

## 泥浆体系中吡啶的生物降解研究

刘江江<sup>1</sup>, 陈吕军<sup>1</sup>, 温东辉<sup>2</sup>, 何玉山<sup>2</sup>, 乔琳<sup>3</sup>, 夏勉<sup>3</sup>, 李毅<sup>4</sup>

1. 清华大学环境科学与工程系/环境模拟与污染控制国家联合重点实验室, 北京 100084; 2. 北京大学环境学院环境科学系, 北京 100871;  
3. 北京未名凯拓农业生物技术有限公司, 北京 100089; 4. 北京大学生命科学学院生物技术系, 北京 100871

**摘要:** 杂环化合物已造成了土壤、地下水等体系的严重污染, 危害人类健康与生态环境。生物修复是解决该类污染问题的有效方法。由实验室培养的活性污泥中分离一株高效降解吡啶的菌株 W12, 经鉴定为脱氮副球菌(*Paracoccus denitrificans*), 以 W12 菌对受吡啶污染的泥浆体系进行生物修复。实验条件下, 土壤对吡啶的吸附量很小, 符合 Freundlich 吸附等温式。当吡啶初始质量分数为  $1.65 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  时, 投加 W12 菌能够迅速促进吡啶的生物降解, 在灭菌土和自然土中完全降解吡啶的时间分别为 12 h 和 18 h, 说明 W12 菌在自然土中的降解效果受到土著微生物的竞争影响; 此外, 对泥浆体系中吡啶降解的影响因素进行了研究, 发现投菌量是影响吡啶降解速率的关键因素, 外加氮源以及土水比均对吡啶降解过程影响不大。

**关键词:** 脱氮副球菌; 生物降解; 吡啶; 生物修复; 泥浆

**中图分类号:** X172      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1672-2175 (2006) 06-1180-05

作为一种典型的难降解有机污染物, 杂环芳烃化合物造成的环境问题已经引起人们越来越多的重视。杂环芳烃化合物来源十分广泛, 但主要来自于工业生产<sup>[1-2]</sup>, 很多是人为合成的、自然界中原本不存在的物质, 被称为“异型生物质”<sup>[3-4]</sup>, 具有“三致”作用<sup>[5]</sup>, 危害人类健康和生态平衡, 目前杂环芳烃化合物在环境中的扩散已经造成了土壤、地下水等的严重污染<sup>[2,6]</sup>。生物修复是解决该类问题的有效方法, 利用从环境中筛选的降解微生物能够有效去除泥浆<sup>[7]</sup>、底泥<sup>[8]</sup>、土壤<sup>[9]</sup>环境中杂环和苯环类等污染物质。

吡啶作为最基本和典型的杂环芳烃物质而成为研究的焦点, 特别是集中在纯菌株或酶对吡啶的生物降解特性、以及外加碳源、反应条件等因素对吡啶降解的影响等方面<sup>[2,10-17]</sup>; 此外, 在固定化细胞以及投菌法生物强化降解杂环芳烃污染物的研究上也取得了不少成果<sup>[18-19]</sup>; 但未见受吡啶污染的泥浆体系的生物降解的研究报道。

脱氮副球菌(*Paracoccus denitrificans*)具有反硝化能力<sup>[19-20]</sup>, 并能降解氯苯胺<sup>[21]</sup>、PAHs<sup>[22]</sup>及嘌呤<sup>[23]</sup>等污染物, 但尚未见利用该菌种降解土壤中含氮杂环芳烃化合物的研究报道。本研究即利用对吡啶具有高效降解功能的一株脱氮副球菌, 对模拟的受污染泥浆体系进行生物修复实验, 分析泥浆体系中吡啶降解速率的影响因素。

### 1 材料与方法

#### 1.1 菌种

从实验室某废水生物处理反应器的活性污泥

中分离获得一株吡啶高效降解菌株 W12, 经中国科学院微生物所鉴定为脱氮副球菌(*Paracoccus denitrificans*), 已于 2006 年 5 月保藏于中国普通微生物菌种保藏中心(编号: CGMCC No.1673)。除吡啶外, 该菌对苯、二甲苯、氰化物和喹啉等也有一定的降解功能。图 1 为 W12 菌在扫描电镜下的形态。

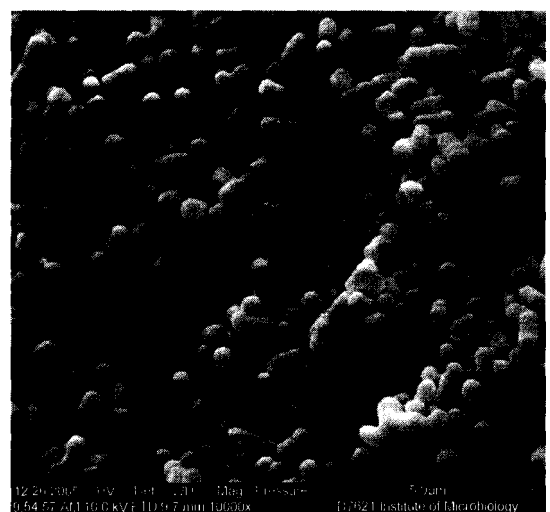


图 1 脱氮副球菌 W12 的形态

Fig. 1 The images of SEM of the strain *Paracoccus denitrificans* W12

#### 1.2 土壤采集及土样制备

土壤采自清华大学近春园地下 25~50 cm 深度处。土壤基本生理与生化特性由中国农科院检测, 见表 1。采集的土壤风干后过 2 mm 筛, 部分作为自然土样(以下简称“自然土”)保存; 其余风干过筛土壤放置于烘箱内, 在 105 °C 下干热灭菌 24 h,

**基金项目:** 国家科技部“863”前沿探索类课题(2004AA649090)

**作者简介:** 刘江江(1983-), 男, 硕士研究生, 研究方向为有机物生物降解。E-mail: liu-ji04@mails.tsinghua.edu.cn

**收稿日期:** 2006-06-22

再放置于灭菌锅内, 在高压 120 °C 湿热灭菌 20 min, 如此反复三次, 制备成灭菌土样 (以下简称“灭菌土”)。

表 1 土壤生理特性指标  
Table 1 The character of the soil

w(总碳) (mg·g <sup>-1</sup> )	w(有机质) (mg·g <sup>-1</sup> )	w(碱解氮) (mg·kg <sup>-1</sup> )	w(全氮)/%	pH	微生物数量 (cfu)
6.9	11.9	124.1	0.783	8.673	9.8×10 <sup>6</sup>

### 1.3 土壤对吡啶的吸附等温线实验

取 2 g 自然土于三角瓶中, 加入 20 mL 吡啶质量浓度分别为 95, 195, 375, 565, 760 和 950 mg·L<sup>-1</sup> 的溶液, 密封后在温度 30 °C、转速 150 r/min 的条件下振荡 10 h。结束后以 0.45 μm 滤膜抽滤取水样, 以 HPLC 分析吡啶质量分数。

### 1.4 受吡啶污染泥浆的生物修复实验

将 LB 富集培养液分装入 500 mL 三角瓶内 (每瓶培养液为 300 mL), 纱布封口后以 120 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。以无菌操作方法向培养液接种 W12 菌, 在恒温摇床上进行培养, 温度为 35 °C, 转速为 180 r/min, 时间为 72 h。将培养获得的纯菌液全部进行离心, 离心条件为 8000 r/min, 10 min。用无菌去离子水重悬, 离心, 如此反复两次将菌液洗净, 最后用无菌去离子水将菌液稀释至 75 mL, 备用。

生物修复实验在摇瓶中进行, 恒温摇床温度为 30 °C, 转速为 180 r/min, 实验方案见表 2。其中土样的吡啶初始污染水平为 1.65 mg·g<sup>-1</sup>; 土样量均为 5 g; 投加菌液的干物质的量经干重法确定为 1.95 g·L<sup>-1</sup>; 外加的氮源分别为 NH<sub>4</sub>Cl 与 NaNO<sub>3</sub>, 溶液质量浓度均为 1.00 g·L<sup>-1</sup>。

表 2 受污染泥浆体系的生物修复实验方案  
Table 2 Scheme of the slurry bioremediation experiment

组号	土样类型	投菌量	外加 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	外加 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	土水比 (g·mL <sup>-1</sup> )
1	灭菌土	-	-	-	1/4
2	灭菌土	10 mL	-	-	1/4
3	自然土	-	-	-	1/4
4	自然土	10 mL	-	-	1/4
5	自然土	10 mL	1 mL	-	1/4
6	自然土	10 mL	-	1 mL	1/4
7	自然土	5 mL	-	-	1/4
8	自然土	2 mL	-	-	1/4
9	自然土	10 mL	-	-	1/8

### 1.5 吡啶质量分数的测定

泥浆样品经离心过滤后, 以 HPLC 测定吡啶质量分数。HPLC 型号为日本岛津公司 (SHIMADZU) LC-10AD。色谱柱采用 Diamosil(TM) 钻石 C<sub>18</sub>、5

μm 反相柱, 250 mm×4.6 mm (DIKMA 公司)。流动相为 V(甲醇):V(水)=40:10, 流量为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>。测定波长为 254 nm。

## 2 结果与讨论

### 2.1 土壤对吡啶的吸附等温线

将测得的吡啶液相平衡质量浓度与计算得到的土样吡啶吸附量作图, 得到土壤对吡啶的吸附等温线, 见图 2。

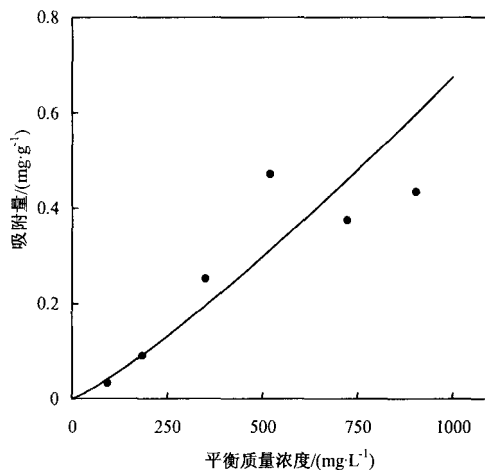


图 2 土壤对吡啶的吸附等温线

Fig. 2 Adsorption isotherm of pyridine onto soil

土壤颗粒对有机物的吸附一般可以用经验性的 Freundlich 公式进行数学拟合, 该式为:  $q_e = K_f \cdot C_e^{n-1}$ , 其中:  $q_e$  为每克土样吸附的吡啶量 (mg·g<sup>-1</sup>);  $C_e$  为吡啶液相平衡质量浓度 (mg·L<sup>-1</sup>);  $K_f, n$  为实验条件下的常数。将图 2 的实验数据代入该吸附等温线公式, 并取对数方程进行线性回归, 得到数学表达式为:  $q_e = 0.0002C_e^{1.1760}$ , 其中常数  $K_f = 0.0002, n = 0.8503$ 。相关系数  $R^2$  为 0.9253。

数学拟合结果说明: 在实验条件下, 土壤对吡啶的吸附符合 Freundlich 公式; 土壤对吡啶的吸附量很少, 这是由于吡啶杂环结构的极性和高水溶性造成的, 因而当土壤含水量较大时吡啶可能会有较高的迁移速率, 使地下水很容易被污染。

### 2.2 受污染泥浆的生物降解

#### 2.2.1 土壤土著微生物对吡啶的降解作用

首先考察了自然土中土著微生物对泥浆体系中吡啶去除作用的影响 (表 2 中 1 和 3 组), 结果见图 3。通过对比自然土与灭菌土的吡啶质量分数的变化, 发现土著微生物对于吡啶的降解贡献不大, 实验后期土著微生物因适应性增强才具有了一定的降解能力。这样在实际环境中, 由于土壤对吡啶的吸附作用很小, 且吡啶具有较高的挥发性, 就使其具有相当迁移能力, 从而造成各种环境体系的污染。

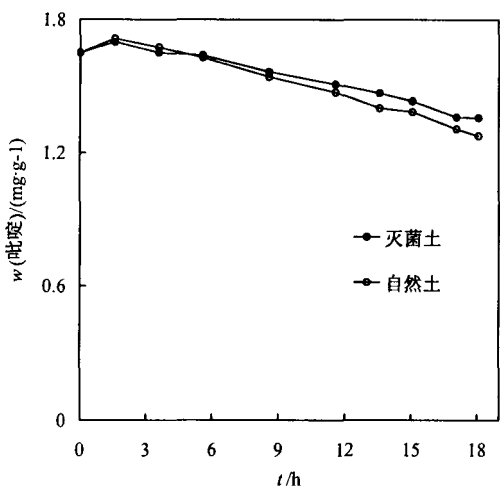


图3 土壤中土著微生物对吡啶的生物降解

Fig. 3 Pyridine degradation by the soil indigenous microbes

2.2.2 W12 菌在灭菌土和自然土中的降解作用

向灭菌土和自然土投加 W12 菌, 比较两种土样的吡啶生物降解情况(表 2 中 2 和 4 组), 结果见图 4。可以看出, 投加 W12 菌后泥浆体系中的吡啶都能够在短期内迅速去除, 在灭菌土和自然土中分别在 12 h 和 18 h 可将起始质量分数为 1.65 mg·g<sup>-1</sup> 的吡啶完全降解, 而对照组中的吡啶仍保持在较高的水平(图 3 中显示高于 1.2 mg·g<sup>-1</sup>), 说明 W12 菌能够有效地降解吡啶。值得注意的是, 在灭菌土体系中, W12 菌具有更高的生物降解速率, 完全降解所需时间比自然土约少 6 h, 这说明了自然土中的土著微生物对 W12 菌降解吡啶的过程产生影响, 可能是由于不同种群微生物之间营养竞争所致。投菌法修复污染体系涉及到多种微生物之间的相互作用的问题, 在实际应用工程菌时要考虑到微生物之间抑制作用的影响, 并减少微生物之间的相互抑制以达到最佳修复效果。

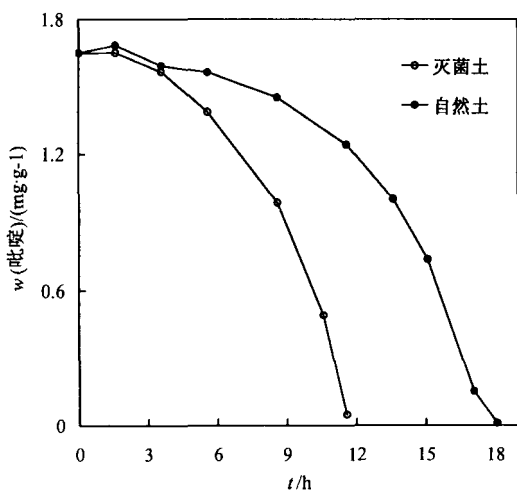


图4 W12 分别在灭菌土和自然土中的降解作用

Fig. 4 Pyridine degradation in the natural and sterilized soil sample

2.2.3 投菌量对吡啶生物降解的影响

实验研究了投菌量对泥浆体系中吡啶生物降解的影响作用, 分别以正常投菌量、一半投菌量和 1/5 投菌量考察泥浆体系中吡啶的降解速率(表 2 中 4、7 和 8 组), 在一定的时间内, 投菌量同生物降解速率成正比关系, 见图 5。可以看出, 投菌量差异对于吡啶去除率有较大影响, 因此, 投菌量是影响泥浆体系中吡啶降解速率的重要因素。投菌量增加也会导致运行成本增加, 因此实际工程应用时需要进行技术经济的综合分析和比较。

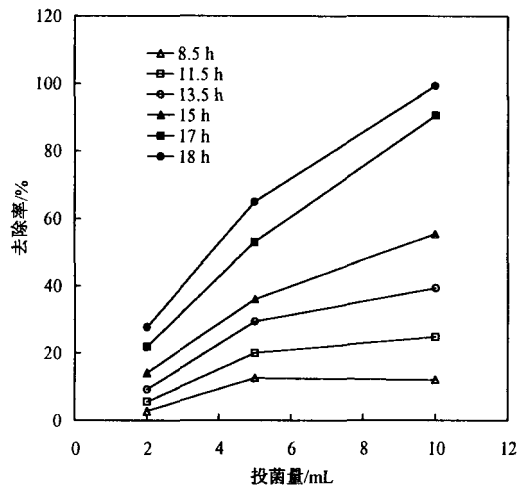


图5 不同投菌量的吡啶去除率比较

Fig. 5 Comparison of the removal rate with different delivering amount

2.2.4 外加氮源对吡啶生物降解的影响

由于 W12 菌属脱氮副球菌(*Paracoccus denitrificans*), 具有反硝化能力, 而土壤的泥浆体系是一个较为复杂的体系, 可能存在多种形态的氮素, 因而实验考察了外加氮源(氨氮和硝酸氮)对吡啶生物降解的影响(表 2 中 4、5 和 6 组), 结果见图 6。

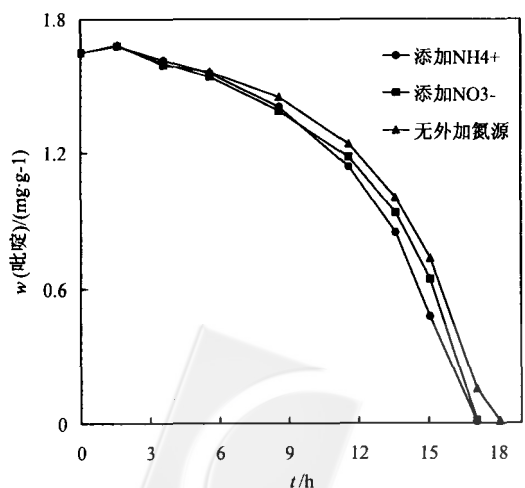


图6 外加氮源对于吡啶降解的影响

Fig. 6 Effect of the external nitrogen sources on pyridine degradation

可以看出在实验条件下外加氮源对于 W12 菌降解吡啶的影响不大, 在反应后期能够看出外加氮源有微弱的促进作用。

### 2.2.5 土水比对吡啶生物降解的影响

在泥浆体系中, 土水比是一个重要的环境因子, 实验中比较了土水比为  $1/4 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$  和  $1/8 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时吡啶的生物降解情况 (表 2 中 4 和 9 组), 结果见图 7。发现高含水量只是使吡啶降解速率略有降低。由于吡啶具有较高的水溶性, 因而不同土水比并不会使吡啶在固液两相体系中的分配有太大差异, 因此其生物降解速率也就不会受到较大影响。

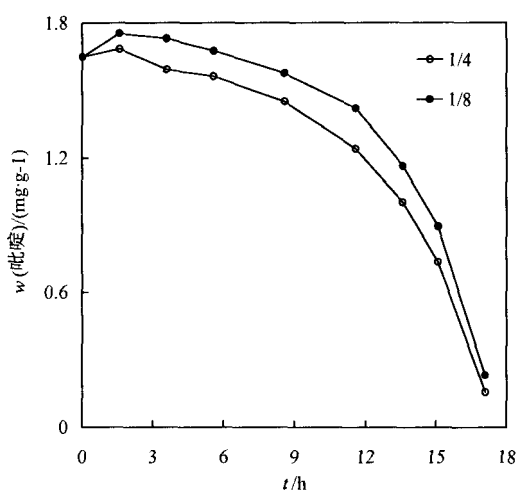


图 7 土水比对生物降解作用的影响

Fig. 7 Effect of the soil-water-ratio on pyridine degradation

## 3 结论

土壤对吡啶的吸附符合 Freundlich 吸附等温式, 但吸附量很小, 加之吡啶具有较大的挥发性, 因此其在土壤环境中具有较强的扩散和迁移能力。

脱氮副球菌 (*Paracoccus denitrificans*) W12 菌能够有效促进泥浆体系中吡啶的生物降解, 向灭菌土样和自然土样投加 W12 菌液后, 泥浆体系中  $1.65 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  的吡啶分别在 12 h 和 18 h 被完全降解; 生物降解作用不仅可修复土壤, 而且防止吡啶通过挥发而污染大气、或通过迁移而污染深层土壤和地下水。

在泥浆体系中, 土著微生物与脱氮副球菌 (*Paracoccus denitrificans*) W12 菌之间存在竞争关系, 因而使体系中吡啶生物降解速率明显低于纯 W12 菌对吡啶的降解速率。

投菌量对泥浆体系中吡啶降解速率有重要影响, 增加投菌量可显著提高体系中吡啶的降解速率; 投加氨氮和硝酸氮作为外加氮源, 在实验条件

下对于泥浆体系中吡啶降解的影响不大; 土水比的变化对泥浆体系中吡啶降解的影响也不明显。

### 参考文献:

- [1] OTHMER K. Encyclopedia of Chemical Technology[M]. New York: John Wiley Science, 1982, 15: 454-480.
- [2] 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.
- [3] PROVIDENTI M A, LEE H, TREVORS J T. Selected factors limiting the microbial-degradation of recalcitrant compounds[J]. Journal of Industrial Microbiology, 1993, 12(6): 379-395.
- [4] LEISINGER T. Microorganisms and xenobiotic compounds [J]. Experientia, 1983, 39(11): 1183-1191.
- [5] AZHAR N G, STUCKEY D C. The influence of chemical structure on the anaerobic catabolism of refractory compounds: a case study of instant coffee wastes[J]. Water Science and Technology, 1994, 30(12): 223-232.
- [6] STUERMER D H, NG D J, MORRIS C J. Organic contaminants in groundwater near an underground coal gasification site in northeastern Wyoming[J]. Environmental Science and Technology, 1982, 16(9): 582-587.
- [7] 韩力平, 王建龙, 刘恒, 等. 泥浆体系中受喹啉污染土壤的生物修复[J]. 环境科学, 2000, 21(6): 89-91.  
HAN Liping, WANG Jianlong, LIU Heng, et al. Bioremediation of Quinoline-Contaminated Soil in Slurry Phase [J]. Environmental Science, 2000, 21(6): 89-91.
- [8] WANG J L, MAO Z Y, HAN L P, et al. Bioremediation of quinoline-contaminated soil using bioaugmentation in slurry-phase reactor[J]. Biomedical and Environmental Sciences, 2004, 17 (2): 187-195.
- [9] WANG J L, LIU P, SHI H C, et al. Biodegradation of phthalic acid ester in soil by indigenous and introduced microorganisms[J]. Chemosphere, 1997, 35(8): 1747-1754.
- [10] SHUKLA O P, KAUL S M. Succinate semialdehyde, an intermediate in the degradation of pyridine by *Brevibacterium* sp[J]. Indian Journal of Biochemistry and Biophysics, 1975, 12: 321-330.
- [11] LEE S T, LEE S B, PARK Y H. Characterization of a pyridine-degrading branched Gram-positive bacterium isolated from the anoxic zone of an oil shale column[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1991, 35(6): 824-829.
- [12] SIMS G K, SOMMERS L E, KONOPKA A. Degradation of pyridine by *Micrococcus luteus* isolated from soil[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1986, 51(5): 963-968.
- [13] SHUKLA O P, KAUL S M. A constitutive pyridine degrading system in *Corynebacterium* sp[J]. Indian Journal of Biochemistry and Biophysics, 1974, 11: 201-207.
- [14] 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.
- [15] BRINKMANN U, BABEL W. Simultaneous utilization of pyridine and fructose by *Rhodococcus opacus* UFZ B 408 without an external nitrogen source[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1996,

- 45(1/2): 217-223.
- [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] LIU S M, KUO C L. Anaerobic biotransformation of pyridine in estuarine sediments[J]. Chemosphere, 1997, 35(10): 2255-2268.
- [18] LEE S T, RHEE S K, LEE G M. Biodegradation of pyridine by freely suspended and immobilized *Pimelobacter* sp[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1994, 41(6): 652-657.
- [19] DOSSANTOS VAPM, BRUIJNSE M, TRAMPER J, et al. The magic bead concept: An integrated approach to nitrogen removal with co-immobilized microorganisms[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1996, 45 (4): 447-453.
- [20] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 149.
- DONG Xiuzhu, CAI Miaoying. The handbook on identification of ordinary bacterial system[M]. Beijing: Science Press, 2001: 149.
- [21] VASIL'eva G K, BAKHAEVA L P, STRIZHAKOVA E R, et al. Accelerated microbial decomposition of 3,4-dichloroaniline in soil in the presence of activated carbon[J]. Eurasian Soil Science, 2004, 37 (8): 830-838.
- [22] ZHANG H M, KALLIMANIS A, KOUKKOU A I, et al. Isolation and characterization of novel bacteria degrading polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted Greek soils[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 65(1): 124-131.
- [23] GROHS B M, KUNZ B. Study OF Purine degradation in aqueous-solutions by *paracoccus*-denitrificans [J]. Current Microbiology, 1994, 28(5): 255-259.

## Biodegradation of pyridine in the slurry system

LIU Jiangjiang<sup>1</sup>, CHEN Lujun<sup>1</sup>, WEN Donghui<sup>2</sup>, HE Yushan<sup>2</sup>, QIAO Lin<sup>3</sup>, XIA Mian<sup>3</sup>, LI Yi<sup>4</sup>

1. Environment Simulation and Pollution Control State Key Joint Laboratory, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China;
2. Department of Environmental Sciences, College of Environmental Sciences, Peking University, Beijing 100871, China;
3. Beijing Weiming Kaituo Agro-biotechnology Group, Beijing 100089, China;
4. Department of Biotechnology, College of life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China

**Abstract:** The pollution of soil and underground water caused by nitrogen heterocyclic aromatics are increasingly serious nowadays. Bioremediation seems a promising solution to this problem. A bacteria strain W12, which could utilize pyridine as the sole carbon source and nitrogen source, was isolated from the active sludge in a lab bioreactor, and identified as species of *Paracoccus denitrificans*. In this study, we applied this strain in the slurry bioremediation in which the soil was simulated as polluted by pyridine. Under the experimental conditions, the adsorption of pyridine onto the soil was very weak, but fitting the Freundlich isotherm. When the initial concentration of pyridine was  $1.65 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , the inoculated strain could degrade the pyridine thoroughly within 12 h and 18 h in the sterilized soil and natural soil, respectively. It showed that the pyridine degradation efficiency by the strain W12 was depressed by the soil indigenous microbes because of food limitation. In addition, the influence of the delivering amount of the strain W12 as well as the external nitrogen resources and the soil-water-ratio of the slurry were studied. It showed that the delivering amount was an important factor to influence the biodegradation of pyridine in the slurry, while the external nitrogen resources and the soil-water-ratio had little effects on the biodegradation.

**Key words:** *Paracoccus denitrificans*; biodegradation; pyridine; bioremediation; slurry

