

## 研究报告

## 一株金黄杆菌对 2-吡啶甲酸的好氧生物降解

王巧蕊 范宇睿 郑春莉\* 沈振兴 杜苗苗

(西安交通大学能源与动力工程学院环境科学与工程系 陕西 西安 710049)

**摘要:**【背景】2-吡啶甲酸具有高毒性、致癌性，能长期稳定存在于水体中，从而对环境造成危害。【目的】开发一种能够高效经济处理含 2-吡啶甲酸废水的技术。【方法】筛选一株在好氧条件下以 2-吡啶甲酸为唯一碳、氮、能源的菌株，考察该菌株的降解性能，建立降解动力学模型。【结果】经过 16S rRNA 基因序列分析，该菌株被鉴定为金黄杆菌(*Chryseobacterium* sp.)，命名为 ZD2。当 2-吡啶甲酸初始浓度为 100、200、400、600 和 800 mg/L 时，ZD2 完全降解 2-吡啶甲酸的时间分别为 10、18、22、78 和 114 h。零级动力学模型较好地描述了 2-吡啶甲酸的降解行为，当初始浓度为 100–400 mg/L 时，降解速率常数随着浓度的增加而增加，并于 400 mg/L 时达到最大；600–800 mg/L 时，降解速率常数开始下降，呈现抑制作用。【结论】菌株 ZD2 对 2-吡啶甲酸的降解效果较好，能够为处理实际的 2-吡啶甲酸工业废水提供理论依据。

**关键词:** 金黄杆菌，2-吡啶甲酸，好氧，降解动力学

Aerobic biodegradation of 2-picolinic acid by a *Chryseobacterium* sp.

WANG Qiao-Rui FAN Yu-Rui ZHENG Chun-Li\* SHEN Zhen-Xing DU Miao-Miao

(Department of Environmental Science and Engineering, School of Energy and Power Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710049, China)

**Abstract:** [Background] 2-Picolinic acid is highly toxic, carcinogenic, and long-term persisted in water bodies, thereby further endangers the environment. [Objective] To develop a technique that can efficiently and economically treat 2-picolinic acid-loaded wastewater. [Methods] We isolated a strain that could use 2-picolinic acid as the sole source of carbon, nitrogen and energy under aerobic conditions, and characterized its degradation. [Results] Based on the 16S rRNA gene sequence analysis, this strain was identified as a *Chryseobacterium* sp. and named as ZD2. When the initial concentration of 2-picolinic acid was 100, 200, 400, 600 and 800 mg/L, ZD2 completely degraded 2-picolinic acid within 10, 18, 22, 78 and 114 h, respectively. Zero-order kinetic model expressed the degradation behavior of 2-picolinic acid by ZD2 well. Between the concentration of 100 and 400 mg/L, the degradation rate constant increased with the increase in concentration and reached the maximum at 400 mg/L. Between the concentration of 600 and 800 mg/L, the degradation rate constant began to decrease, indicating an inhibitory effect. [Conclusion] The degradation efficiency of 2-picolinic acid

**Foundation item:** China Postdoctoral Science Foundation (2016M602830)

\*Corresponding author: E-mail: clzheng@mail.xjtu.edu.cn

**Received:** July 01, 2017; **Accepted:** September 07, 2017; **Published online** (www.cnki.net): September 26, 2017

基金项目: 中国博士后科学基金面上项目(2016M602830)

\*通信作者: E-mail: clzheng@mail.xjtu.edu.cn

收稿日期: 2017-07-01; 接受日期: 2017-09-07; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-09-26

by ZD2 demonstrates its potential in decontaminating wastewater containing 2-picolinic acid.

**Keywords:** *Chryseobacterium* sp., 2-Picolinic acid, Aerobic, Biodegradation kinetics

吡啶及其衍生物属于氮杂环化合物, 吡啶类废水主要来自矿业、煤和页岩油加工行业、木材防腐处理行业、医药和食品行业, 以及染料制备和农业生产等<sup>[1-2]</sup>。由于其高毒性和致癌性, 吡啶类化合物已被美国国家环保局列为环境优先控制污染物<sup>[2]</sup>。

2-吡啶甲酸是一种重要的吡啶类化合物, 广泛用于医药、农药、日用化学品以及畜牧业食品添加剂的生产<sup>[3-5]</sup>。由于极高的亲水性(溶解度=887 g/L, 20 °C), 2-吡啶甲酸可长期、稳定地存在于水体中从而对环境造成危害。迄今, 已有报道显示好氧生物法可有效去除水中吡啶甲酸<sup>[6]</sup>, 降解菌主要包括杆杆菌属(*Arthrobacter*)<sup>[7]</sup>、芽孢杆菌属(*Bacillus*)<sup>[8]</sup>和链霉菌属(*Streptomyces*)<sup>[9]</sup>。2-吡啶甲酸在单加氧酶的催化下, 位于N原子旁的 $\alpha$ 碳原子上引入一个羟基, 生成 6-羟基-2-吡啶甲酸; 然后在双加氧酶的催化下, 6-羟基-2-吡啶甲酸发生开环反应, 同时脱去 N 原子生成酮戊二酸; 最终, 酮戊二酸矿化为无害的二氧化碳和水<sup>[2]</sup>。现有文献尚没有定量描述 2-吡啶甲酸的好氧生物降解特性, 此外, 2-吡啶甲酸是否可以被其它菌属的微生物利用也是未知的<sup>[11-21]</sup>。

基于以上的研究背景, 本文分离筛选了一株在好氧条件下以 2-吡啶甲酸为唯一碳、氮、能源的新的菌株, 通过细胞形态和核酸序列同源性分析对其进行了分类鉴定, 并且考察了该菌株对 2-吡啶甲酸的降解动力学, 以了解其对 2-吡啶甲酸的降解特性。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

2-吡啶甲酸(质量分数 97%)和甲酸(质量分数 95%)均为色谱纯, 美国 Sigma-Aldrich 公司; 甲醇(质量分数 99.90%)为色谱纯, 美国 Fisher Chemical 公司; 其它试剂均为国产分析纯。超纯水的电阻

率= 18 M $\Omega$ /cm。

液相色谱仪、色谱柱, 德国 Sykam 公司; 扫描电镜, 日本 Hitachi 公司; 透射电镜, 日本 JEOL 公司; PCR 仪、DNA 测序仪, 美国 Applied Biosystems 公司; 紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司。

### 1.2 菌株分离鉴定与形态观察

以某污水处理厂曝气池中的活性污泥为菌源, 在含 100 mg/L 的 2-吡啶甲酸无机盐培养液中<sup>[10]</sup>, 30 °C、150 r/min 下富集筛选, 得到以 2-吡啶甲酸为唯一碳、氮、能源的菌液, 然后在固体培养基上纯化, 分离出 3 株 2-吡啶甲酸降解菌, 分别命名为 ZD1、ZD2 和 ZD3, 选取 ZD2 做进一步研究。无机盐培养液配制方法见文献[10]。固体培养基(g/L): 琼脂 15.00, 无机盐培养液 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 7.00, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.01, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.02, 2-吡啶甲酸 0.10。

菌株 ZD2 的 16S rRNA 基因测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成, 登录 GenBank 通过 BLAST 数据库进行同源性比对, MEGA 6 软件使用邻接法(Neighbo-Joining)构建系统发育树。

菌株 ZD2 接种至含 100 mg/L 的 2-吡啶甲酸无机盐培养液中, 30 °C、150 r/min 培养 12 h, 菌液 4 °C、2 000 r/min 离心 10 min, 去除上清液收集细胞。使用扫描电镜和透射电镜对其进行形态观察, 细胞样品的预处理见文献[10]。

### 1.3 2-吡啶甲酸降解

菌株 ZD2 分别接种至含 100–800 mg/L 的 2-吡啶甲酸无机盐培养液中(pH 7.0)。30 °C、150 r/min 下培养, 于不同时间取菌液, 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 0.22  $\mu$ m 膜过滤 3 次获得样品, 测量 2-吡啶甲酸浓度(液相色谱法)。每个样品均重复 3 次, 取平均值。对照实验: ZD2 灭活

( $1 \times 10^5$  Pa, 20 min), 接种至以 2-吡啶甲酸为唯一碳、氮、能源的无机盐培养液中, 其余操作条件同上。

## 1.4 液相色谱

色谱柱: Reprospher 100 C18 ( $5 \mu\text{m}$ ,  $150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$ ); 流动相为含 0.2% 甲酸的水-甲醇体系 (90:10); 流速  $1 \text{ mL/min}$ , 检测波长  $265 \text{ nm}$ ; 进样体积  $20 \mu\text{L}$ ; 柱温  $30^\circ\text{C}$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌株分离鉴定与形态观察

菌株 ZD2 在固体培养基上的形态特征: 黄色、不透明, 形状规则, 大小均匀, 表面光滑, 边缘整齐(图 1)。

图 2 为 ZD2 的扫描电镜照片, 放大倍数 10 000 倍: 细胞呈短杆状, 长度在  $0.8 \mu\text{m}$ – $4.0 \mu\text{m}$  之间。图 3 A 和 B 为 ZD2 的透射电镜照片, 放大倍数分别为 20 000 倍和 50 000 倍。在图 3 中, ZD2 的细胞内都呈现出白色 I 和黑色圆点 II, 可能分别为内含物和核糖体; III 可能为在培养过程中菌株 ZD2 发生了溶胞。分析其原因: 在以吡啶甲酸为唯一碳、氮、能源的无机盐培养液中, 当底物吡啶甲酸和代谢过程中的中间产物被 ZD2 完全矿化后, 微生物进入内源呼吸阶段, 此时细胞不能正常生长和分裂, 从而导致细胞壁破裂(溶胞)。

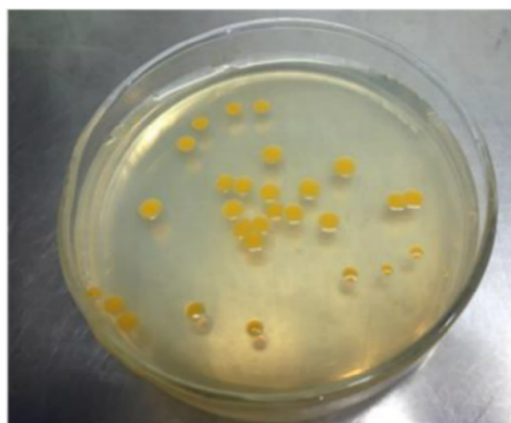


图 1 ZD2 的菌落形态特征

Figure 1 The colony morphological characteristics of ZD2

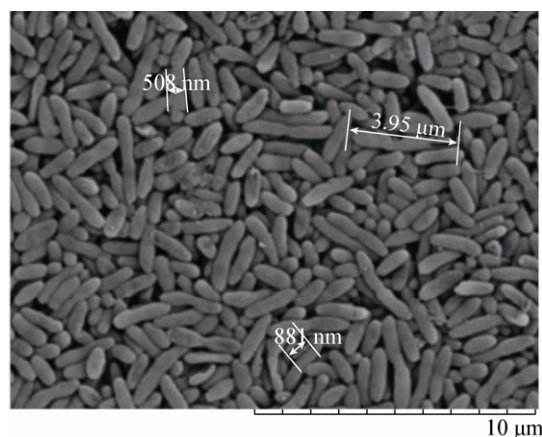


图 2 ZD2 扫描电镜照片

Figure 2 Scanning electron micrograph (SEM) for ZD2

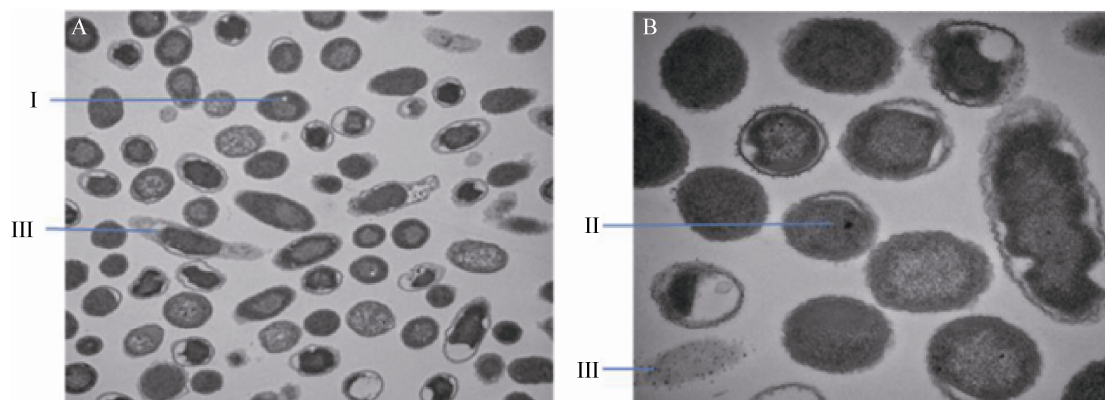


图 3 ZD2 的透射电镜照片

Figure 3 Transmission electron microscope (TEM) for ZD2

注: A:  $20\,000\times$ 获得的细胞形态; B:  $50\,000\times$ 获得的细胞形态。

Note: A: The obtained cell morphology at  $20\,000\times$ ; B: The obtained cell morphology at  $50\,000\times$ .

由系统发育树(图 4)可知, 菌株 ZD2 (GenBank 登录号为 KP900020)与 *Chryseobacterium* sp. P9 的相似性高达 100%, 因此将菌株 ZD2 鉴定为金黄杆菌(*Chryseobacterium* sp.)。金黄杆菌是由一群广泛存在于自然界的革兰氏阴性非发酵菌组成<sup>[11]</sup>, 包括脑膜脓毒金黄杆菌、产吡啶金黄杆菌、黏金黄杆菌等, 属于条件致病菌, 可引起脑膜炎、菌血症、心内膜炎、皮肤软组织感染等多种疾病<sup>[12]</sup>。近年来, 研究者们发现金黄杆菌可用来处理含多环芳烃<sup>[13]</sup>、苯胺、苯酚、硝基苯、苯甲酸及甲苯<sup>[14]</sup>、菠萝纤维素<sup>[15]</sup>、乙酰甲胺磷等<sup>[16]</sup>污染废水。然而, 关于金黄杆菌对 2-吡啶甲酸的降解目前尚没有报道。

## 2.2 2-吡啶甲酸降解

图 5 显示了在以 2-吡啶甲酸为唯一碳、氮和能源的无机盐培养液中, 2-吡啶甲酸初始浓度为 100 mg/L, 最佳降解条件下(30 °C, pH 7.0, 0 盐度)菌株 ZD2 的生长曲线。以浓度表示 2-吡啶甲酸的降解。如图 5 所示, 菌株 ZD2 的延滞期为 0–5 h, 此阶段细胞数量增加较少; 5–9.5 h 为对数生长期, ZD2 的繁殖速度最快, 2-吡啶甲酸的基本降解发生在对数期。

## 2.3 2-吡啶甲酸好氧降解动力学

分别配制 2-吡啶甲酸浓度为 100、200、400、600 和 800 mg/L 的无机盐培养液, 在最佳降解条件下考察菌株 ZD2 对 2-吡啶甲酸的降解。由图 6 可以看出, 当 2-吡啶甲酸浓度为 100、200、400、600 和 800 mg/L 时, 分别经过 5、9、11、15 和 48 h 后菌株 ZD2 开始快速降解 2-吡啶甲酸, 完全矿化所需时间分别为 10、18、24、45 和 72 h。因此可以得出, 随着 2-吡啶甲酸初始浓度的增加, 菌株 ZD2 完全降解 2-吡啶甲酸所需要的时间越久, 并且菌株 ZD2 适应期也随之延长。

对于 2-吡啶甲酸的好氧降解动力学模型而言, 公式(1)和(2)分别表示零级和一级动力学模型<sup>[17]</sup>:

$$\ln c = a + k_0 t \quad (1)$$

$$c = b + k_1 t \quad (2)$$

式中:  $a$ 、 $b$  为常数;  $t$  为降解时间;  $c$  为底物浓度;  $k_0$ 、 $k_1$  分别为零级、一级降解速率常数。

基于图 6 中每一条降解曲线的线性范围数据, 分别使用零级和一级动力学模型进行拟合(图 7), 发现零级动力学模型的相关系数  $R^2$  明显高于一级动力学模型(表 1 和表 2)。

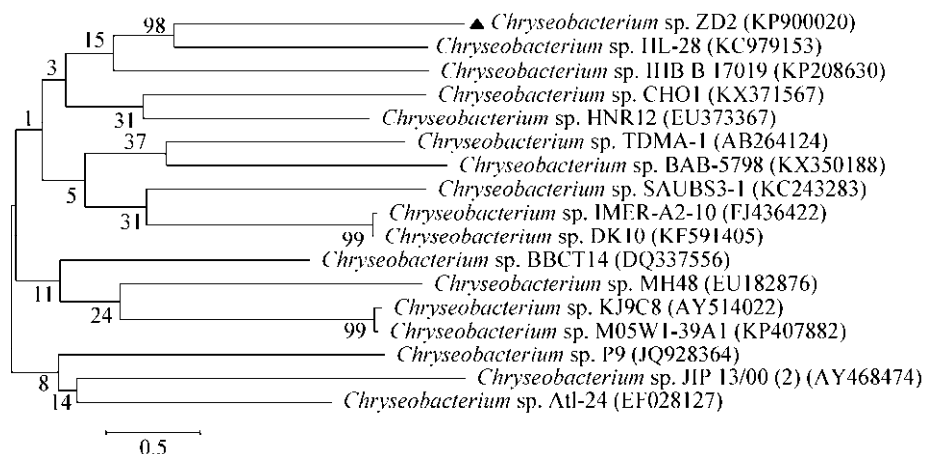


图 4 ZD2 的系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree of ZD2

注: 圆括号表示序列号; 每一结点表示分类学单元; 分支长度表示该分支进化过程中的变化程度; 距离标尺表示序列之间差异的数字。  
Note: GenBank accession numbers were given in parentheses; Each node represents the taxonomic unit; The branch length shows the extent of variation in the branch evolution; Distance figures indicate the difference between sequences.

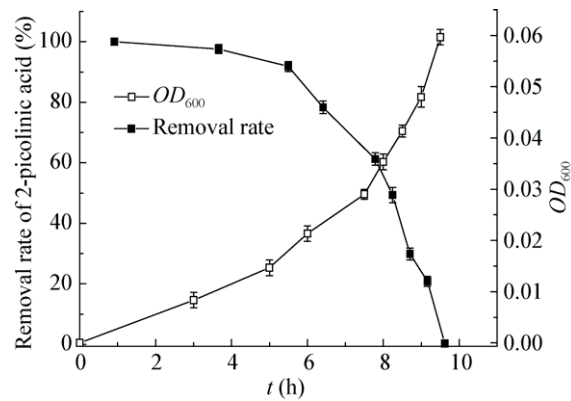


图 5 菌株 ZD2 生长曲线和吡啶甲酸降解  
Figure 5 The growth curve of the strain and degradation for 2-picolinic acid

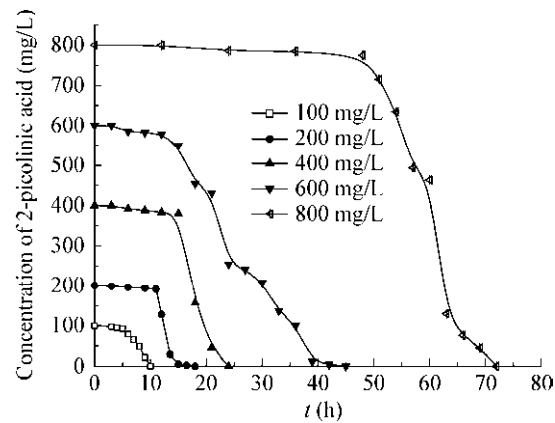


图 6 菌株 ZD2 对不同浓度吡啶甲酸的降解  
Figure 6 The degradation of ZD2 for different concentrations of 2-picolinic acid

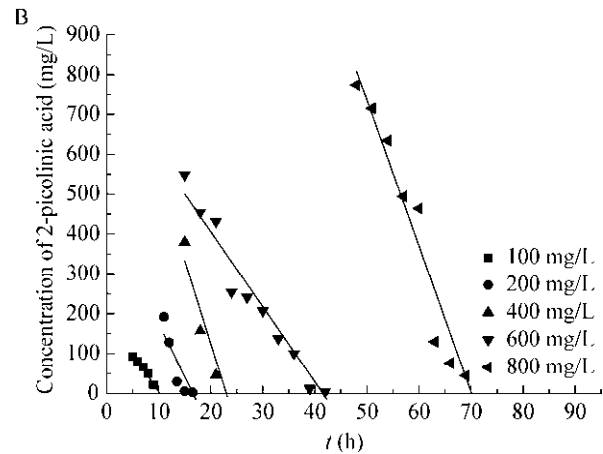
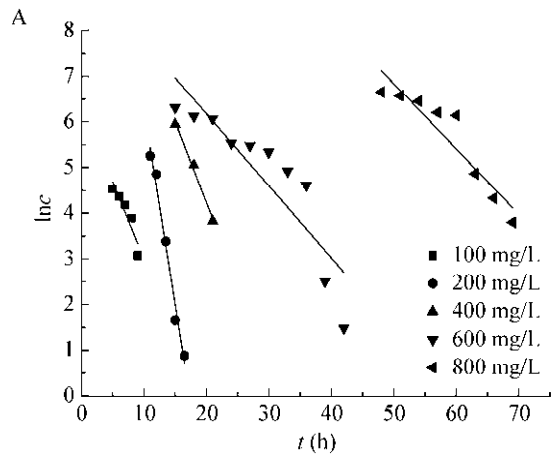


图 7 2-吡啶甲酸降解动力学模型  
Figure 7 Degradation dynamics models of 2-picolinic acid  
注：A：零级动力学模型；B：一级动力学模型。  
Note: A: Zero-order kinetic model; B: First-order kinetic model.

表 1 零级降解动力学模型参数  
Table 1 Parameters of zero-grade degradation kinetic model

浓度 Concentration (mg/L)	零级动力学方程 The zero-order kinetic equation	$k_0$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$R^2$
100	$c = -17.17t + 181.73$	17.17	0.964 1
200	$c = -35.12t + 549.01$	35.12	0.800 7
400	$c = -55.63t + 1\ 195.38$	55.63	0.927 7
600	$c = -20.28t + 816.80$	20.28	0.958 7
800	$c = -39.09t + 2\ 703.30$	39.09	0.958 7

表 2 一级降解动力学模型参数  
Table 2 Parameters of first-grade degradation kinetic model

浓度 Concentration (mg/L)	一级动力学方程 The first-order kinetic equation	$k_1$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$R^2$
100	$c = -0.339t + 6.379$	0.339	0.825 2
200	$c = -0.857t + 14.865$	0.857	0.976 2
400	$c = -0.353t + 11.286$	0.353	0.982 3
600	$c = -0.158t + 9.328$	0.158	0.769 0
800	$c = -0.143t + 13.995$	0.143	0.854 0

当 2-吡啶甲酸初始浓度范围为 100–400 mg/L 时,降解速率常数随着初始浓度的升高而增大,分析其原因可能是该浓度范围下的 2-吡啶甲酸不能为菌株 ZD2 提供足够的碳源、氮源和能源,基质浓度相对于菌株生长处于非饱和状态,因此 2-吡啶甲酸初始浓度越高其降解速率越快,这与文献[17]的结果一致。当 2-吡啶甲酸浓度增加到 600–800 mg/L 时,降解曲线仍然符合零级反应,但与初始浓度为 400 mg/L 时吡啶甲酸相比,其降解速率常数下降,底物抑制效应出现<sup>[17]</sup>。

### 3 结论

(1) 分离筛选了一株好氧条件下以 2-吡啶甲酸为唯一碳、氮、能源的菌株,16S rRNA 基因序列分析鉴定该菌株为金黄杆菌(*Chryseobacterium* sp.),命名 ZD2。

(2) 考查了不同初始浓度下该菌株对 2-吡啶甲酸的降解性能,实验结果表明:随着 2-吡啶甲酸初始浓度的增加菌株完全降解的时间也随之延长。

(3) 建立了 2-吡啶甲酸的降解动力学模型,与一级动力学模型相比,零级动力学模型更好地拟合了初始浓度范围为 100–800 mg/L 的 2-吡啶甲酸降解曲线。

### REFERENCES

- [1] Kaiser JP, Feng YC, Bollag JM. Microbial metabolism of pyridine, quinoline, acridine, and their derivatives under aerobic and anaerobic conditions[J]. Microbiological Reviews, 1996, 60(3): 483-498
- [2] Yao YX, Tang HZ, Ren HX, et al. Iron(II)-dependent dioxygenase and N-formylamide deformylase catalyze the reactions from 5-hydroxy-2-pyridone to maleamate[J]. Scientific Reports, 2013, 3: 3235
- [3] Li D, Li CC, Zhong GQ, et al. Synthesis and characterization of Cobalt (II) and Nickel (II) complexes of 2-picolinic acid by room temperature solid-solid reaction[J]. Fine Chemicals, 2013, 30(3): 320-323 (in Chinese)  
李迪, 李春春, 钟国清, 等. 室温固相法合成 2-吡啶甲酸钴、镍配合物[J]. 精细化工, 2013, 30(3): 320-323
- [4] Wen FP, Zhang XS, Xu JL, et al. Synthesis and application of nicotinic acid[J]. Applied Chemical Industry, 2010, 39(10): 1152-1156 (in Chinese)  
温飞鹏, 张贤士, 徐金龙, 等. 吡啶甲酸的合成及其用途[J]. 应用化工, 2010, 39(10): 1152-1156
- [5] Lei TT, Chen YC. Synthesis, crystal structure and its property of complex of Cobalt (II) with 3-tetrazole pyridine[J]. Journal of Anqing Teachers College (Natural Science Edition), 2012, 18(2): 87-89 (in Chinese)  
雷婷婷, 陈友存. 3-吡啶甲酸钴(II)配合物晶体的合成、结构与性质[J]. 安庆师范学院学报: 自然科学版, 2012, 18(2): 87-89
- [6] Zheng CL, Zhou JT, Wang J, et al. Degradation of picolinic acid by a mixture of nitrobenzene-assimilating strains under aerobic condition[J]. Fine Chemicals, 2006, 23(12): 1198-1120 (in Chinese)  
郑春莉, 周集体, 王竞, 等. 硝基苯高效降解菌群对吡啶甲酸的好氧降解[J]. 精细化工, 2006, 23(12): 1198-1120
- [7] Khasaeva F, Vasilyuk N, Terentyev P, et al. A novel soil bacterial strain degrading pyridines[J]. Environmental Chemistry Letters, 2011, 9(3): 439-445
- [8] Wu B, Lin WH, Gao HY, et al. Antibacterial constituents of *Senecio cannabifolius* (II)[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2005, 36(10): 1447-1450 (in Chinese)  
吴斌, 林文辉, 高慧媛, 等. 麻叶千里光抗菌化学成分的研究(II)[J]. 中草药, 2005, 36(10): 1447-1450
- [9] Zheng CL, Zhou JT, Wang J, et al. Aerobic degradation of 2-picolinic acid by a nitrobenzene-assimilating strain: *Streptomyces* sp. Z2[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(6): 2082-2084
- [10] Zheng CL, Zhou JT, Zhao LH, et al. Isolation and characterization of a nitrobenzene degrading *Streptomyces* strain from activated sludge[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2007, 78(2): 163-167
- [11] Deng ZB. Drug tolerance analysis of flavobacterium-induced nosocomial infections[J]. Laboratory Medicine, 2011, 26(11): 791-792 (in Chinese)  
邓正泊. 金黄杆菌属医院感染及耐药性分析[J]. 检验医学, 2011, 26(11): 791-792
- [12] Lin XH, Xu YH, Chen XL, et al. Analysis of beta-lactamase production and antibiotic resistance in clinically isolated *Chryseobacterium* spp.[J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2007, 25(5): 361-363 (in Chinese)  
林祥宏, 徐元宏, 陈晓莉, 等. 金黄杆菌临床分离株  $\beta$ -内酰胺酶及耐药性分析[J]. 临床检验杂志, 2007, 25(5): 361-363
- [13] Xu XY, Su P, Ji Y, et al. Identification and degradation characteristics of two bacterial strains degrading phenanthrene and fluoranthene from surface sediments[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2015, 9(3): 1513-1520 (in Chinese)  
许晓毅, 苏攀, 姬宇, 等. 沉积物中 2 株多环芳烃降解菌的分离鉴定及其对菲、荧蒹的降解特性[J]. 环境工程学报, 2015, 9(3): 1513-1520
- [14] Zhang YF, Gu T, Wang GX, et al. Isolation and characterization of aniline-degrading bacterial strain AN4[J]. Environmental Pollution & Control, 2008, 30(2): 12-15, 36 (in Chinese)  
张逸飞, 顾挺, 王国祥, 等. 一株苯胺降解菌的分离鉴定及其降解特性[J]. 环境污染与防治, 2008, 30(2): 12-15, 36
- [15] Luo P, Chen YH, He JJ, et al. Screening and identification of cellulose degrading-bacteria from fermented pineapple residue[J]. Journal of Microbiology, 2011, 31(2): 59-63 (in Chinese)  
罗萍, 陈永辉, 贺军军, 等. 菠萝渣纤维素降解菌的筛选及鉴定[J]. 微生物学杂志, 2011, 31(2): 59-63
- [16] Xie KZ, Xu PZ, Chen JS, et al. Isolation and identification acephate-degrading bacteria XP-3 and studies on its physiological characterization[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2008(8): 79-82 (in Chinese)  
解开治, 徐培智, 陈建生, 等. 乙酰甲胺磷降解菌株 XP-3 的分离鉴定及其生理特性研究[J]. 广东农业科学, 2008(8): 79-82
- [17] Dong N, Wang Q, Lei DD, et al. Thermal degradation and kinetics of pigment from raddish red[J]. Food Science, 2013, 34(5): 67-71 (in Chinese)  
董楠, 王强, 雷丹丹, 等. 胭脂萝卜红色素热处理及贮藏过程中降解动力学[J]. 食品科学, 2013, 34(5): 67-71