国实用口腔科杂志, 2010,3(7):387-390.

CHEN W T. The animal model with tongue squamous cell carcinoma induced by 4-NQO and its mechanism of molecular carcinogenesis[J]. *Chinese Journal of Practical Stomatology*, 2010, 3(7): 387-390.

[6] OBEROI A S.PHILIP L.BHALLAMUDI S M. Biodegradation of various aromatic compounds by enriched bacterial cultures: part B-nitrogen-, sulfur-, and oxygen-containing heterocyclic aromatic compounds[J]. Applied Biochemistry Biotechnology, 2015, 176: 1746-1769.

 [7] 沈 萍,陈向东.微生物学实验[M].北京:高等教育出版 社,2007.

SHEN P, CHEN X D. Microbiology Experiments [M]. Beijing: Higher Education Press, 2007.

- [8] LIU J ZH, WANG Q, YAN J B, et al. Isolation and characterization of a novel phenol degrading bacterial strain WUST-C1[J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2013,52(1):258-265.
- [9] 郑中原,赵 翠,温东辉,等.喹啉降解菌 BW004 的分离、鉴 定及降 解 特性 [J].北京大学学报(自然科学版), 2013,49(4):683-688.

ZHENG ZH Y, ZHAO C, WEN D H, et al. Isolation, identification, and metabolic characteristics of a quinoline degrading bacterium [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis, 2013, 49(4);683-688.

[10] ZHU S N, LIU D Q, FAN L, et al. Degradation of quinoline by *Rhodococcus* sp. QL2 isolated from activated sludge [J]. Journal of Hazardous Materials, 2008, 160 (23): 289-294.

- [11] WANG J L,QUAN X CH, HAN L P, et al. Microbial degradation of quinoline by immobilized cells of Burkholderia pickettii[J]. Water Research ,2002,36(9):2288-2296.
- [12] STOBDAN T, SINHA A, SINGH R P, et al. Degradation of pyridine and 4-methylpyridine by Gordonia terrea IIPN1[J]. Biodegradation, 2008, 19(4):481-487.
- [13] ACIKGOZ E.OZCAN B. Phenol biodegradation by Halophilic archaea [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2016, 107:140-146.
- [14] 李 静,李文英. 喹啉降解菌筛选及其对焦化废水强化处理[J]. 环境科学,2015,36(4):1385-1391.
 LI J,LI W Y. Screening of a highly efficient quinoline-degrading strain and its enhanced biotreatment on coking waste water [J]. *Environmental Science*, 2015, 36(4): 1385-1391.

Isolation and Characterization of a Potent Quinoline Degrading Bacterial Strain *Alcaligenes* sp. WUST-qu

LIU Jianzhong, YI Honglei, ZHAI Yun, HUANG Hao, CHEN Jun, ZHOU Wei and QIN Xiaorong

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430081, China)

Abstract In this study, a potent quinoline-degrading bacterial strain WUST-qu was isolated from the activated sludge of the wastewater treatment system of a coke plant, and the morphological properties, taxonomic status, degrading characteristics, and kinetics of growth were characterized. The results demonstrated that the strain WUST-qu is Gram negative and sporulating with a length of 1.15 μ m \pm 0.08 μ m (n = 20), and a width of 0.26 μ m \pm 0.01 μ m (n = 20). Partial 16S rDNA sequence alignment indicated that WUST-qu belongs to the genus of *Alcaligenes*. The strain could effectively degrade quinoline at between pH 5.0 and 9.0, but the ideal pH to degrade quinoline is neutral or slightly basic(7.0-8.0), under which the strain could completely degrade quinoline at a maximal initial concentration of 700 mg \cdot L⁻¹ within 48 h upon inoculation. The further study indicated that the strain WUST-qu also degrades phenol effectively. The strain could completely degrade phenol at 700 mg \cdot L⁻¹ within 32 h at an initial pH of 8.0. The kinetic parameters for growth with quinoine as the sole carbon were as follow: $\mu_{max} = 1.657 \ 6 \ h^{-1}$, $K_i = 36.42 \ mg \cdot \ L^{-1}$, $K_i = 81.418 \ mg \cdot \ L^{-1}$. **Key words** Quinoline; Phenol; Biodegradation; *Alcaligenes* sp; Growth kinetics

Received 2018-07-03 **Returned** 2018-08-31

Foundation item The National Natural Science Foundation of China(No. 31301675).

First author LIU Jianzhong, male, Ph. D, professor, master supervisor. Research area: industrial microbiology. E-mail: liujianzhong@wust. edu. cn