

· 环境生物技术 ·

# 一株红球菌属细菌 LV4 在高盐条件下的吡啶降解特性

王莹<sup>1</sup>, 陈虎<sup>2,3</sup>, 徐梦迪<sup>1</sup>, 吕永康<sup>1,2,4\*</sup>

1 太原理工大学 省部共建煤基能源清洁高效利用国家重点实验室, 山西 太原 030024

2 太原理工大学环境科学与工程学院, 山西 太原 030024

3 中国辐射防护研究所, 山西 太原 030006

4 山西浙大新材料与化工研究院, 山西 太原 030001

王莹, 陈虎, 徐梦迪, 吕永康. 一株红球菌属细菌 LV4 在高盐条件下的吡啶降解特性[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 1202-1216.

WANG Ying, CHEN Hu, XU Mengdi, LÜ Yongkang. Pyridine degradation characteristics of *Rhodococcus* sp. LV4 under high salinity conditions[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 1202-1216.

**摘要:** 由微生物介导的吡啶降解技术是解决高盐吡啶环境污染的经济有效方法之一, 开发具有吡啶降解性能且能够耐受高盐分的微生物是该类研究的重要前提。本研究从山西太原钢铁公司焦化废水处理厂活性污泥中分离培养了一株耐盐吡啶降解菌, 通过菌落形态和 16S rDNA 基因系统发育分析, 鉴定其为红球菌属(*Rhodococcus* sp.) 的细菌。耐盐性实验结果表明, 菌株 LV4 能够在 0%–6% 盐度范围内生长, 并完全降解初始浓度为 500 mg/L 的吡啶; 但当盐度高于 4% 时, 菌株 LV4 因其生长变缓而导致吡啶完全降解时间明显延长。扫描电镜结果显示, 高盐环境会使菌株 LV4 的菌体细胞分裂变慢, 诱导细胞表面分泌更多的颗粒状胞外聚合物(extracellular polymeric substance, EPS)。当盐度不高于 4% 时菌株 LV4 主要依靠 EPS 中蛋白含量的增加来响应高盐环境的冲击。单因素实验优化发现, 菌株 LV4 在盐度为 4% 的高盐环境中降解吡啶的最佳条件为温度 30 °C、pH 7.0、转速为 120 r/min (DO 10.30 mg/L)。最优条件下菌株 LV4 对于初始浓度为 500 mg/L 的吡啶, 在经过 12 h 的适应期后, 能以(29.10±0.18) mg/(L·h) 的最大速率将吡啶完全降解, 总有机碳(total organic carbon, TOC)去除率最高可达 88.36%, 表明菌株 LV4 对吡啶的矿化效果较好。利用液质联用仪检测到 11 种吡啶代谢中间产物, 推测菌株 LV4 主要通过环羟基化和环加氢还原 2 种代谢路径将吡啶完全降解。菌株 LV4 在高盐环境对吡啶的快速降解, 意味着其在高盐吡啶环境污染治理上具有实际应用的潜力。

**关键词:** 红球菌属; 高盐废水; 吡啶; 生物降解

资助项目: 山西省基础研究计划青年科学研究项目(202103021223099, 20210302124348); 山西浙大新材料与化工研究院基础研究项目(2021SX-AT004); 国家自然科学基金面上项目(51778397)

This work was supported by the Shanxi Provincial Science Foundation for Youths (202103021223099, 20210302124348), the Basic Research Project for Shanxi-Zheda Institute of Advanced Materials and Chemical Engineering (2021SX-AT004), and the National Natural Science Foundation of China (51778397).

\*Corresponding author. E-mail: lykang@tyut.edu.cn

Received: 2022-10-12; Accepted: 2022-11-18

# Pyridine degradation characteristics of *Rhodococcus* sp. LV4 under high salinity conditions

WANG Ying<sup>1</sup>, CHEN Hu<sup>2,3</sup>, XU Mengdi<sup>1</sup>, LÜ Yongkang<sup>1,2,4\*</sup>

1 State Key Laboratory of Clean and Efficient Coal Utilization, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, Shanxi, China

2 College of Environmental Science and Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, Shanxi, China

3 China Institute for Radiation Protection, Taiyuan 030006, Shanxi, China

4 Shanxi-Zheda Institute of Advanced Materials and Chemical Engineering, Taiyuan 030001, Shanxi, China

**Abstract:** Biodegradation of pyridine pollutant by microorganisms is one of the economical and effective methods to solve the environmental pollution of pyridine under high salinity conditions. To this end, screening of microorganisms with pyridine degradation capability and high salinity tolerance is an important prerequisite. In this paper, a salt-resistant pyridine degradation bacterium was isolated from the activated sludge of Shanxi coking wastewater treatment plant, and identified as a bacterium belonging to *Rhodococcus* on the basis of colony morphology and 16S rDNA gene phylogenetic analysis. Salt tolerance experiment showed that strain LV4 could grow and degrade pyridine with the initial concentration of 500 mg/L completely in 0%–6% saline environment. However, when the salinity was higher than 4%, strain LV4 grew slowly and the degradation time of pyridine by strain LV4 was significantly prolonged. Scanning electron microscopy showed that the cell division of strain LV4 became slower, and more granular extracellular polymeric substance (EPS) was induced to secrete in high salinity environment. When the salinity was not higher than 4%, strain LV4 responded to the high salinity environment mainly through increasing the protein content in EPS. The optimum conditions for pyridine degradation by strain LV4 at 4% salinity were 30 °C, pH 7.0 and 120 r/min (DO 10.30 mg/L). Under these optimal conditions, strain LV4 could completely degrade pyridine with an initial concentration of 500 mg/L at a maximum rate of (29.10±0.18) mg/(L·h) after 12 h adaptation period, and the total organic carbon (TOC) removal efficiency reached 88.36%, indicating that strain LV4 has a good mineralization effect on pyridine. By analyzing the intermediate products in pyridine degradation process, it was speculated that strain LV4 achieved pyridine ring opening and degradation mainly through two metabolic pathways: pyridine-ring hydroxylation and pyridine-ring hydrogenation. The rapid degradation of pyridine by strain LV4 in high salinity environment indicates its application potential in the pollution control of high salinity pyridine environment.

**Keywords:** *Rhodococcus* sp.; hypersaline wastewater; pyridine; biodegradation

吡啶(C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N)是焦化和煤气化等煤化工企业排放废水中的一种典型的有机污染物<sup>[1]</sup>,也是农药、医药、染料、消毒剂以及其他日用化学品的

生产的重要基础原料。吡啶具有显著的致畸、致癌和致突变的特性<sup>[2]</sup>,如不妥善处理就排放会对人类身体健康以及生态系统产生危害。同时,吡

啉分子结构上的氮原子有较大的电负性,可以吸引环上的电子而变成缺电子体系,从而妨碍氧从分子中获得电子,使其生物有氧降解性大大降低,难以被普通微生物利用<sup>[3]</sup>,导致常规废水生物处理系统难以实现吡啶类物质的有效处理。因此,探索开发对吡啶的高效处理技术是实现相关行业绿色可持续发展的关键。

生物法因其经济、降解较为彻底且不产生二次污染而应用广泛,其中以高效降解菌筛选分离为基础的生物强化技术最受关注。目前,诸多研究已从各类环境介质中分离筛选出吡啶高效降解菌,如 Wang 等<sup>[4]</sup>从好氧颗粒污泥中筛选获得一株具有良好吡啶降解性能的副球菌属(*Paracoccus* sp.)菌株 NJUST30,并发现了一条吡啶降解的新途径。孙磊等<sup>[5]</sup>从石家庄市某污水处理厂的活性污泥分离获得一株可降解吡啶的全食副球菌(*Paracoccus pantotrophus*) B21-3,通过逐步提高吡啶初始浓度对菌株 B21-3 进行驯化,驯化后菌株可耐受较高浓度吡啶,且吡啶降解率显著增加。Liu 等<sup>[6]</sup>从太原市某焦化废水处理厂的好氧曝气池活性污泥中筛选获得一株芽殖杆菌属(*Gemmobacter* sp.)细菌 ZP-12,它可将浓度高达 2 000 mg/L 的吡啶完全降解。这些菌株的获得大大拓展了吡啶的生物处理途径,但大都在无盐或者低盐度环境中实现对吡啶的降解。

然而,一些来自焦化、印染、制药等工业过程产生的废水除含有吡啶物质外,往往也含有较高的盐分,就会形成高盐吡啶废水。这类废水中的高盐度会对废水处理系统中的微生物产生严重的毒害作用,进一步增加了吡啶类废水的生物处理难度。有研究发现,筛选嗜耐盐菌可用于提升高盐有机废水的处理效果。黄莉婷等<sup>[7]</sup>将从不同菌源中筛选获得的 9 株耐盐菌配制成复合耐盐菌剂连续式运行处理实际煤化工反渗透浓盐水,有机物去除率可达到 30%左右。Ahmadi 等<sup>[8]</sup>

将从石油化工废水中筛选获得的 3 株耐盐菌用于构建耐盐菌群,并投加到序批式反应器(sequencing batch reactor, SBR)中进行实际含盐废水处理, SBR 强化反应器的有机物去除率最高可达 78.7%。Chen 等<sup>[9]</sup>采用耐盐石油降解菌与表面活性剂产生菌构建复合菌群,该菌群在 10 d 内对原油降解率可达 95.8%,并可在 pH 4–10 和盐度 0–120 g/L 范围内有效降解原油。这些研究结果均表明,耐盐菌在高盐有机废水的处理过程中发挥着重要作用。针对高盐吡啶类废水,耐盐吡啶降解菌的筛选可能是生物强化处理该类废水的关键,但目前关于具体的耐盐吡啶降解菌的筛选及降解性能研究还鲜有报道<sup>[10]</sup>,因此有必要加强耐盐吡啶降解菌筛选应用研究。

本研究以一株从焦化废水处理厂曝气池活性污泥中分离的吡啶高效降解菌 LV4 为研究对象,首先探究了该菌株的系统发育地位及其在高盐环境中的吡啶降解性能,然后研究了盐度对其吡啶降解过程中细胞形态及胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)分泌特性的影响,并通过单因素实验考察了环境因子对其高盐吡啶降解过程的影响规律,以期获得菌株 LV4 在高盐环境中降解吡啶的最优条件。最后利用液质联用分析了菌株 LV4 在高盐环境中吡啶代谢中间产物。研究结果将为耐盐菌株 LV4 应用于处理实际高盐吡啶废水提供重要理论参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

试剂:吡啶购于麦克林生化科技有限公司;磷酸氢二钾和磷酸二氢钠购于大茂化学试剂厂;七水硫酸镁和氯化钠购于科密欧化学试剂有限公司;七水硫酸亚铁和硫酸锰购于风船化学试剂科技有限公司。所有试剂均为化学分析纯试剂,

购买后未经处理直接使用。

仪器：紫外-可见分光光度计(TU-1810, 普析通用); TOC 分析仪(TOC-LCPN, 岛津); pH 测定仪(Seven2Go pro, 梅特勒-托利多); 摇床(DHZ-CA, 太仓); 离心分离机(HC-3018, 中科中佳科); 高压灭菌锅(YXQ-LS-75SII, 上海博讯实业有限公司); 生化培养箱(BJPX-300-II, 博科), 液质联用仪(1290UPLC-QTOF6550, 安捷伦)。

LB 培养基: 蛋白胨 10 g/L、酵母膏 5 g/L、NaCl 10 g/L, pH 7.0。

无机盐培养基:  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  0.30 g/L、 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$  0.20 g/L、 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  0.01 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05 g/L、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.01 g/L、NaCl 40.00 g/L, pH 7.0。所有液体培养基均由去离子水配置, 并于高压蒸汽灭菌锅中 121 °C 灭菌 20 min 后备用, 吡啉培养基则是在无机盐培养基灭菌冷却后直接加入相应浓度的吡啉。在上述液体培养基的基础上加入 1.8% 的琼脂用于制备固体培养基。

## 1.2 吡啉降解菌的富集、驯化与分离鉴定

活性污泥取自山西太原钢铁公司焦化废水处理厂的曝气池, 称取 5 g 活性污泥置于 100 mL 的 LB 液体培养基中, 放入 30 °C、120 r/min 的摇床中培养 1 d 后富集菌悬液。取 5 mL 上述菌悬液转入 100 mL 初始吡啉浓度为 500 mg/L 的液体无机盐培养基中, 30 °C、120 r/min 培养 1 周后, 继续接入上述吡啉液体培养基中相同培养条件下驯化培养 5 次。取驯化第 5 次的菌悬液在无菌 LB 固体培养基上进行梯度稀释涂布, 置于 30 °C 的培养箱内进行孵化, 培养 1–3 d 后可在平板上形成清晰可见的菌落。取单个形态不同的菌落进行固体培养基划线纯化(此步骤重复 3 次)。本次实验共计筛选出 4 株形态不同的菌株, 并将每个菌株接入初始浓度为 500 mg/L 的液体无机盐培养基中培养, 通过比较不同菌株间的吡啉降

解性能, 最终选取吡啉降解性能最好的菌株 LV4 为目标菌株用于后续实验研究。菌株 LV4 的 16S rDNA 基因扩增及测序相关工作委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行。

## 1.3 耐盐菌株 LV4 的保藏与活化

将筛选纯化获得的目标菌株 LV4 送至中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心进行保藏(保藏编号为 CGMCC NO. 25045)。菌株 LV4 在实验室过程中主要采用甘油冷冻保藏法保藏于 -70 °C 超低温冰箱中。取实验室保藏的耐盐菌株 LV4 接种至无菌 LB 培养基中, 于 30 °C、120 r/min 培养条件下进行第一次活化。待菌株生长 24 h 后转接至含初始吡啉浓度为 500 mg/L 的无机盐培养基中, 于 30 °C、120 r/min 培养条件下再次活化, 在吡啉无机盐培养基中活化 3 次后, 取第 3 次的活化培养液( $OD_{600} \approx 0.4$ )作为实验接种液用于后续实验。

## 1.4 耐盐菌株 LV4 耐盐性分析

配置盐度为 0%、1%、2%、3%、4%、5% 和 6% 的初始浓度为含 500 mg/L 的吡啉无机盐培养基, 将活化好的菌悬液以 5% (体积分数) 的接种量( $OD_{600} \approx 0.4$ )接入无菌的 100 mL 吡啉无机盐培养基内中, 30 °C、120 r/min 培养 72 h, 间隔 12 h 取样, 分别测定菌株 LV4 在不同盐度培养基中的生长(用  $OD_{600}$  表示)、吡啉和总有机碳(total organic carbon, TOC)的降解情况。

## 1.5 不同盐度对菌株 LV4 细胞微观形态的影响

将活化好的 LV4 菌悬液分别接种至盐度为 0% 和 4% 的初始浓度为 500 mg/L 吡啉无机盐培养基中, 于 30 °C、120 r/min 的摇床内培养, 直到菌株生长到对数期( $OD_{600} \approx 0.4$ )。取此时菌液作为目标菌液, 8 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 加入 2.5% 戊二醛固定液于 4 °C 固定 12 h, 倒掉固定液后用 PBS 缓冲液(pH 7.0)清洗样品 3 次,

每次都以 8 000 r/min 离心 15 min 后倒掉上清液。其次,用浓度梯度为 30%、50%、70%、90%和 100%的无水乙醇进行脱水处理(每次洗脱静置 15 min 在 8 000 r/min 下离心 5 min)后,放入 -20 °C 的冰箱冷冻过夜。最后进行冷冻干燥至粉末,将粉末放在固定的样品台上,喷金镀膜后进行电镜扫描观察。

### 1.6 不同盐度对菌株 LV4 胞外聚合物分泌情况的影响

将菌株 LV4 以 5% (体积分数)的接种量分别接种于盐度为 0%、1%、2%、3%和 4%的初始浓度为 500 mg/L 的吡啶无机盐培养基,并在各自生长对数期内进行取样,采用离子交换的方法对菌液进行 EPS 的提取。取对数期样品 30 mL 于离心管内,5 000 r/min 离心 15 min,倒去上清液,使用超纯水将收集到的细胞重悬至原来的体积。使用前将钠型阳离子交换树脂(732 型)在 8% 的 NaCl 溶液中浸泡 5 h,并将 30 mL 的重悬菌液与树脂按照 1:30 的质量比进行混合,于磁力搅拌器上室温搅拌 4 h,静置 5 min,将菌悬液在 4 °C、10 000 r/min 条件下离心 10 min,取上清液经 0.22 μm 的滤膜过滤得到 EPS 溶液。

### 1.7 高盐条件下环境因子对菌株 LV4 吡啶降解性能的影响

对于初始吡啶浓度影响实验,设定初始吡啶浓度梯度为 100、300、500、700 和 900 mg/L,于 30 °C、120 r/min、pH 7.0 条件下培养 36 h。对于温度影响实验,设定培养温度为 25、30、35 和 40 °C,120 r/min、pH 7.0 培养 24 h。对于初始 pH 实验,设定 pH 范围为 4、5、6、7、8、9 和 10,30 °C、120 r/min 培养 24 h。对于溶解氧实验,实验通过调节转速进行不同溶解氧(dissolved oxygen, DO)的设定,设定转速为 40、80、120、160 和 200 r/min,30 °C、pH 7.0 条件下培养 36 h。所有影响因素试验中均取活化好的

菌液以 5% (体积分数)的接种量接种于盐度为 4%的初始浓度为 500 mg/L 的吡啶无机盐培养基中(初始吡啶浓度影响实验除外),在规定实验周期内取一定量的菌液用于测定  $OD_{600}$ 、吡啶和 TOC 含量。

### 1.8 菌株 LV4 在优化条件下的高盐吡啶降解性能

将菌株 LV4 以 5% (体积分数)的接种量接种至盐度为 4%的初始吡啶浓度为 500 mg/L 的吡啶无机盐培养基中,在 30 °C、120 r/min、pH 7.0 的优化培养条件下培养 72 h,间隔 12 h 取样用于测定  $OD_{600}$ 、TOC、吡啶、 $NH_4^+$ -N 浓度以及 pH 的变化。

### 1.9 菌株 LV4 在高盐条件下吡啶降解中间产物分析

将菌株 LV4 以 5% (体积分数)的接种量接种至盐度为 4%的初始吡啶浓度为 500 mg/L 的吡啶无机盐培养基中,在 30 °C、120 r/min、pH 7.0 的优化培养条件下培养 72 h,分别在菌株生长的对数期以及稳定期取样,8 000 r/min 离心 10 min,取上清液用 0.22 μmol/L 滤膜过滤后取上清液利用液质联用仪分析了菌株 LV4 降解吡啶的中间体。仪器参数条件为:流动相为 0.1%甲酸水溶液(甲醇溶液=3:7),液相分析进样 3 μL,流动相泵速 0.3 mL/min,正负电喷雾电离分析  $m/z$  30–300 Da 全扫描。操作条件为鞘内气体温度为 350 °C;气体流速为 12 L/min;ESI<sup>+</sup>模式:电压 4 000 V;ESI 模式:电压 3 200 V。

### 1.10 测试与数据分析方法

采用紫外-可见分光光度计于波长 254 nm 处测定水中吡啶含量;采用 TOC 测定仪依照直接燃烧测定法分析水中 TOC 含量;菌株 LV4 生长量采用  $OD_{600}$  值表征,即紫外可见分光光度计在波长 600 nm 处的吸光度值;采用纳氏试剂分光光度法测定水中氨氮含量。采用福林酚法测定

胞外蛋白(protein, PN), 采用苯酚-浓硫酸法测定胞外多糖(extracellular polysaccharide, PS)。菌株 LV4 的细胞干重( $y$ )与  $OD_{600}$  ( $x$ )之间的呈线性相关, 关系式为  $y=1\ 254.2x+41.547$  ( $R^2=0.997$ )。所有实验重复 3 次, 实验结果主要以平均值 $\pm$ 标准差的形成表示, 同时使用 SPSS 17.0 软件对不同环境因子下的吡啶降解率、TOC 降解率和菌株 LV4 生长量进行单因素方差分析(one-way analysis of variance, one-way ANOVA), 并根据方差是否齐性选择最小显著差异法(least significant difference, LSD)或者 Tamhane's T2 等多重比较方法, 以  $P<0.05$  作为具有显著性差异的标准。

## 2 结果与分析

### 2.1 耐盐吡啶降解菌 LV4 的分离鉴定

从焦化污泥中经富集、驯化和分离出一株吡啶降解菌, 命名为 LV4。利用 16S rRNA 基因通用引物从菌株 LV4 基因组中成功扩增获得长度约为 1 500 bp 的目标 DNA 片段(图 1), 测序所得 16S rRNA 基因序列已提交至 GenBank (登录号为 OM108125)。通过 16S rDNA 基因序列同源性分析发现, 菌株与 *Rhodococcus* sp. YC-JH2 序列同源性高达 100%, 可推测菌株 LV4 为红球菌

属细菌。图 2 系统发育树结果表明, 菌株 LV4 与红球菌属的细菌聚集在同一分支上, 进一步确定了菌株 LV4 归属于红球菌属(*Rhodococcus* sp.)。该菌属已被报道在喹啉、吡啶等氮杂环化合物降解方面具有重要作用<sup>[11-13]</sup>, 但对其在高盐条件下吡啶降解性能的研究还不够系统, 因此, 本研究重点分析了菌株 LV4 在高盐条件下的吡啶降解性能。

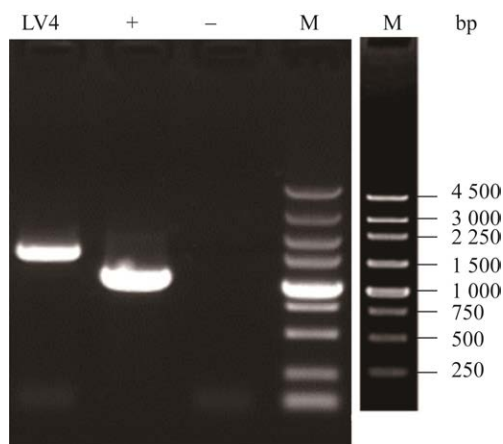


图 1 菌株 LV4 的 16S rRNA 基因 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图 M: 分子量标准; +: 阳性对照; -: 阴性对照; LV4: 16S rRNA 基因 PCR 产物

Figure 1 Agarose gel electrophoresis map of the 16S rRNA gene PCR product of strain LV4. M: Molecular weight standard; +: Positive control; -: Negative control; LV4: The 16S rRNA gene PCR product.

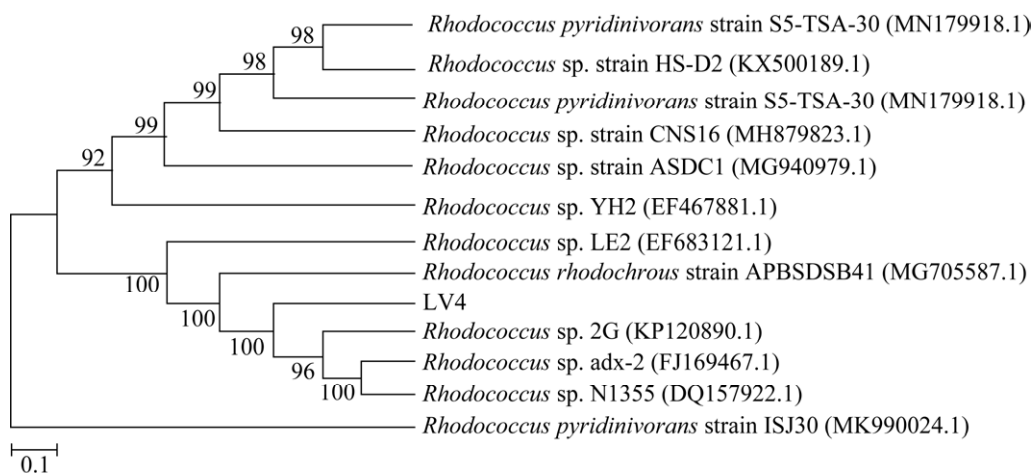


图 2 菌株 LV4 的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree constructed for strain LV4.

## 2.2 菌株 LV4 在不同含盐吡啶废水中的降解性能

高盐废水一般指总含盐质量分数不低于 1% 的废水, 一般而言, 在盐度耐受范围内, 微生物可通过调节自身的渗透压来保护细胞内的原生质, 调节自身新陈代谢以适应盐度的变化。一旦环境中含盐量超过微生物的耐受范围时, 会抑制微生物生长及代谢活动, 使反应器的废水处理效果恶化, 甚至崩溃<sup>[14]</sup>。因此有必要研究不同盐度对菌株 LV4 的细胞生长与吡啶降解性能的影响。如图 3A 所示, 当盐度不高于 4% 时, 菌株 LV4 在经过 12 h 的延滞期后进入快速生长的对数期, 至 48 h 时菌株 LV4 在盐度为 0%、1%、2%、3% 和 4% 的  $OD_{600}$  值均达到最大, 分别为  $0.56\pm 0.02$ 、 $0.53\pm 0.01$ 、 $0.50\pm 0.01$ 、 $0.50\pm 0.01$  和  $0.49\pm 0.01$ 。而当盐度继续升高至 5% 和 6% 时, 菌株 LV4 的整个生长过程明显变缓, 各生长时期对应的  $OD_{600}$  值明显低于无盐环境(盐度为 0%) 和 1%–4% 盐度范围内的  $OD_{600}$  值, 至培养 72 h 和 84 h 时菌株 LV4 的  $OD_{600}$  值达到最大, 分别为  $0.37\pm 0.00$  和  $0.35\pm 0.01$ 。

不同盐度下菌株 LV4 对吡啶的降解性能如图 3B 所示, 结果表明吡啶降解与菌株 LV4 生长过程密切相关。当盐度不高于 4% 时菌株 LV4 可

在 36 h 内完全降解初始浓度为 500 mg/L 的吡啶, 而在盐度为 5% 时菌株 LV4 需要 72 h 才能完全降解初始浓度为 500 mg/L 的吡啶, 当盐度继续升高至 6% 时, 该菌株降解 500 mg/L 的吡啶则需要 84 h 时间。整个实验过程中未接菌株 LV4 的空白对照组几乎没有  $OD_{600}$  增长及吡啶降解(图中未显示)。综上所述, 吡啶的降解与菌株 LV4 在高盐条件中的生长密切相关, 当废水盐度高于 4% 时, 菌株 LV4 的生长及其对吡啶降解明显变缓变慢。因此我们选定盐度为 4% 进行后续高盐吡啶降解性能的研究。

尽管盐度不高于 4% 时菌株 LV4 均能够在 36 h 内完全降解吡啶, 但各时期对应的  $OD_{600}$  值几乎都低于无盐环境中菌株 LV4 生长  $OD_{600}$  值, 这说明盐度会影响菌株细胞的生长, 尤其是盐度高于 4% 的高盐环境对菌株 LV4 的影响直观反映在生长变缓延滞期延长上, 推测是由于细胞受到高盐度的毒性影响, 因此我们通过扫描电子显微镜观察了盐度为 4% 的高盐环境对菌株 LV4 细胞的毒性影响, 结果如图 4 所示。在无盐度对照组(图 4A–4B)中, 菌株 LV4 的菌体细胞呈杆状、两端钝圆, 单个排列出现; 菌体细胞完整且直径较长, 大都处于细胞分裂周期中, 说明无盐对照组中菌体细胞生长旺盛。而在盐度为 4% 的实验组

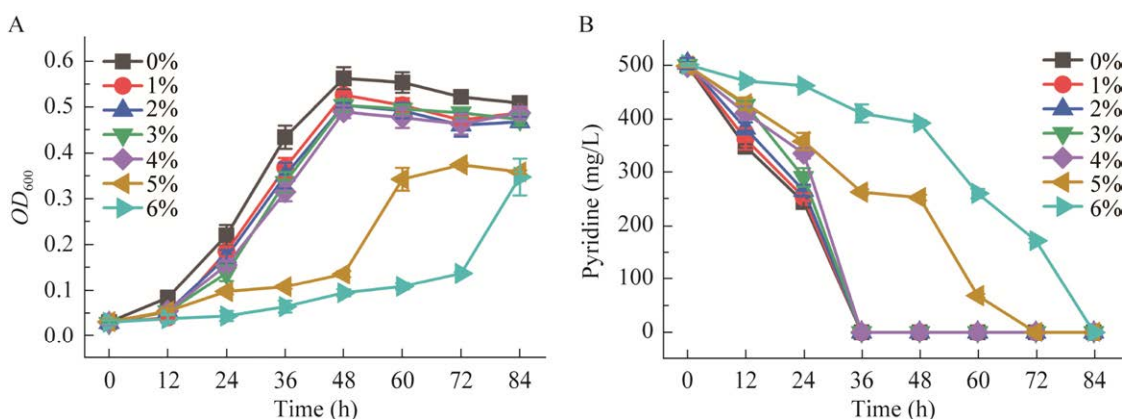


图 3 不同盐度对菌株 LV4 的细胞生长(A)与吡啶降解(B)的影响

Figure 3 Growth (A) and pyridine degradation (B) of strain LV4 at different salinities.

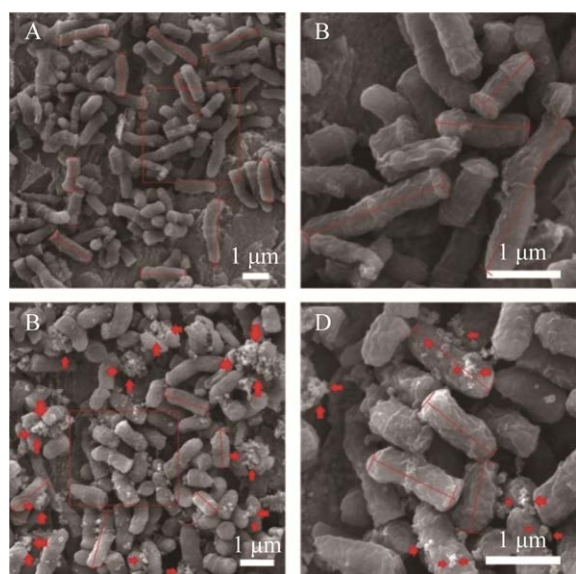


图 4 扫描电子显微镜观察高盐对菌株 LV4 细胞形态的影响 A–B: 对照组(无盐度). C–D: 实验组(盐度为 4%)

Figure 4 Effects of salinity on cellular morphology of strain LV4 using scanning electron microscope. A–B: Control group (without salinity). C–D: Experiment group (with 4% of salinity).

(图 4C–4D)中, 菌体细胞直径明显缩短, 大部分细胞细胞分裂变慢; 菌体细胞表面皱缩严重, 这与 Gui 等研究中的高盐度下的菌体细胞特征变化基本相同<sup>[15]</sup>, 可能是由高盐度引起渗透压升高而造成细胞脱水所致。此外, 与对照组细胞相比, 高盐度实验组中菌体细胞表面出现大量的散状颗粒团附着, 推测该物质为细胞分泌的胞外聚合物 EPS<sup>[16–18]</sup>。为证明上述推断, 进一步研究了不同盐度对菌株 LV4 分泌 EPS 特性的影响。如图 5 所示, 盐度增加会诱导菌株 LV4 细胞分泌更多的 EPS 来抵抗高盐度的毒害, 其中胞外多糖 PS 含量随盐度的增加而略有增加, 但变化并不明显 ( $P>0.05$ )。而 EPS 中 PN 含量却随盐度的增加而显著升高 ( $P<0.05$ ), 即当盐度从 0% 升高到 4% 时, PN 含量从 135.54 mg/(g cell dry weight, g CDW) 上升到 205.45 mg/(g CDW)。

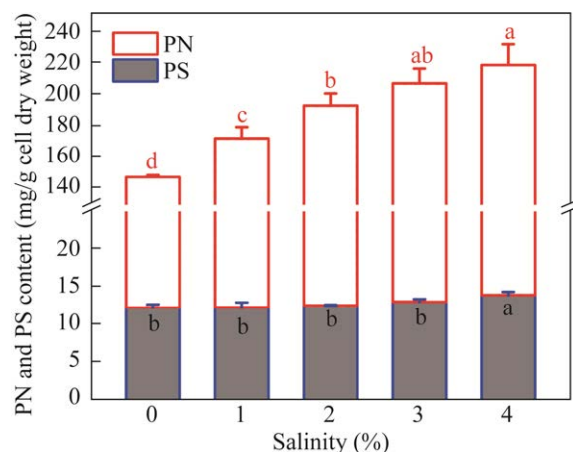


图 5 盐度对菌株 LV4 胞外聚合物中 PN 与 PS 含量的影响 显著性差异采用小写字母标记: 相同字母表示差异不显著 ( $P>0.05$ ), 不同字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )

Figure 5 Effects of salinity on PN and PS in EPS of strain LV4. Symbols for significant differences are indicated as the lowercase letters: the same letter means no significant difference ( $P>0.05$ ), the different letters indicate significant differences ( $P<0.05$ ).

## 2.3 高盐条件下环境因子对于菌株 LV4 吡啶降解性能的影响

### 2.3.1 初始吡啶浓度

吡啶作为抑制性底物, 底物浓度对其生物降解性能有显著影响<sup>[4,19–20]</sup>, 因此有必要探究初始吡啶浓度对菌株 LV4 的高盐吡啶降解影响。如图 6A 所示, 当吡啶浓度不高于 500 mg/L 时菌株 LV4 可在 36 h 内完全降解吡啶, 去除率均为 100%; 而当吡啶浓度高于 500 mg/L 时, 吡啶降解率随吡啶浓度升高而降低: 初始吡啶浓度分别为 700 mg/L 和 900 mg/L 时, 吡啶去除率分别为 78.69% 和 54.47%。与此同时, 当吡啶初始浓度分别为 100、300、500、700 和 900 mg/L 时, TOC 降解率分别为 64.58%、81.06%、84.58%、78.82% 和 45.12%, 这表明菌株 LV4 在高盐环境中对吡啶有很好的矿化能力。菌株 LV4 在培养 36 h 时的  $OD_{600}$  随浓度升高而升高, 这主要是因为吡啶浓度升高可为菌株 LV4 提供了更多的碳氮源, 使其在渡过延滞期



后生长更好。当培养周期延长至 72 h 时,菌株 LV4 可将 700 和 900 mg/L 的吡啶完全降解,对应 TOC 去除率分别为 85.45%和 78.09% (图中结果未显示),说明实验范围内菌株 LV4 可在高盐环境中实现高浓度吡啶的有效降解。综合考虑吡啶与 TOC 降解情况、菌株 LV4 生长量及实验周期,选定 500 mg/L 为后续高盐吡啶降解实验的初始浓度。

### 2.3.2 温度

培养温度是微生物细胞生长、酶活性和各种难降解化合物如吡啶的降解能力的主要影响因素<sup>[21-22]</sup>。如图 6B 所示,在盐度为 4%的高盐环境中菌株 LV4 具有较广的温度适应范围,可在 25–40 °C 的温度范围内以吡啶为唯一碳氮源进行生长,其中当温度为 30 °C 时,菌株 LV4 的生长最佳,此时吡啶降解率为 49.16%,明显高于其他温度下的吡啶降解率( $P < 0.05$ ),表明各培养温度下菌株 LV4 对吡啶降解能力存在显著性差异。在整个 72 h 培养周期中,各培养温度条件下吡啶都能被菌株 LV4 完全降解并具有较好的矿化效果,当培养温度为 30 °C 时 TOC 去除率可达 88% (图中结果未显示)。综上所述,菌株 LV4 在 25–40 °C 的温度范围内对高盐吡啶废水的降解效果较好,最佳温度为 30 °C。

### 2.3.3 初始 pH

与培养温度一样,pH 也是影响微生物生长、酶活性以及各种污染物降解性能的主要因素之一<sup>[22-23]</sup>,因此有必要研究初始 pH 对菌株 LV4 在高盐条件下降解吡啶性能的影响,结果如图 6C 所示。在盐度为 4%的高盐环境下,菌株 LV4 可在 pH 4–10 范围内以吡啶为唯一碳氮源进行生长。通过菌株 LV4 培养 24 h 时的吡啶降解率进行统计分析,结果表明各初始 pH 条件下菌株 LV4 对吡啶降解能力存在显著性差异,其中初始 pH 为 7 时,菌株 LV4 的吡啶降解效果最好( $P < 0.05$ ),吡啶降解率为 42.63%。不难发现,菌株 LV4 在初始 pH 为 4 或 10 时仍能够以吡啶为

唯一碳氮源进行生长,培养至 72 h 时  $OD_{600}$  分别为 0.42 和 0.29,对应吡啶降解率分别为 100%和 15.77% (图中结果未显示),表明菌株可在强酸或强碱的环境中生长并降解吡啶,但酸性或碱性越强对菌株 LV4 生长抑制性越大。以上实验结果表明菌株 LV4 可在 pH 4–10 的范围内存活,并且当 pH 为 7 时吡啶降解效果最好。

### 2.3.4 溶解氧(DO)

溶解氧是好氧生物降解过程的一个重要参数,培养基的溶解氧含量可以通过调节摇床转速来实现<sup>[24]</sup>。如图 6D 所示,在盐度为 4%的高盐环境中,菌株 LV4 的生长、吡啶及 TOC 降解率均随着转速升高而逐渐增大,至转速为 120 r/min 时菌株生长最佳( $OD_{600}=0.57$ ),此时吡啶与 TOC 降解率达到最大,分别为 100%和 84.78%。与转速 120 r/min 相比,转速为 160 r/min 时菌株 LV4 的细胞生长( $OD_{600}=0.59$ )、吡啶与 TOC 降解率差别不太明显,此时吡啶与 TOC 降解率分别为 97.38%和 78.70%。转速继续升高至 200 r/min 时菌株 LV4 的吡啶与 TOC 降解率有所下降,分别为 90.36%和 78.61%,这可能是由于转速太高振荡剧烈使得菌体与底物之间接触不充分而引起吡啶降解效率下降。综上所述,适当提高振荡速度可促进细胞生长与吡啶的降解,考虑到吡啶与 TOC 降解率以及菌株 LV4 生长量,选定 120 r/min (初始 DO 为 10.30 mg/L)为摇床转速进行后续实验。

### 2.4 最优条件下菌株 LV4 的高盐吡啶降解性能

在前面实验中我们探究了不同环境因子对菌株 LV4 在高盐环境下的吡啶降解性能的影响,得出菌株 LV4 在高盐环境下最优吡啶降解条件为初始吡啶浓度为 500 mg/L、培养温度为 30 °C、初始 pH 为 7、转速为 120 r/min。后续我们将在上述最优条件下系统研究菌株 LV4 的高盐吡啶降解性能。如图 7A 所示,菌株 LV4 在前 12 h 内处于延滞期而细胞生长缓慢,此时水中吡啶含量由初始 ( $502.33 \pm 6.54$ ) mg/L 逐渐降低为

(424.56±4.90) mg/L。之后菌株 LV4 进入快速生长的对数期,  $OD_{600}$  值由 12 h 时的  $0.09±0.00$  迅速升高至 36 h 时的  $0.57±0.02$ ; 对数生长期内菌株吡啶含量迅速下降至零, 此时吡啶平均去除率为  $(17.69±0.35)$  mg/(L·h), 这说明吡啶的降解

与细胞生长密切相关。水中 TOC 降解与吡啶降解趋势基本一致, 至培养 72 h 时最终稳定在  $(42.80±1.05)$  mg/L 左右, 此时 TOC 降解率为 88.36%, 进一步说明菌株 LV4 对吡啶的矿化效果较好(图 7A)。随着吡啶的开环降解, 水中  $NH_4^+-N$

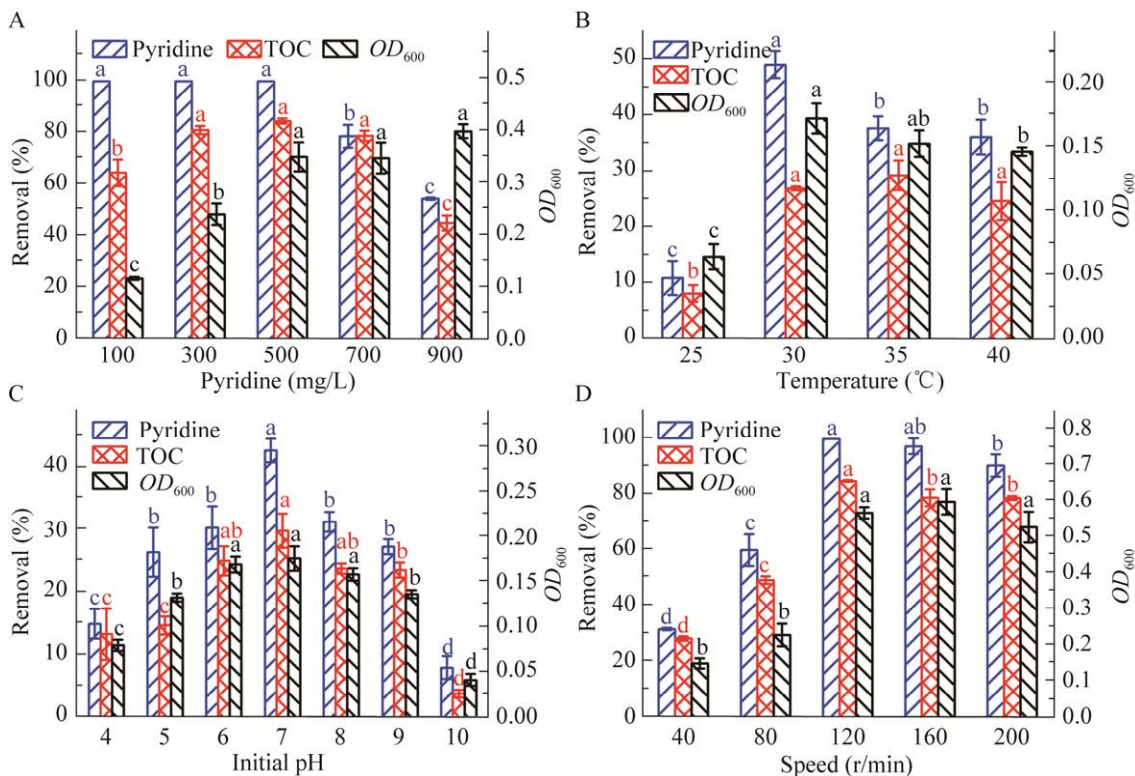


图 6 初始吡啶浓度(A)、温度(B)、初始 pH (C)和溶解氧(D)对菌株 LV4 高盐吡啶降解性能的影响 显著性差异采用小写字母标记: 相同字母表示差异不显著( $P>0.05$ ), 不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )  
 Figure 6 Effects of initial pyridine concentration (A), temperature (B), initial pH (C) and dissolved oxygen (D) on pyridine degradation by strain LV4 under high salinity condition. Symbols for significant differences are indicated as the lowercase letters: the same letter means no significant difference ( $P>0.05$ ), the different letters indicate significant differences ( $P<0.05$ ).

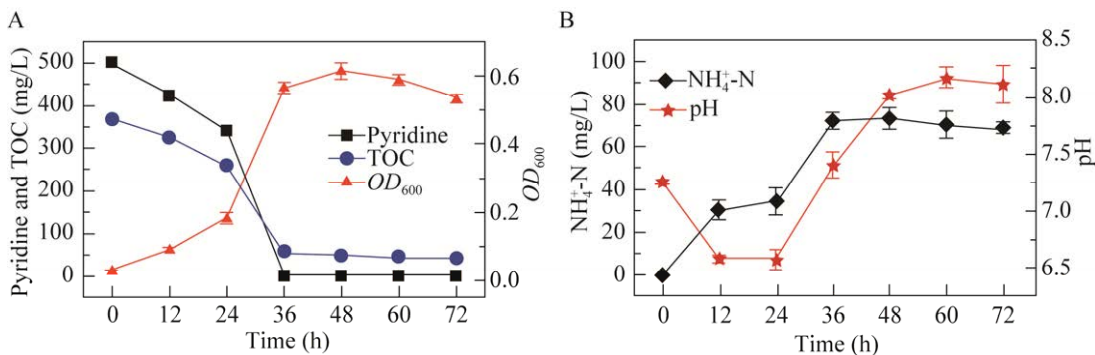


图 7 菌株 LV4 在最优条件下的细胞生长与吡啶降解特性  
 Figure 7 Growth and pyridine degradation characteristics of strain LV4 under optimum conditions.

含量不断升高,至培养 48 h 时氨氮含量达到最高,约为 73 mg/L,之后略有降低并维持在 70 mg/L 左右(图 7B),而水中初始吡啶的含 N 量理论计算值约为 77 mg/L,说明了吡啶开环后的 N 存在形式多以  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  的形式存在。在整个实验测定过程中水中 pH 呈现先降低后升高的变化趋势(图 7B),前期 pH 有所降低可能是吡啶降解过程中会产生酸性物质所致,而随着吡啶开环过程中的释放  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  含量增加而引起水中 pH 值逐步上升。

## 2.5 菌株 LV4 的吡啶代谢中间产物分析














红球菌属菌株 LV4 在高盐条件下的吡啶降解过程中,利用 HPLC/MS 方法检测到了 6 个主要代谢中间体,吡啶生物降解过程中主要中间体的相关信息如表 1 所示。中间体 M1 的  $m/z$  为 79.10 与吡啶( $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ , 79.18)的相对分子质量相符,可认定为吡啶。M2 的  $m/z$  为 95.09 与化学式  $\text{C}_5\text{H}_4\text{NO}$  (95.10)的相对分子质量相符,是吡啶氮杂环上 C2 位羟基化形成的产物 2-羟基吡啶<sup>[25]</sup>。M3 的  $m/z$  为 111.12 与 2,6-二羟基吡啶( $\text{C}_5\text{H}_5\text{NO}_2$ , 111.10)的相对分子质量相符,可认定为 2,6-二羟

基吡啶,是在 2-羟基吡啶的基础上又进行的羟基化反应后的产物<sup>[26]</sup>。M4 的  $m/z$  为 129.16 与化学式  $\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_3$  (129.12)的相对分子质量相符,是 2,6-二羟基吡啶水解裂解后生成的产物 3-戊烯酸单酰胺<sup>[26]</sup>。M5a 的  $m/z$  为 116.07 与顺丁烯二酸( $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$ , 116.07)的相对分子质量相符,是 3-戊烯酸单酰胺脱氨基后的产物<sup>[27]</sup>,并可在相关异构酶作用下产生三羧酸循环的重要中间产物反丁烯二酸(M5b)<sup>[28]</sup>。

中间产物 M6 的  $m/z$  为 97.10 与化学式  $\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}$  的相对分子量相匹配。M6 具有两个不同的立体化学结构,分别为吡啶环的羟基化中间体 1,2-二氢吡啶-2-醇(M6a)和 2,3-二氢吡啶-2-醇(M6b),前者可进一步羟基化生成中间产物 2,6-二羟基吡啶<sup>[26]</sup>,后者则被认定为氢化反应路径的重要产物<sup>[4,27]</sup>。代谢产物 M7 的  $m/z$  为 101.13 与化学式  $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}$  (101.15)的相对分子质量相对应,经鉴定为哌啶-2-醇,其可能是由 1,2-二氢吡啶-2-醇加氢生成的<sup>[4]</sup>。中间体 M8 的  $m/z$  为 131.15,与元素公式  $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_3$  (131.13)相匹配,可以鉴定为 4-甲酰胺丁酸,可能是由哌啶-2-醇

表 1 菌株 LV4 在吡啶生物降解体系中的中间体

Table 1 Intermediates of strain LV4 in pyridine biodegradation systems

Metabolites	Compounds	Formula	Calculated mass	Observed mass	Proposed structure
M1	Pyridine	$\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$	79.18	79.10	
M2	2-hydropyridine	$\text{C}_5\text{H}_5\text{NO}$	95.10	95.09	
M3	2,6-dihydroxypyridine	$\text{C}_5\text{H}_5\text{NO}_2$	111.10	111.12	
M4	3-pentenoic acid monoamide	$\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_3$	129.12	129.16	
M5a	Maleic acid	$\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$	116.07	116.07	
M5b	Fumaric acid	$\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$	116.07	116.07	
M6a	1,2-dihydropyridin-2-ol	$\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}$	97.12	97.10	
M6b	2,3-dihydropyridin-2-ol	$\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}$	97.12	97.10	
M7	Piperidin-2-ol	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}$	101.15	101.13	
M8	4-formamidobutanoic acid	$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_3$	131.13	131.15	
M9	Dihydro-2(3H)-furanone	$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2$	86.09	86.10	
M10	Succinic semialdehyde	$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$	102.09	102.11	
M11	Succinic acid	$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4$	118.09	118.15	

氧化加氢生成的<sup>[4]</sup>。中间体 M9 和 M10 的  $m/z$  分别为 86.10 和 102.11, 分别与化学式  $C_4H_6O_2$  (86.09) 和  $C_4H_6O_3$  (102.09) 的相对分子质量相对应, 可分别被鉴定为二氢-2(3H)-咪喃酮和琥珀酸半醛。代谢产物 M11 的  $m/z$  为 118.15, 与琥珀酸的( $C_4H_6O_4$ , 118.09) 的相对分子质量相对应, 可被认定为琥珀酸。

### 3 讨论与结论

以高效吡啶降解菌筛选分离为基础的生物强化处理技术是一种解决吡啶污染环境的经济有效途径。然而, 焦化废水、印染废水、制药废水等工业废水中不仅含有吡啶物质, 同时也含有高浓度的盐分, 形成了高盐吡啶废水。该类废水盐度较高, 会破坏微生物的细胞膜和生物酶, 抑制微生物的生长和繁殖, 从而制约了该类废水的生物处理效果。目前文献报道的吡啶降解微生物大都是在无盐或低盐环境中进行的<sup>[4-6]</sup>, 而对于高盐环境中的吡啶降解还鲜有报道<sup>[10,22,29]</sup>。因此, 开发具有吡啶降解性能且能够耐受高盐分的微生物, 对于实现高盐吡啶废水有效处理显得尤为重要。

本研究以吡啶为唯一碳氮源, 对焦化废水处理厂的活性污泥进行驯化富集, 经过分离、纯化与鉴定, 最终得到降解吡啶的高效菌株 *Rhodococcus* sp. LV4。尽管研究已发现该菌属细菌对喹啉、吡啶等氮杂环化合物具有一定的降解功能<sup>[11-13]</sup>, 但关于其高盐条件下吡啶降解性能的研究甚少。因此, 本研究重点探究了菌株 LV4 在高盐条件下吡啶降解性能, 结果发现当初始吡啶浓度为 500 mg/L 时, 菌株 LV4 能够在无盐环境和 1%–6% 盐度范围内生长并完全降解吡啶, 但当盐度高于 4% 时, 吡啶降解因菌株 LV4 生长变缓而变慢。扫描电镜结果显示, 高盐环境会使菌株 LV4 的菌体细胞细胞分裂变慢、表面皱缩

严重, 这可能是导致菌株在高盐环境生长变缓延滞期增长的主要原因。进一步通过 EPS 分泌实验证实盐度不高于 4% 时, 盐度增加会诱导菌株 LV4 分泌更多的 EPS, 并主要依靠蛋白含量的增加来响应盐度变化<sup>[18,30]</sup>, 这是因为这些蛋白不仅在高盐环境下维持细胞渗透压, 还参与细胞内物质的运输和合成、维持氨基酸序列, 保证细胞正常的生理活性<sup>[31]</sup>。

菌株 LV4 对吡啶的降解与其生长密切相关, 因此最佳生长条件的优化能够最大限度地促进菌株生长并保证对目标污染物的降解。单因素实验结果表明菌株 LV4 在 4% 高盐环境中的最优条件为温度 30 °C、pH 7.0、转速为 120 r/min (初始 DO 10.30 mg/L)。在最优条件下, 菌株 LV4 对初始浓度为 500 mg/L 的吡啶, 在经过 12 h 的适应期后, 能以 (29.10±0.18) mg/(L·h) 的最大速率将其降解完全。最优条件下, 菌株 LV4 在 36 h 内的降解速率为 13.88 mg/(L·h), 后续研究还发现最优条件下菌株 LV4 可在 72 h 内完全降解初始浓度为 1 300 mg/L 的吡啶, 对应 72 h 内的降解速率为 18.06 mg/(L·h), 这与已报道的诸多菌种相比(表 2), 菌株 LV4 在盐度为 4% 的高盐环境中仍具有高效率的优势, 这为生物强化处理高盐废水的实际应用提供了一种高效降解菌。

通过分析菌株 LV4 在吡啶降解过程中的中间产物, 推测菌株 LV4 可能存在环羟基化与环加氢还原两种代谢路径(图 8)。第一种路径从羟基化开始生成羟基化产物, 其羟基化位置通常是在吡啶氮杂环上 C 位 2、3 和 6 处, 例如 2-羟基吡啶、2,5-二羟基吡啶、2,6-二羟基吡啶、2,3,6-三羟基吡啶等<sup>[25-26,33]</sup>。经查阅文献知 2,3,6-三羟基吡啶会自发氧化形成尼古丁蓝, 因此在微量 2,3,6-三羟基吡啶的情况下, 培养物将变成蓝色<sup>[34-35]</sup>。此外, 2,5-二羟基吡啶同样会为培养带来蓝色和棕色<sup>[27,34]</sup>, 但在本研究过程中菌株 LV4

表 2 不同菌株对吡啶生物降解的比较

Table 2 Comparison of pyridine biodegradation by different strains

Bacterial strains	Initial pyridine (mg/L)	Degradation time (h)	Degradation rate (%)	Degradation speed (mg/(L·h))	Salinity (%)	References
<i>Pseudomonas</i> sp. ZX08	500	168	100	2.98	0	[32]
<i>Paracoccus pantotrophus</i> B21-3	500	96	71.50±3.00	3.72	0	[5]
<i>Paracoccus</i> sp. NJUST30	500	54	100	9.26	0	[4]
<i>Gemmobacter</i> sp. ZP-12	500	36	100	13.72±0.21	0	[6]
<i>Enterobacter</i> sp. BD19	200	72	76.67±1.67	2.13	3	[22]
<i>Bacillus altitudinis</i> H21	1 000	96	70	7.29	3	[10]
<i>Rhodococcus</i> sp. LV4	500	36	100	13.88	4	This study

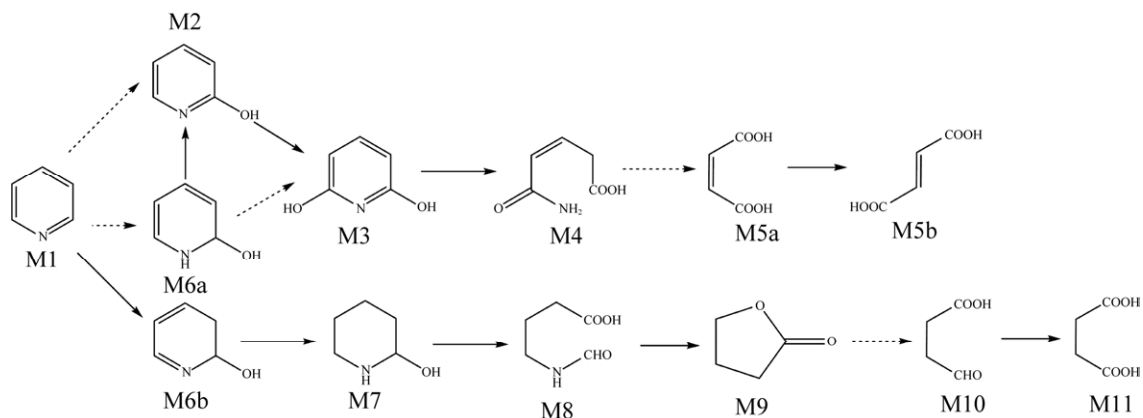


图 8 红球菌属细菌 LV4 可能的吡啶降解路径

Figure 8 Possible pyridine biodegradation pathways of *Rhodococcus* sp. LV4.

培养基始终为乳白色而未变蓝，因此排除 2-羟基吡啶转化为 2,5-二羟基吡啶和 2,3,6-三羟基吡啶这一途径。至此，提出了菌株 LV4 羟基化反应路径<sup>[26-27,33]</sup>：吡啶氮杂环经过第一步的羟基化后生成 2-羟基吡啶或者 1,2-二氢吡啶-2-醇。2 种中间产物的吡啶环继续被羟基化生成了 2,6-二羟基吡啶。2,6-二羟基吡啶水解开环裂解后生成产物 3-戊烯酸单酰胺，并经过一系列氧化脱氨基等反应生成氨氮和反丁烯二酸，后者进入三羧酸循环可被彻底氧化生成二氧化碳和水。菌株 LV4 也可能存在另一种加氢还原路径<sup>[4,27]</sup>：吡啶环经过羟基化和 C1 位的吡啶环的氢化生成 2,3-二氢吡啶-2-醇，随后 C-N 键和 C-C 键均被氢化形成代谢物哌啶-2-醇，其进一步氧化为 4-甲酰胺

丁酸。后者可被进一步氧化脱氨形成二氢-2(3H)-咪喃酮，随后被转化为琥珀酸半醛和琥珀酸，进入三羧酸循环。路径中产生的氨氮与前期培养基中不断增加的氨氮相对应，说明菌株 LV4 在降解吡啶的过程中吡啶环上的 N 大部分是以氨氮的形式存在<sup>[33]</sup>，符合代谢路径过程中产生氨氮这条路径。本研究中提出的吡啶降解路径也为今后吡啶降解的相关研究给与了更广阔的思路。

## REFERENCES

- [1] 何苗, 张晓健, 瞿福平, 顾夏声. 焦化废水中芳香族有机物及杂环化合物在活性污泥法处理中的去除特性[J]. 中国给水排水, 1997, 13(1): 14-17.  
HE M, ZHANG XJ, QU FP, GU XS. Removal characteristics of aromatic and heterocyclic organic

- compounds of coke plant wastewater treated by activated sludge process[J]. *China Water & Wastewater*, 1997, 13(1): 14-17 (in Chinese).
- [2] LIU SM, WU CH, HUANG HJ. Toxicity and anaerobic biodegradability of pyridine and its derivatives under sulfidogenic conditions[J]. *Chemosphere*, 1998, 36(10): 2345-2357.
- [3] 何苗, 张晓健, 瞿福平, 顾夏声. 杂环化合物好氧生物降解性能与其化学结构相关性的研究[J]. *中国环境科学*, 1997, 17(3): 199-202.
- HE M, ZHANG XJ, QU FP, GU XS. Study on relativity between aerobic biodegradability and chemical structure of heterocyclic compounds[J]. *China Environmental Science*, 1997, 17(3): 199-202 (in Chinese).
- [4] WANG J, JIANG XB, LIU XD, SUN XY, HAN WQ, LI JS, WANG LJ, SHEN JY. Microbial degradation mechanism of pyridine by *Paracoccus* sp. NJUST30 newly isolated from aerobic granules[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2018, 344: 86-94.
- [5] 孙磊, 宋彤彤, 王佳硕, 刘存歧. 可降解吡啶的全食副球菌 B21-3 的筛选鉴定及降解特性[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(3): 461-467.
- SUN L, SONG TT, WANG JS, LIU CQ. Screening, identification and characterization of a pyridine degrading bacterium *Paracoccus pantotrophus* B21-3[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(3): 461-467 (in Chinese).
- [6] LIU YX, ZHANG Q, LV YK, REN RP. Pyridine degradation characteristics of a newly isolated bacterial strain and its application with a novel reactor for the further treatment in pyridine wastewater[J]. *Process Biochemistry*, 2020, 95: 64-70.
- [7] 黄莉婷, 韩响身, 金艳, 马强, 于建国. 煤化工反渗透浓水的高效降解菌株筛选、鉴定及应用研究[J]. *化工学报*, 2021, 72(9): 4881-4891.
- HUANG LT, HAN XS, JIN Y, MA Q, YU JG. Isolation, identification and application of highly efficient halotolerant strains for coal chemical reverse osmosis concentrate treatment[J]. *CIESC Journal*, 2021, 72(9): 4881-4891 (in Chinese).
- [8] AHMADI M, JORFI S, KUJLU R, GHAFARI S, DARVISHI CHESHMEH SOLTANI R, JAAFARZADEH HAGHIGHIFARD N. A novel salt-tolerant bacterial consortium for biodegradation of saline and recalcitrant petrochemical wastewater[J]. *Journal of Environmental Management*, 2017, 191: 198-208.
- [9] CHEN WW, KONG YC, LI JD, SUN YY, MIN J, HU XK. Enhanced biodegradation of crude oil by constructed bacterial consortium comprising salt-tolerant petroleum degraders and biosurfactant producers[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2020, 154: 105047.
- [10] 周旭华, 刘鹏程, 王伟, 丁静, 苏悦. 一株耐盐吡啶降解菌的分离及降解特性研究[J]. *环境污染与防治*, 2021, 43(10): 1269-1273.
- ZHOU XH, LIU PC, WANG W, DING J, SU Y. Isolation and degradation characteristics of a halotolerant pyridine degrading bacterial strain[J]. *Environmental Pollution & Control*, 2021, 43(10): 1269-1273 (in Chinese).
- [11] ZHU SN, LIU DQ, FAN L, NI JR. Degradation of quinoline by *Rhodococcus* sp. QL2 isolated from activated sludge[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 160(2/3): 289-294.
- [12] YOON JH, KANG SS, CHO YG, LEE ST, KHO YH, KIM CJ, PARK YH. *Rhodococcus pyridinivorans* sp. nov., a pyridine-degrading bacterium[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50(Pt 6): 2173-2180.
- [13] 张玉秀, 豆梦楠, 朱康兴, 柴团耀, 张怡鸣, 徐伟超. 喹啉降解菌 *Rhodococcus* sp. 的降解特性与生物强化作用[J]. *中国环境科学*, 2017, 37(6): 2340-2346.
- ZHANG YX, DOU MN, ZHU KX, CHAI TY, ZHANG YM, XU WC. Bioaugmentation and characteristics of a quinoline-degrading strain *Rhodococcus* sp.[J]. *China Environmental Science*, 2017, 37(6): 2340-2346 (in Chinese).
- [14] ASLAN S, ŞEKERDAĞ N. Salt inhibition on anaerobic treatment of high salinity wastewater by upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor[J]. *Desalination and Water Treatment*, 2016, 57(28): 12998-13004.
- [15] GUI MY, CHEN Q, NI JR. Effect of NaCl on aerobic denitrification by strain *Achromobacter* sp. GAD-3[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(12): 5139-5147.
- [16] SCHRÖFEL A, KRATOŠOVÁ G, BOHUNICKÁ M, DOBRŮČKA E, VÁVRA I. Biosynthesis of gold nanoparticles using diatoms—silica-gold and EPS-gold bionanocomposite formation[J]. *Journal of Nanoparticle Research*, 2011, 13(8): 3207-3216.
- [17] CLOETE TE, OOSTHUIZEN DJ. The role of extracellular exopolymers in the removal of phosphorus from activated sludge[J]. *Water Research*, 2001, 35(15): 3595-3598.

- [18] WANG ZC, GAO MC, SHE ZL, WANG S, JIN CJ, ZHAO YG, YANG SY, GUO L. Effects of salinity on performance, extracellular polymeric substances and microbial community of an aerobic granular sequencing batch reactor[J]. Separation and Purification Technology, 2015, 144: 223-231.
- [19] YUN H, LIANG B, KONG DY, CHENG HY, LI ZL, GU YB, YIN HQ, WANG AJ. Polarity inversion of bioanode for biocathodic reduction of aromatic pollutants[J]. Journal of Hazardous Materials, 2017, 331: 280-288.
- [20] JIANG XB, SHEN JY, XU KC, CHEN D, MU Y, SUN XY, HAN WQ, LI JS, WANG LJ. Substantial enhancement of anaerobic pyridine bio-mineralization by electrical stimulation[J]. Water Research, 2018, 130: 291-299.
- [21] WANG PY, CHEN H, WANG Y, LYU YK. Quinoline biodegradation characteristics of a new quinoline-degrading strain, *Pseudomonas citronellolis* PY1[J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2020, 95(8): 2171-2179.
- [22] NIE ZM, YAN BH, XU YH, AWASTHI MK, YANG HJ. Characterization of pyridine biodegradation by two *Enterobacter* sp. strains immobilized on *Solidago canadensis* L. stem derived biochar[J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 414: 125577.
- [23] REJINIEMON TS, ALODAINI HA RL, HATAMLEH AA, SATHYA R, KUPPUSAMY P, AL-DOSARY MA, KALAIYARASI M. Biodegradation of naphthalene by biocatalysts isolated from the contaminated environment under optimal conditions[J]. Chemosphere, 2022, 305: 135274.
- [24] TAYLOR SM, HE YL, ZHAO B, HUANG J. Heterotrophic ammonium removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying-denitrifying bacterium, *Providencia rettgeri* YL[J]. Journal of Environmental Sciences, 2009, 21(10): 1336-1341.
- [25] GUPTA N, O'LOUGHLIN EJ, SIMS GK. Microbial degradation of pyridine and pyridine derivatives[A]//Microorganisms for Sustainability[M]. Singapore: Springer Singapore, 2019: 1-31.
- [26] ZEFIROV NS, AGAPOVA SR, TERENTIEV PB, BULAKHOVA IM, VASYUKOVA NI, Modyanova LV. Degradation of pyridine by *Arthrobacter crystallopoietes* and *Rhodococcus opocus* strains[J]. FEMS Microbiology Letters, 1994, 118(1/2): 71-74.
- [27] HU CG, ZHAO SX, GUO LZ, YU H, CHEN X. Microbial degradation of pyridine by co-culture of two newly isolated strains, *Arthrobacter* sp. strain PDC-1 and *Rhodococcus* sp. strain HPD-2[J]. Research Square, 2020. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-64856/v1>.
- [28] LIU XT, ZHAO Q, REN J, DONG WY, WU QQ, ZHU DM. N-terminal truncation of a maleate *cis-trans* isomerase from *Rhodococcus jostii* RHA1 results in a highly active enzyme for the biocatalytic production of fumaric acid[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2013, 93: 44-50.
- [29] ZHANG YX, ZHANG YM, XIONG J, ZHAO ZH, CHAI TY. The enhancement of pyridine degradation by *Rhodococcus* KDPy1 in coking wastewater[J]. FEMS Microbiology Letters, 2019, 366(1): fny271.
- [30] VYRIDES I, STUCKEY DC. Adaptation of anaerobic biomass to saline conditions: role of compatible solutes and extracellular polysaccharides[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2009, 44(1): 46-51.
- [31] ZHOU GZ, WANG XT, ZHAO HY, ZHANG WQ, LIU GS, ZHANG XG. Isolation of two salt-tolerant strains from activated sludge and its COD degradation characteristics from saline organic wastewater[J]. Scientific Reports, 2020, 10: 18421.
- [32] 熊富忠, 赵小希, 温东辉, 李琪琳. 一株吡啶降解菌 *Pseudomonas* sp. ZX08 的生物膜形成特性及影响因素[J]. 微生物学通报, 2020, 47(5): 1342-1353.
- XIONG FZ, ZHAO XX, WEN DH, LI QL. Characteristics and influencing factors of biofilm formation by a pyridine-degrading bacterium *Pseudomonas* sp. ZX08[J]. Microbiology China, 2020, 47(5): 1342-1353 (in Chinese).
- [33] ČASAITĖ V, STANISLAUSKIENĖ R, VAITEKŪNAS J, TAURAITĖ D, RUTKIENĖ R, GASPARAVIČIŪTĖ R, MEŠKYS R. Microbial degradation of pyridine: a complete pathway in *Arthrobacter* sp. strain 68b deciphered[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2020, 86(15): e00902-e00920.
- [34] YU H, TANG HZ, ZHU XY, LI YY, XU P. Molecular mechanism of nicotine degradation by a newly isolated strain, *Ochrobactrum* sp. strain SJY1[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(1): 272-281.
- [35] BRANDSCH R. Microbiology and biochemistry of nicotine degradation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 69(5): 493-498.

(本文责编 郝丽芳)