



# 降解吡啶复合菌系 MD1 的筛选、降解特性及代谢途径

牛鸿宇<sup>1</sup>, 郭佳源<sup>1</sup>, 陈勃智<sup>2</sup>, 陈丹丹<sup>1</sup>, 龙宇<sup>1</sup>, 杨海君<sup>1</sup>, 彭锐<sup>3\*</sup>

1 湖南农业大学环境与生态学院, 湖南 长沙 410128

2 长沙市生态环境局, 湖南 长沙 410131

3 湖南省长沙生态环境监测中心, 湖南 长沙 410001

牛鸿宇, 郭佳源, 陈勃智, 陈丹丹, 龙宇, 杨海君, 彭锐. 降解吡啶复合菌系 MD1 的筛选、降解特性及代谢途径[J]. 微生物学报, 2023, 63(11): 4330-4343.

NIU Hongyu, GUO Jiayuan, CHEN Bozhi, CHEN Dandan, LONG Yu, YANG Haijun, PENG Rui. Screening, degradation characteristics, and metabolic pathway of an efficient pyridine-degrading bacterial consortium MD1[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(11): 4330-4343.

**摘要:**【目的】为筛选吡啶高效降解复合菌系, 促进高浓度吡啶废水的降解。本研究围绕吡啶降解复合菌系的筛选、降解特性及代谢途径, 旨在获得吡啶高效降解复合菌系, 为高浓度吡啶废水微生物降解及完全矿化提供理论依据和技术支撑。【方法】以吡啶为唯一碳氮源从某农药废水处理系统好氧活性污泥中筛选得到一个吡啶高效降解复合菌系 MD1。采用 16S rRNA 高通量测序技术探究了 MD1 的群落结构及多样性, 通过单因素实验考察了 MD1 的降解特性, 利用气相色谱-质谱联用仪对 MD1 降解吡啶的代谢产物进行了初步检测与鉴定, 推测吡啶可能的降解途径。【结果】结果显示, 在温度 30 °C、pH 8.0、NaCl 浓度 0.1% 的最佳条件下培养 72 h, MD1 对初始浓度 1 400 mg/L 的吡啶降解率为 98.44%±0.27%。在属水平上, MD1 主要由副球菌属 (*Paracoccus* sp.)、布鲁氏菌属 (*unclassified\_Brucellaceae*)、无色杆菌属 (*Achromobacter* sp.) 等组成。由代谢产物检测结果初步推测 MD1 对吡啶的代谢途径为吡啶→烟酸→6-羟基烟酸→2,5-二羟基吡啶→N-甲酰基马来酰胺酸→马来酰胺酸→马来酸→CO<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>O。【结论】研究筛选得到一个可高效降解吡啶、降解性能稳定的复合菌系 MD1。解析了 MD1 的微生物组成多样性和群落结构, 推测

资助项目: 湖南省自然科学基金(2022JJ50035, 2022JJ50264); 湖南省教育厅项目(21B0711); 长沙市自然科学基金(kq2208137)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Hunan Province (2022JJ50035, 2022JJ50264), the Research Foundation of Education Bureau of Hunan Province (21B0711), and the Natural Science Foundation of Changsha (kq2208137).

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-731-84673815, E-mail: pr@hunau.edu.cn

Received: 2023-03-30; Accepted: 2023-08-04; Published online: 2023-08-29

了 MD1 可能的代谢途径, 研究结果丰富了吡啶降解微生物资源。

关键词: 吡啶; 复合菌系; 生物降解; 代谢途径

## Screening, degradation characteristics, and metabolic pathway of an efficient pyridine-degrading bacterial consortium MD1

NIU Hongyu<sup>1</sup>, GUO Jiayuan<sup>1</sup>, CHEN Bozhi<sup>2</sup>, CHEN Dandan<sup>1</sup>, LONG Yu<sup>1</sup>, YANG Haijun<sup>1</sup>, PENG Rui<sup>3\*</sup>

1 College of Environment and Ecology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan, China

2 Changsha Ecological Environment Bureau, Changsha 410131, Hunan, China

3 Changsha Ecological Environment Monitoring Center of Hunan Province, Changsha 410001, Hunan, China

**Abstract:** [Objective] To screen out the bacterial consortium capable of efficiently degrading pyridine and promote the degradation of high-concentration pyridine in wastewater. We screened out a pyridine-degrading bacterial consortium and studied the degradation characteristics and metabolic pathways of the consortium, aiming to provide a theoretical basis and technical support for the microbial degradation and complete mineralization of high-concentration pyridine in wastewater. [Methods] We used pyridine as the only nitrogen source to screen out an efficient pyridine-degrading bacterial consortium MD1 from the aerobic activated sludge and water samples of a pesticide wastewater treatment system. The 16S rRNA high-throughput sequencing was performed to reveal the bacterial species, diversity, and structure of MD1. Single-factor experiments were conducted to study the degradation characteristics of MD1. The metabolites of pyridine degradation by MD1 were initially identified by gas chromatography-mass spectrometry, and the possible degradation pathways of pyridine were deduced. [Results] The degradation rate of MD1 incubated at the optimal conditions of 30 °C, pH 8.0, and 0.1% NaCl for 72 h reached 98.44%±0.27% when the initial concentration of pyridine was 1 400 mg/L. MD1 was mainly composed of *Paracoccus*, unclassified *Brucellaceae*, and *Achromobacter* at the genus level. The results of metabolite detection suggested that the possible metabolic pathway of MD1 was pyridine→nicotinic acid→6-hydroxynicotinic acid→2,5-dihydroxypyridine→N-formylmaleamic acid→maleamic acid→maleic acid→CO<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>O. [Conclusion] This study screened out a bacterial consortium MD1 with stable performance in degrading pyridine. The diversity, structure, and pyridine metabolic pathway of MD1 were analyzed, which enriched the resources of pyridine-degrading microorganisms.

**Keywords:** pyridine; bacterial consortium; biodegradation; metabolism pathway

吡啶( $C_5H_5N$ )是含有一个氮杂原子的六元杂环化合物<sup>[1]</sup>,因其独特的物理化学性质,被广泛应用于化工、医药、石油等行业<sup>[2]</sup>。然而,吡啶具有致癌性、致畸性和致突变性,并被世界卫生组织国际癌症研究机构(2017)列入2B类致癌物清单<sup>[3-4]</sup>。大量摄入吡啶会导致肠胃紊乱,对肝脏和肾脏造成危害,吡啶对人类的最低致死剂量为500 mg/kg<sup>[5]</sup>。未经处理或处理不彻底的吡啶废水进入城市管网或外排将影响城市污水的处理效果并危害水生态系统的稳定。

常见的吡啶废水的处理方法包括吸附法<sup>[6]</sup>、光催化氧化<sup>[7]</sup>、芬顿(Fenton)氧化<sup>[8]</sup>、焚烧法<sup>[9]</sup>以及生物降解法<sup>[10-13]</sup>等。其中生物法去除吡啶因其能耗低、操作简单、效率高、条件温和等优点而备受关注<sup>[5]</sup>。微生物对吡啶的生物处理集中在降解菌的分离鉴定<sup>[3,10-13]</sup>。目前报道的吡啶高效降解菌主要包括:肠杆菌属(*Enterobacter* sp.)<sup>[3]</sup>、节杆菌属(*Arthrobacter* sp.)<sup>[10]</sup>、中间硫杆菌(*Thiobacillus intermedium*)<sup>[14]</sup>、粪产碱菌(*Alcaligenes faecalis*)<sup>[15]</sup>、副球菌属(*Paracoccus* sp.)<sup>[16]</sup>、无色杆菌属(*Achromobacter* sp.)<sup>[17]</sup>、海藻希瓦氏菌(*Shewanella algae*)<sup>[18]</sup>、动胶菌样申氏菌(*Shinella zoogloeoides*)<sup>[19]</sup>、谷粒申氏杆菌(*Shinella granul*)<sup>[19]</sup>、芽殖杆菌属(*Gemmobacter* sp.)<sup>[20]</sup>。例如: Nie 等<sup>[4]</sup>筛选出的肠杆菌属(*Enterobacter* sp.) BD19 菌可以在36 h内将200 mg/L的吡啶降解76.19%。王基成等<sup>[14]</sup>筛选获得的中间硫杆菌(*Thiobacillus intermedium*) 4-11 菌在60 h对初始浓度1 000 mg/L的吡啶降解率达到65.50%。Liu 等<sup>[20]</sup>筛选到的芽殖杆菌属(*Gemmobacter* sp.) ZP-12 菌可以在96 h内完全去除500 mg/L的吡啶。然而,上述大部分降解菌对吡啶降解的初始浓度偏低,降解性能有待提高。探寻对高浓度吡啶高效稳定降解的微生物成为实现高浓度吡啶废水的有效途径。复合菌系具有微生物组

成丰富、降解能力强等优势,广泛应用于多环芳烃<sup>[21]</sup>等有机污染物的降解,但复合菌系降解吡啶的相关报道较少。

目前为止,吡啶的生物降解机理研究主要集中在好氧降解<sup>[15-24]</sup>。Wang 等<sup>[16]</sup>在 *Paracoccus* sp. NJUST30 降解吡啶的过程中观察到2,4-二羟基-2H-吡啶-3-酮、2-羧基-琥珀酸、1,2-二氢-吡啶-2-醇、哌啶-2-醇和4-甲酰氨基丁酸等代谢产物,推测吡啶在降解过程中发生了羟基化、羧基化和羧基化等反应。Li 等<sup>[13]</sup>报道了链霉菌属(*Streptomyces* sp.) HJ02 可使吡啶环上C-2键断裂,进而水解生成甲酰胺和琥珀酸半醛。Watson 等<sup>[22]</sup>揭示了诺卡氏菌属(*Nocardia* sp.)对吡啶的代谢过程首先为N-C2键断裂,生成1,4-二氢吡啶,后进一步氧化生成5-亚胺-戊醛,并最终水解生成戊二酸。此外,同一菌种可能同时兼备多种吡啶代谢途径。例如 *Achromobacter* sp. DN-06 菌具备独特的双代谢吡啶降解途径,可打开吡啶环上N-C2键与C2-C3键<sup>[17]</sup>。目前,关于复合菌系生物降解吡啶的代谢途径报道较少,这将极大地限制该技术的应用。

为了获得可高效去除吡啶的微生物资源,本研究从某农药废水处理系统的好氧活性污泥中分离出以吡啶为唯一碳氮源生长的复合菌系MD1,并对其菌种组成多样性进行了分析。探讨了环境因素对MD1降解吡啶的影响,通过对中间产物的鉴定推测了吡啶可能的代谢途径。研究结果丰富了吡啶降解微生物的菌种资源,以期为解决微生物对高浓度吡啶耐受性差和降解效能低等问题提供理论依据和技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 培养基

Luria-Bertani 培养基(LB) (g/L): 蛋白胨 10.00, 酵母膏 5.00, NaCl 10.00, 用于细菌的富

集和培养。以不含碳氮源的无机盐液体培养基 (minimal salt liquid medium, MSM) (g/L):  $K_2HPO_4$  1.50,  $KH_2PO_4$  0.50, NaCl 1.00,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.20,  $Fe_2(SO_4)_3 \cdot H_2O$  0.01, 进行吡啶降解实验。根据实验所需浓度加入购自国家标准物质中心的吡啶 (中国, 纯度 >96%) 作为唯一的碳氮源。利用  $Na_2HPO_4$  (1/15 mol/L) 和  $KH_2PO_4$  (1/15 mol/L) 将上述培养基的初始 pH 值调至 7.0, 121.0 °C 高压灭菌 30 min 后备用。

### 1.2 吡啶降解复合菌系的筛选与驯化

取经过灭菌后的吡啶初始浓度为 100 mg/L 的无机盐液体培养基 46 mL 置于 100 mL 锥形瓶中, 同时加入 4 mL 取自某农药废水处理系统的好氧活性污泥。以吡啶为无机盐培养基中唯一的碳源和氮源, 在 30 °C、180 r/min 和 pH 7.0 条件下培养 72 h 并测定锥形瓶中吡啶的去除量, 当吡啶去除率高于 90% 时, 逐级提高吡啶浓度直至筛选得到最高耐受浓度的复合菌系。将菌液以 2% (体积分数) 的接种量接入无机盐液体培养基, 在最高吡啶耐受浓度下, 每隔 72 h 传代一次, 连续传代 10 次以上, 获得吡啶降解率稳定的复合菌系。将复合菌系在 -80 °C 冰箱内保存。实验设置 3 次重复, 以不接种复合菌系的吡啶无机盐培养基作为空白对照。

### 1.3 吡啶降解复合菌系细菌多样性及组成分析

对传代 10 次后降解率稳定的吡啶降解复合菌系进行 16S rRNA 基因高通量测序, 并明确细菌的多样性及组成。使用 QIAamp Fast DNA Stool Mini DNA 试剂盒 (MAGEN) 提取总 DNA, 利用通用引物 343F (5'-TAGGGRAGGAGCAG-3') 和 798R (5'-AGGGTATCTAATCCT-3') 扩增复合菌系 16S rRNA 基因的 V3-V4 高变区<sup>[23]</sup>, 并对其产物进行纯化和定量。PCR 产物通过生工生物工程 (上海) 股份有限公司 Illumina MiSeq 平台测

序<sup>[24]</sup>, 使用 Origin 2018 软件对结果进行绘图。

### 1.4 复合菌系对吡啶的降解性能

考察了复合菌系的生长特性。将复合菌系按照 2% (体积分数) 的接种量转接至吡啶初始浓度 1 400 mg/L 的无机盐液体培养基, 在 30 °C、180 r/min 条件下振荡培养。每隔 12 h 通过光密度 ( $OD_{600}$ ) 检测复合菌系的生物量, 并测定不同培养时间对吡啶的降解率, 以未接种复合菌系的吡啶无机盐液体培养基为空白对照。

通过单因素实验, 在 100 mL 锥形瓶中配制 1 400 mg/L 的吡啶无机盐液体培养基, 培养基装液量 50% (体积分数), 接菌量 2% (体积分数), 摇床转速 180 r/min 条件下培养 72 h, 考察复合菌系在不同培养时间 (12、24、36、48、60、72、84 h)、温度 (15、20、25、30、35、40 °C)、pH (6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0) 和 NaCl 浓度 (0.05%、0.10%、0.15%、0.20%、0.50%、1%、2%) 条件下对吡啶的降解, 测定锥形瓶中吡啶含量, 确定复合菌系对吡啶降解的最适培养条件。通过在吡啶无机盐液体培养基中加入  $Na_2HPO_4$  (1/15 mol/L) 和  $KH_2PO_4$  (1/15 mol/L) 调节初始 pH 为 6.0、7.0 和 8.0, 另外加入 5 mol/L NaOH 和 pH 缓冲液将初始 pH 调至 9.0、10.0、11.0 和 12.0。在单因素实验基础上, 对培养条件进行优化, 确定最佳培养条件并验证。每组实验均设 3 次重复, 以未接种复合菌系的吡啶无机盐液体培养基为空白对照。

### 1.5 吡啶代谢产物的提取与检测

在吡啶初始浓度 1 400 mg/L 的无机盐液体培养基 (NaCl 浓度 0.1%, pH 8.0) 中, 接入 2% (体积分数) 复合菌系, 于 30 °C、180 r/min 下振荡培养。分别于 12、24、36、48、60、72 和 84 h 提取培养液 50 mL, 高速离心 (10 000 r/min、10 min) 收集上清液。用等量的二氯甲烷 (色谱级) 萃取, 利用预干燥的无水硫酸钠充分吸收去

除水分，旋转蒸发( $9.5 \times 10^4$  Pa, 35 °C, 80 r/min)浓缩至 1 mL 左右，得到提取物，通过 0.22  $\mu\text{m}$  微孔膜过滤后采用 Agilent 气相色谱-质谱联用仪 (Agilent Technologies) 进行分析，以二氯甲烷为空白对照。

气相色谱-质谱联用仪检测条件：进样口温度 250 °C；柱流量 1.0 mL/min。柱温 35 °C 保持 2 min；以 5 °C/min 速率升至 100 °C，保持 5 min；再以 20 °C/min 速率升至 240 °C，保持 10 min。质谱条件：电子轰击源 (electron-impact, EI)；离子源温度 230 °C；离子化能量 70 eV；接口温度 250 °C；四级杆温度：150 °C；全离子扫描  $m/z$ ：50–500。

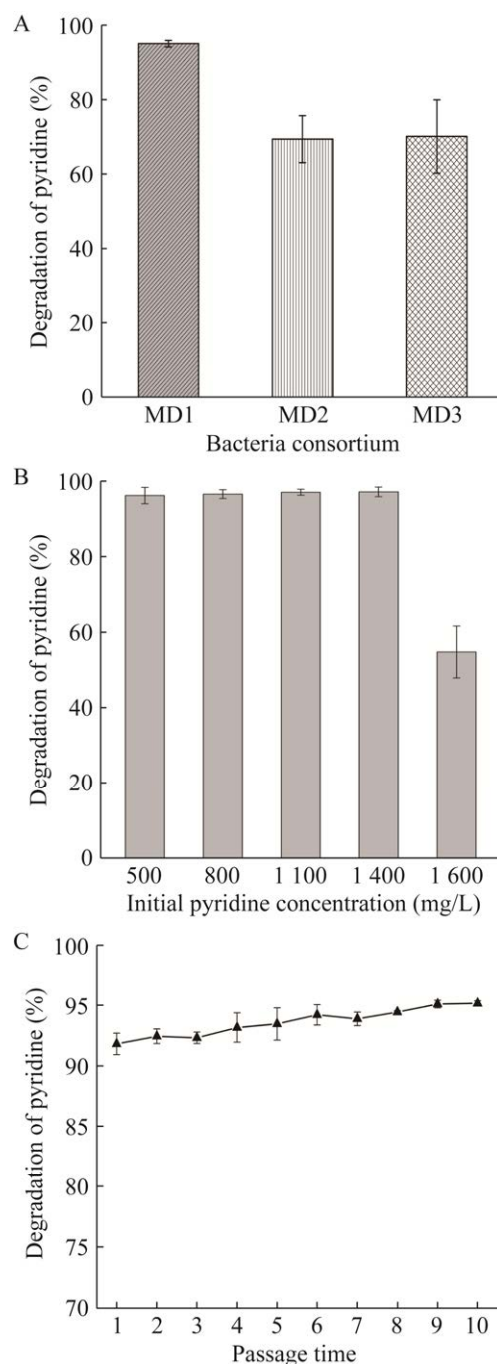
## 1.6 数据分析

文中所列结果为 3 次重复的平均值，采用 SPSS 25.0 软件中的单因素方差进行数据统计与分析 (analysis of variance, ANOVA)，并用最小显著差数法 (least-significant difference, LSD) 进行显著性检验 ( $P < 0.05$ ) 和多重比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 吡啶降解复合菌系的筛选和驯化

某农药废水处理系统的好氧活性污泥中筛选得到 3 个以吡啶为唯一碳源和氮源生长的复合菌系，分别命名为 MD1、MD2 和 MD3。将 3 个复合菌系分别接种于吡啶初始浓度为 100 mg/L 的无机盐液体培养基中，降解结果如图 1A 所示，培养 72 h 的 MD1、MD2、MD3 对吡啶的降解率分别为  $95.00\% \pm 0.87\%$ 、 $69.34\% \pm 6.35\%$ 、 $70.10\% \pm 9.84\%$ ，MD1 降解吡啶的效果明显优于 MD2 和 MD3。因此，选取 MD1 进行后续实验。MD1 对不同初始浓度吡啶的降解结果见图 1B。MD1 对吡啶的最高耐受浓度可达 1 400 mg/L，降解率为  $91.81\% \pm 0.19\%$ 。以 MD1 为菌源，在吡啶初始浓度为 1 400 mg/L 的无机盐液体培养



**图 1** 吡啶降解复合菌系的筛选、驯化和传代  
Figure 1 Screening, domestication, and passage culture of pyridine degradation bacteria consortium. A: Screening of bacteria consortiums. B: Degradation rate of pyridine by MD1 under different initial pyridine concentrations. C: Degradation rate of pyridine by each generation of MD1. The data are presented as mean  $\pm$  SD.

基中传代 10 次(图 1C), 每次传代 MD1 对吡啶的降解率均在 90%以上, 至传代 10 次后, MD1 对吡啶的降解率达到  $95.16\% \pm 0.47\%$ , 表明 MD1 对吡啶初始浓度 1 400 mg/L 的降解性能稳定。复合菌系 MD1 保藏于中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Culture Collection, CCTCC), 保藏号为: M 2023764。

## 2.2 MD1 细菌多样性及组成分析

对传代 10 次后的 MD1 进行 16S rRNA 基因高通量测序分析, 生物样本数据 NMDC40030113 存储于国家微生物科学数据中心(National Data Center for Microbial Sciences, NMDC), 链接为 <https://nmdc.cn/resource/genomics/metagenome/detail/NMDC40030113>。

### 2.2.1 MD1 细菌群落 $\alpha$ 多样性指数

由 MD1 样品的  $\alpha$  多样性指数可知, MD1 的 Chao1 指数为  $251 \pm 3.460$ , Shannon 指数和 Simpon 指数分别为  $2.174 \pm 0.011$  和  $0.452 \pm 0.001$ , 表明 MD1 中的微生物种群丰富。此外, MD1 测序结果覆盖率为  $1.000 \pm 0.000$ , 说明基于现有数据的测序结果可真实反映所测样本细菌群落的组成。

### 2.2.2 MD1 细菌群落组成分析

MD1 在门分类水平上的微生物组成及相对丰度如图 2A 所示。MD1 的优势菌门为变形

菌门(*Proteobacteria*), 相对丰度占比达 90.44%, 此外还观察到拟杆菌门(*Bacteroidetes*)的相对丰度为 2.18%, 其他菌门占比为 7.38%。

如图 2B 所示, 进一步进行 MD1 属分类水平分析, MD1 主要由副球菌属(*Paracoccus* sp.) 47.45%、布鲁氏菌属(*unclassified\_Brucellaceae*) 14.49%、无色杆菌属(*Achromobacter* sp.) 10.40%、丛毛单胞菌属(*Comamonas* sp.) 6.29%、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas* sp.) 3.83%、水微菌属(*Aquamicrobium* sp.) 3.64%、嗜染料菌属(*Pigmentiphaga* sp.) 3.16%和食酸菌属(*Acidovorax* sp.) 2.87%, 其他属 7.87%组成。

### 2.3 MD1 对吡啶的降解性能

如图 3A 所示, MD1 在培养 24–60 h 处于对数生长期, 细菌生长迅速, 有利于吡啶的降解。在培养 60–72 h, MD1 生长进入稳定期, 吡啶降解率逐步趋于稳定。当培养至 72 h, MD1 的  $OD_{600}$  达到峰值 1.186, 随后反应体系中的  $OD_{600}$  开始下降, MD1 进入衰亡期。

如图 3 所示, MD1 对吡啶降解率的显著性差异表明, 温度、pH、培养时间以及 NaCl 浓度对 MD1 降解吡啶的能力有显著影响( $P < 0.05$ )。MD1 降解吡啶的最佳温度为 30 °C, 当温度为 30 °C 时, MD1 对吡啶的降解率达到  $93.50\% \pm 0.30\%$

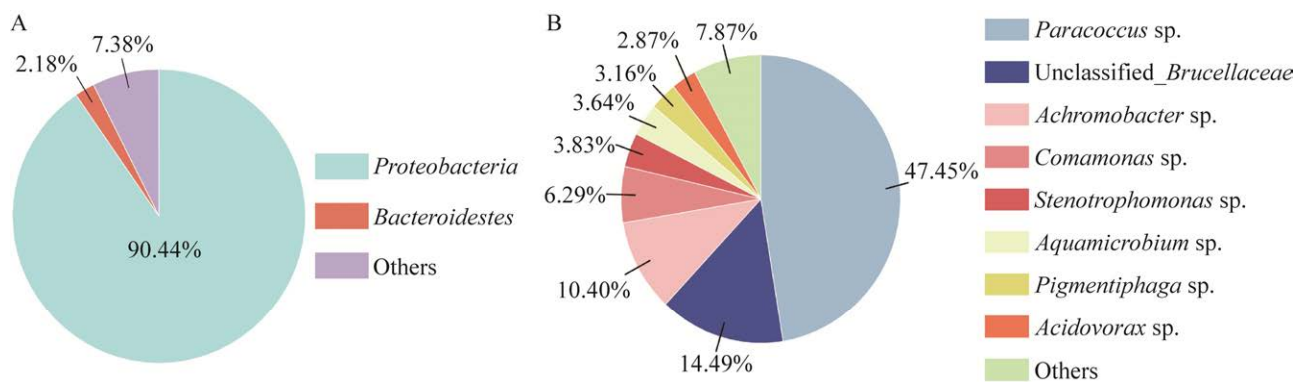


图 2 复合菌系 MD1 门和属水平细菌群落组成

Figure 2 Consortium MD1 bacterial community composition in the phylum and genera levels. A: MD1 classification in phylum levels. B: MD1 classification in genera levels.



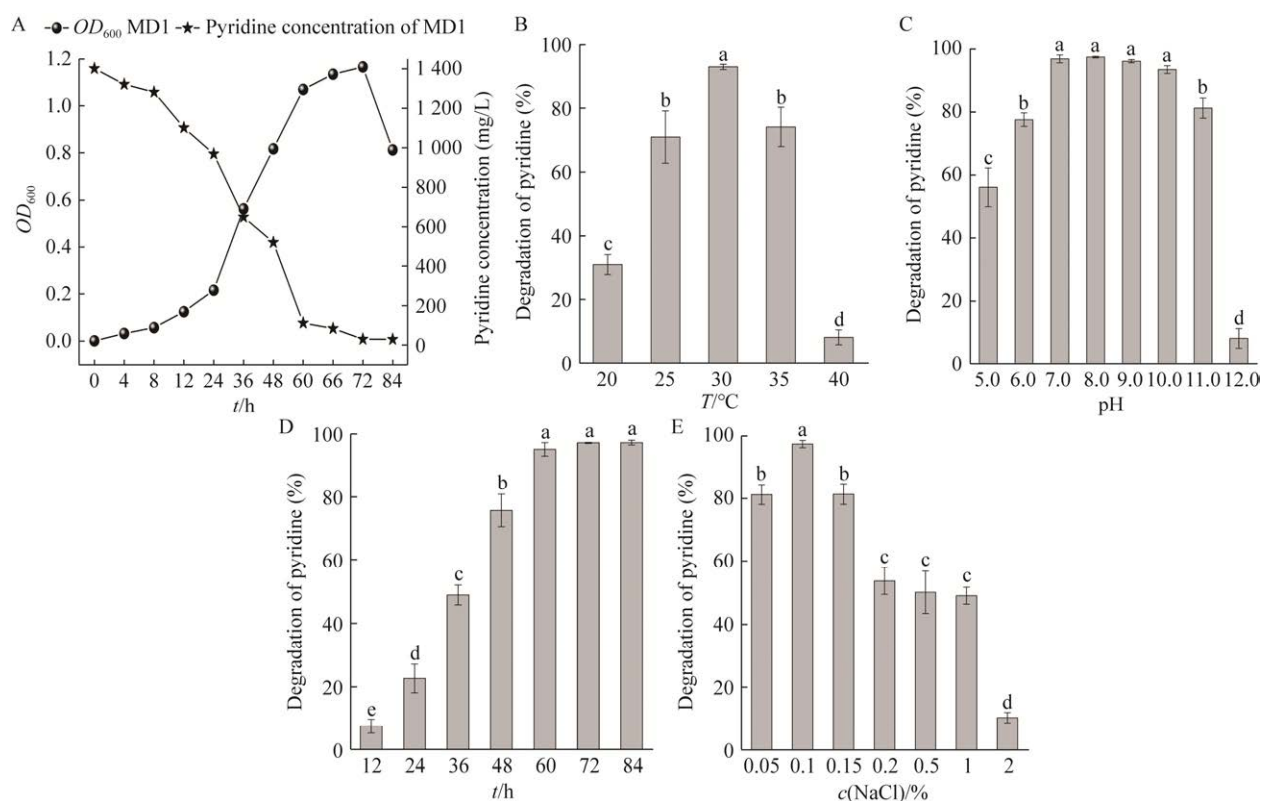


图3 环境因素对MD1降解吡啶的影响

Figure 3 Effects of environmental factors on degradation of pyridine by MD1. A: The growth curve of MD1 were examined under pH values of 8.0 and a temperature of 30 °C. B: Temperature. C: pH. D: Incubation time. E: NaCl concentration. ANOVA Duncan method was used for analysis and different letters mean significant difference at  $P < 0.05$ . The data are presented as mean $\pm$ SD.

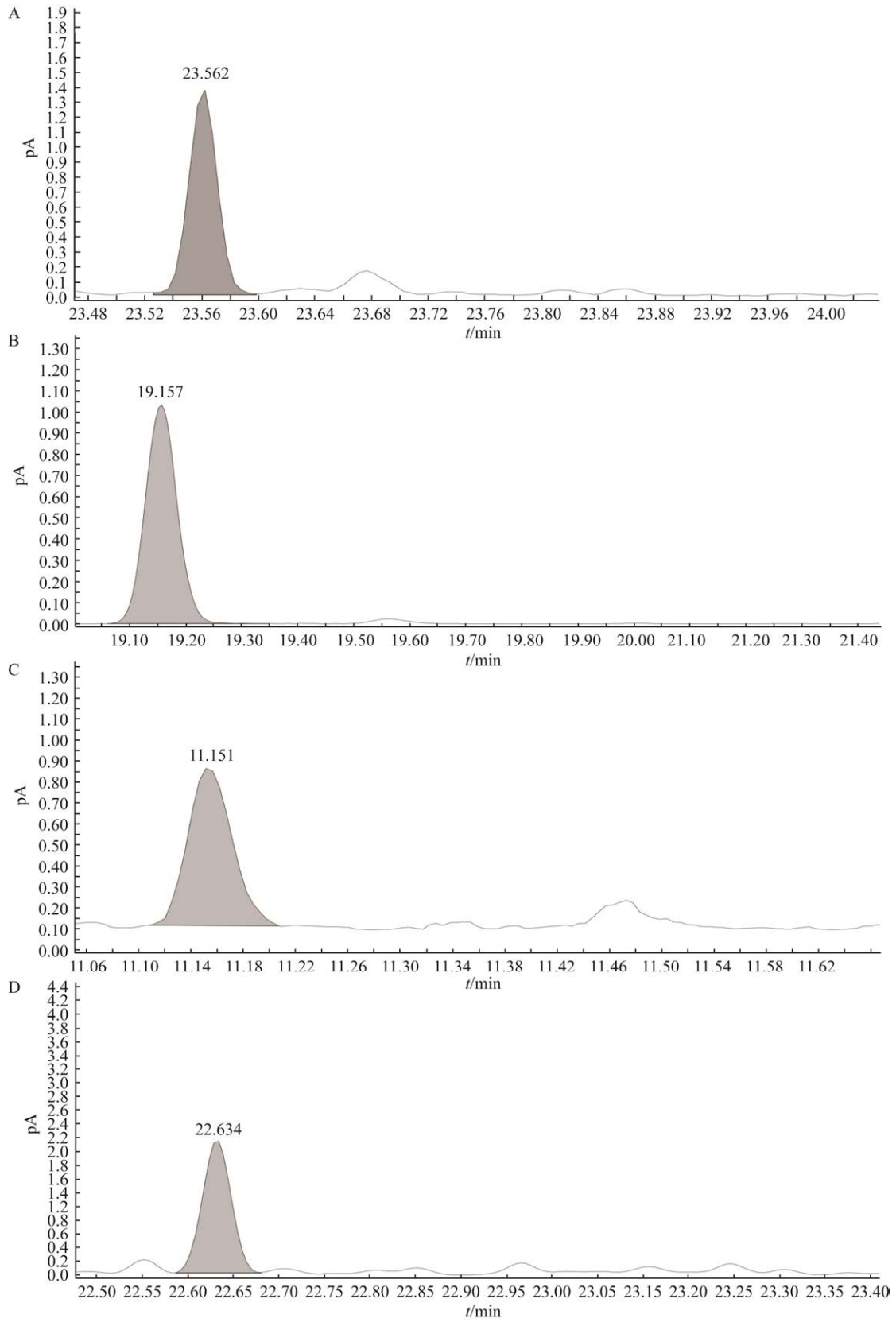
(图3B)。由图3C可知, MD1在pH为5.0–12.0条件下均可生长。当pH在7.0–10.0之间, MD1对吡啶的降解率大于 $94.32\% \pm 3.58\%$ , pH为8.0, MD1对吡啶的降解率达到最高 $97.37\% \pm 0.24\%$ ; 当pH为12.0, MD1对吡啶的降解率仅为 $8.14\% \pm 1.88\%$ 。整体来看, 中性及弱碱性条件更适宜于MD1对吡啶的降解, MD1降解吡啶的最佳pH为8.0。培养时间对MD1降解吡啶有显著影响, 相关性分析显示, 培养时间与吡啶降解率为显著正相关( $P < 0.05$ ), 当培养至72 h, 吡啶的降解率达到最大值 $98.57\% \pm 0.20\%$ (图3D)。由图3E可知, 当NaCl浓度为0.1%, MD1对吡啶的降解率最高为 $97.40\% \pm 0.16\%$ 。当NaCl浓度在0.1%–0.5%之间, MD1对吡啶的降

解率随着NaCl浓度的增加明显下降( $P < 0.05$ )。

单因素实验结果表明, MD1降解吡啶的最佳条件为30 °C、pH 8.0、培养时间72 h以及NaCl浓度0.1%。在此条件下, 将MD1按照2% (体积分数)的接种量接种于吡啶初始浓度为1400 mg/L的无机盐液体培养基中, 吡啶的降解率达到 $98.44\% \pm 0.27\%$ , 与未进行条件优化相比, 降解率提高了4.63%。

## 2.4 MD1降解吡啶的代谢产物

MD1降解吡啶的代谢产物气相色谱图见图4, 质谱图见图5。A1在23.562 min处有良好的吸收峰, A1的 $m/z$ 为123.0, 推断A1是由反应第一步羟基化产生的烟酸。中间体A2的 $m/z$ 为139.0, 保留时间19.157 min, 与分子式





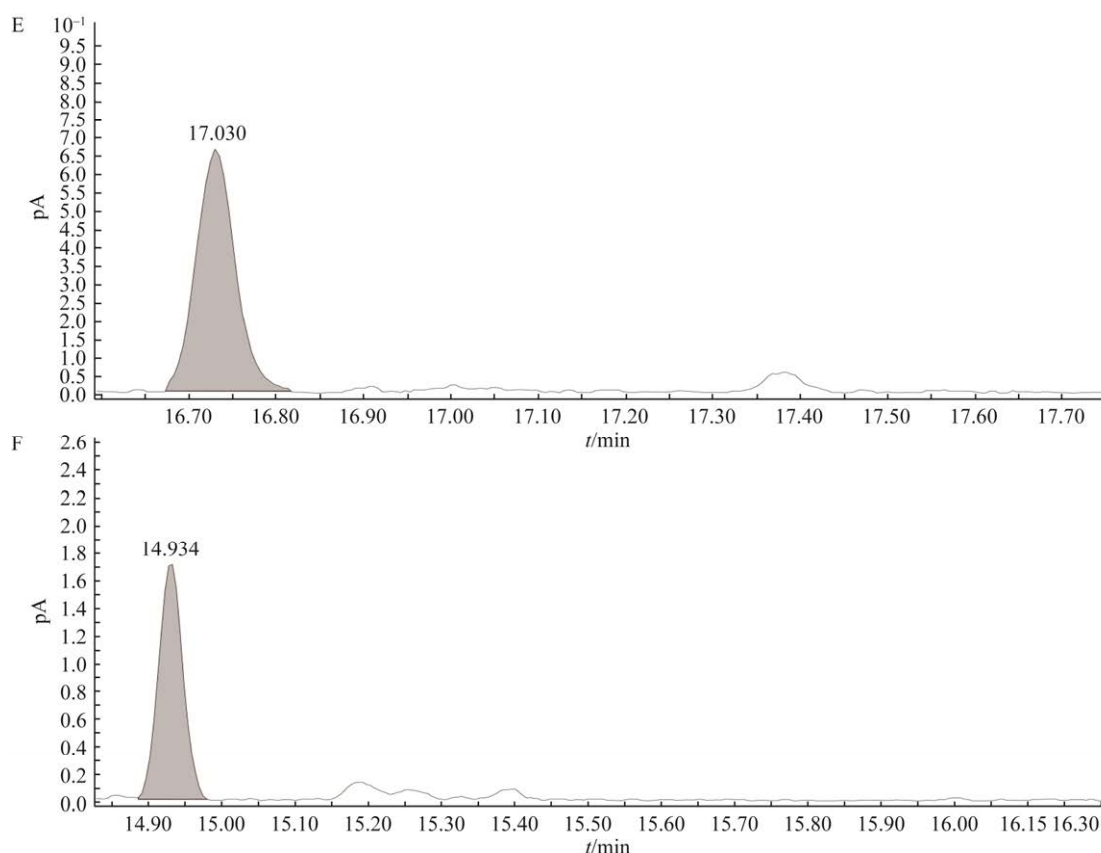


图 4 MD1 降解吡啶代谢产物的气相色谱图

Figure 4 Gas chromatography of pyridine degradation intermediate by MD1. A: Nicotinic acid. B: Hydroxynicotinic acid. C: 2,5-pyridinediol. D: N-formylmaleamic acid. E: Maleamate. F: Maleate.

$C_6H_5NO_3$  相匹配, 可鉴定 A2 为 6-羟基烟酸。代谢产物 A3 的  $m/z$  为 111.0, 与分子式  $C_5H_5NO_2$  匹配, 经鉴定 A3 为 2,5-二羟基吡啶。代谢产物 A4 可初步确定为 N-甲酰基马来酰胺酸 ( $C_5H_5NO_4$ )。中间产物 A5 在 17.030 min 处有较强的吸收峰, A5 的  $m/z$  为 115.0, 与  $C_4H_5NO_3$  相匹配, 被鉴定为马来酰胺酸。中间产物 A6 的  $m/z$  为 115.6, 与  $C_4H_4O_4$  匹配, 推断 A6 为马来酸。由此可推测出 MD1 对吡啶可能的降解途径如图 6 所示。

### 3 讨论

#### 3.1 MD1 对吡啶的降解性能

吡啶作为农药生产过程中一种主要的缚酸

剂和中间体, 在工业生产中得到广泛的应用<sup>[19]</sup>, 伴随产生了大量吡啶废水, 如何经济高效地高浓度吡啶废水成为亟需解决的难题。生物降解现已成为吡啶废水处理的主要研究方向, Sun 等<sup>[25]</sup>筛选的红球菌属(*Rhodococcus* sp.) Chr-9 可去除 200 mg/L 的吡啶。张梦思<sup>[26]</sup>筛选出的产气肠杆菌(*Enterobacter amnigenus*) BD4 可降解 440–580 mg/L 的吡啶。王璐<sup>[27]</sup>筛选出的睾丸酮丛毛单胞菌(*Comamonas testosteroni*) PZ-1 可耐受 500 mg/L 的吡啶。Wang 等<sup>[16]</sup>筛选得到的 *Paracoccus* sp. NJUST30 对吡啶具有一定的降解能力, 在 54 h 可以去除 500 mg/L 的吡啶。上述降解菌对吡啶降解时间长, 对高浓度吡啶耐受性较差, 降解效率有待提高。为丰富吡啶生

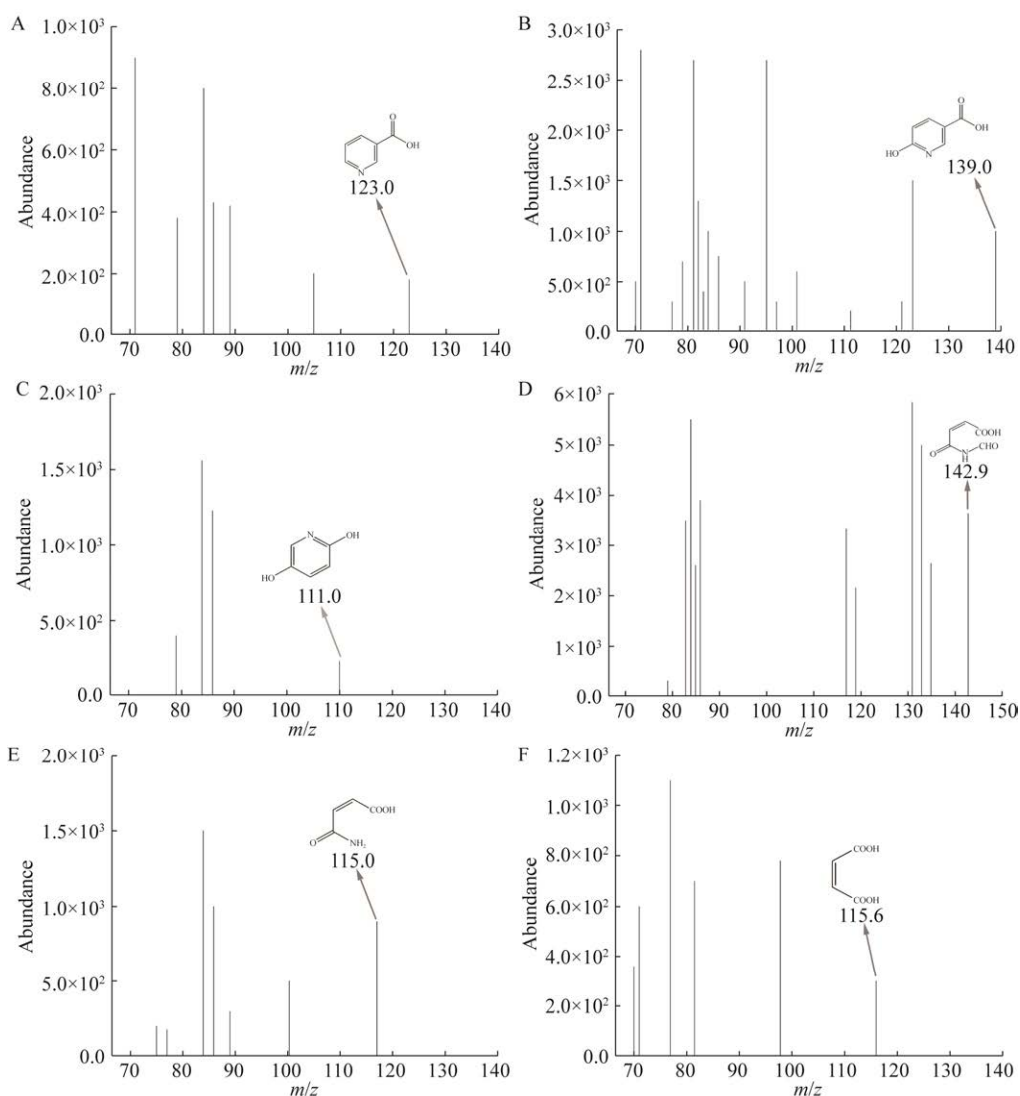


图 5 MD1 降解吡啶代谢产物的质谱图

Figure 5 Mass spectra of pyridine degradation intermediate by MD1. A: Nicotinic acid. B: Hydroxynicotinic acid. C: 2,5-pyridinediol. D: N-formylmaleamic acid. E: Maleamate. F: Maleate.

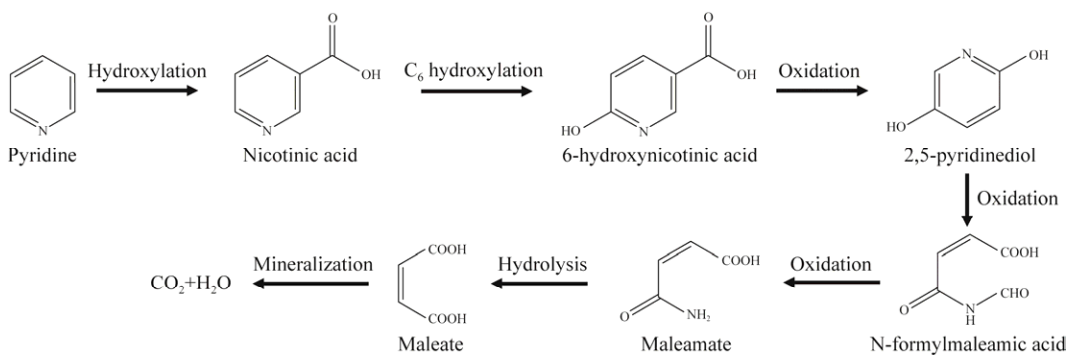


图 6 MD1 可能的吡啶生物降解途径

Figure 6 Possible pyridine biodegradation pathways by MD1.

物降解的菌种资源, 研究者探寻构建吡啶降解复合菌群, 并研究如何提高复合菌群的降解能力。Nie 等<sup>[4]</sup>构建的复合菌群 H4 对初始浓度 200 mg/L 的吡啶在 36 h 内降解率可达 91.70%。张寅等<sup>[28]</sup>构建的复合菌 M19 可在 10.1 h 内可完全降解初始浓度 200 mg/L 的吡啶。根据各菌株的生长特性构建的复合菌群, 虽然实现了在短时间内对吡啶的降解, 但是仍存在难以降解高浓度吡啶等问题。复合菌系具有传代稳定、条件温和、降解效率高等特点, 被广泛应用于有机废水生物处理<sup>[21]</sup>。但目前鲜有从自然环境样品中直接筛选吡啶降解复合菌系的报道。本研究分离得到一个对吡啶具有降解能力的复合菌系 MD1, 其主要由副球菌属(*Paracoccus* sp.)、布鲁氏菌属(*unclassified\_Brucellaceae*)、无色杆菌属(*Achromobacter* sp.)等组成。实验结果发现 MD1 对环境的抗逆性较好, 从吡啶浓度耐受范围看, MD1 对初始浓度 1 400 mg/L 的吡啶降解率可达 98.44%±0.27%, 高于绝大部分文献<sup>[3,25-28]</sup>报道的微生物对吡啶的降解效能。虽然有菌株 NJUST18<sup>[29]</sup>对吡啶浓度 2 600 mg/L 具有一定的降解能力, 但是降解时间需要 240 h。此外, MD1 在 pH 范围 7.0–10.0 之间均能有效降解吡啶, 降解率大于 94.32%±3.58%。因此, 与现有吡啶降解微生物相比, 本研究筛选获得的 MD1 性能优异, 应用价值高。

### 3.2 MD1 微生物群落组成分析

对复合菌系 MD1 进行了  $\alpha$  多样性分析。其中, Shannon、Simpson 和 Chao1 指数用于衡量复合菌系微生物群落的多样性, Shannon 和 Chao1 指数数值越大表明群落多样性越高, Simpson 指数则相反<sup>[21]</sup>。MD1 的 Shannon、Simpson 和 Chao1 指数均大于 Zheng 等<sup>[30]</sup>在膜曝气生物膜反应器(membrane aeration biofilm reactor, MABR)中富集到的吡啶降解微生物群

落, MD1 微生物群落的多样性较高。本研究中 MD1 能在碱性环境下快速高效地降解高浓度吡啶, 其主要原因可能与副球菌属(*Paracoccus* sp.)、丛毛单胞菌属(*Comamonas* sp.)、无色杆菌属(*Achromobacter* sp.)和寡氧单胞菌属(*Stenotrophomonas* sp.)等在 MD1 中相对丰度占比较高有关。副球菌属(*Paracoccus* sp.)在废水处理领域可用于难降解有机物、化学需氧量、氨氮及总氮的降解脱除<sup>[31]</sup>。Wang 等<sup>[16]</sup>筛选的 *Paracoccus* sp. NJUST30 可在 54 h 的培养期内完全去除 500 mg/L 的吡啶, 并在降解过程中产生 2-羧基琥珀酸、戊二酸等酸性物质, 在一定程度上调节 pH 值使得培养基的环境更有利于细菌的生长代谢。丛毛单胞菌属(*Comamonas* sp.)可加速吡啶生物降解的第一步, 通过单加氧化作用生成 2-羟基吡啶<sup>[32]</sup>。无色杆菌属(*Achromobacter* sp.)具有高浓度吡啶降解能力, 且在降解过程中产生戊二醛、琥珀酸、甲酸等酸性物质<sup>[33]</sup>。目前未见寡氧单胞菌属(*Stenotrophomonas* sp.)降解吡啶的相关报道, 但先前的研究证明寡氧单胞菌属(*Stenotrophomonas* sp.)能降解丁草胺<sup>[34]</sup>、多环芳烃<sup>[35]</sup>和烟碱<sup>[36]</sup>等有机污染物。由此推断, 在碱性环境下, 复合菌系 MD1 能够保持降解高浓度吡啶的能力, 这是由于与吡啶降解相关的细菌在微生物群落组成中处于优势地位, 同时产生的酸性物质, 可以调节培养基的酸碱度, 从而弥补了单菌降解适应性差和降解效率低等方面的不足。

### 3.3 MD1 对吡啶可能的代谢途径

目前有关吡啶的降解途径主要有羧基化途径<sup>[3]</sup>、甲基化途径<sup>[19]</sup>、羧基化途径<sup>[20]</sup>、直接还原途径<sup>[28]</sup>和羟基化途径<sup>[37]</sup>。从生物降解途径中可以明晰微生物对吡啶的降解方式以及可能产生的代谢产物, 从而选择合适的条件使微生物更有利于吡啶降解<sup>[3]</sup>。因此, 研究吡啶的生物

降解途径十分必要。Zhang 等<sup>[38]</sup>观察到吡啶降解涉及多种代谢途径,首先在羟基化的过程中产生琥珀酸半醛,然后在羰基化和羧基化的作用下生成琥珀酸和甲酸等主要中间体。Singh 等<sup>[39]</sup>也观察到类似的吡啶降解机理,吡啶环裂解后产生有机酸,如丙二酸、甲酸和草酸。本研究结合 MD1 降解吡啶的中间代谢产物,提出 MD1 可能的吡啶降解途径。MD1 对吡啶的降解始于吡啶羧基化后生成的中间产物烟酸,随后烟酸的 C6 位进行羟基化,产生 6-羟基烟酸,然后氧化脱羧,生成 2,5-二羟基吡啶,接着 2,5-二羟基吡啶被氧化生成 N-甲酰基马来酰胺酸, N-甲酰基马来酰胺酸继续氧化裂解得到马来酰胺酸,马来酰胺经水解脱氨基作用生成马来酸,马来酸最终矿化为水和二氧化碳。然而,由于 MD1 中的微生物组成复杂,不同菌株的代谢分泌物和生长情况存在差异,可能表现为协同作用,也可能相互抑制,继而影响整个菌群的代谢能力<sup>[21]</sup>。最近 Qu 等<sup>[40]</sup>首次从微生物基因分子水平上阐述了吡啶的降解机理。实验表明吡啶加氧酶 Inda 负责催化吡啶氧化成吡啶酚,吡啶酚进一步转化为靛红和邻氨基苯甲酸,靛红通过自发和酶促反应水解为靛红酸,而邻氨基苯甲酸通过非典型的 2-氨基苯甲酰基-CoA 途径降解。Qiu 等<sup>[41]</sup>揭示了吡啶类化合物 5-羟基吡啶羧基化生物降解的酶和基因。上述研究结果,为从微生物基因分子水平揭示复合菌系 MD1 生物降解吡啶的机制提供了技术支持。下一步将深入探究对 MD1 降解吡啶过程中的关键酶和基因。

## 4 结论

(1) 从某农药废水处理系统好氧池泥水样中分离得到一个吡啶高效降解复合菌系 MD1, MD1 的细菌组成具有很高的多样性,在属分类

水平上, MD1 主要由副球菌属(*Paracoccus* sp.) 47.45%、布鲁氏菌属(*unclassified\_Brucellaceae*) 14.49%、无色杆菌属(*Achromobacter* sp.) 10.40% 等组成。

(2) 在最适条件温度 30 °C、pH 8.0、培养时间 72 h 和 NaCl 浓度 0.1%的条件下, MD1 对初始浓度 1 400 mg/L 的吡啶降解率为 98.44%±0.27%。

(3) 结合 MD1 对吡啶的降解产物检测结果,初步推测 MD1 对吡啶可能的代谢途径为: 吡啶→烟酸→6-羟基烟酸→2,5-二羟基吡啶→N-甲酰基马来酰胺酸→马来酰胺酸→马来酸→CO<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>O。

## 参考文献

- [1] LU Q, ZHANG C, WANG W, YUAN B, ZHANG Y, RITTMANN BE. Bioavailable electron donors leached from leaves accelerate biodegradation of pyridine and quinoline[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 654: 473-479.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] NIE Z, YAN B, XU Y, AWASTHI MK, YANG H. 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.
- [5] NIOSH/OSHA. Occupational health guidelines for chemical hazards[J]. DHHS Publication (USA), 1981, 81-123.
- [6] LIAO P, YUAN SH, XIE WJ, ZHANG WB, TONG M, WANG K. Adsorption of nitrogen-heterocyclic compounds on bamboo charcoal: kinetics, thermodynamics, and microwave regeneration[J].

- Journal of Colloid and Interface Science, 2013, 390(1): 189-195.
- [7] SCHWELL M, JOCHIMS HW, BAUMGARTEL H, LEACH S. VUV photophysics and dissociative photoionization of pyrimidine, purine, imidazole and benzimidazole in the 7–18 eV photon energy range[J]. *Chemical Physics*, 2008, 353(1/2/3): 145-162.
- [8] PADOLEY KV, MUDLIAR SN, BANERJEE SK, DESHMUKH SC, PANDEY RA. Fenton oxidation: a pretreatment option for improved biological treatment of pyridine and 3-cyanopyridine plant wastewater[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2011, 166(1): 1-9.
- [9] 曹威扬. 微波加热焚烧法处理沥青烟气的研究[D]. 昆明: 昆明理工大学硕士学位论文, 2011.
- CAO WY. Study of microwave assisted incineration of asphalt flue gas[D]. Kunming: Master's Thesis of Kunming University of Science and Technology, 2011 (in Chinese).
- [10] KHASAEVA F, VASILYUK N, TEREPTYEV P, TROSHINA M, LEBEDEV AT. A novel soil bacterial strain degrading pyridines[J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2011, 9(3): 439-445.
- [11] BAI YH, SUN QH, XING R, WEN DH, TANG XY. Removal of pyridine and quinoline by bio-zeolite composed of mixed degrading bacteria and modified zeolite[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 181(1/2/3): 916-922.
- [12] MATHUR AK, MAJUMDER CB, CHATTERJEE S, ROY P. Biodegradation of pyridine by the new bacterial isolates *S. putrefaciens* and *B. sphaericus*[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 157(2/3): 335-343.
- [13] LI JW, CAI WJ, CAI JJ. The characteristics and mechanisms of pyridine biodegradation by *Streptomyces* sp.[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 165(1/2/3): 950-954.
- [14] 王基成, 张秀霞, 房苗苗, 吴伟林, 赵朝成, 鲁军. 两株吡啶降解菌的分离与鉴定[J]. *生态环境*, 2008(1): 117-121.
- WANG JC, ZHANG XX, FANG MM, WU WL, ZHAO CC, LU J. Isolation and identification of two pyridine-degrading strain[J]. *Ecology and Environment*, 2008(1): 117-121 (in Chinese).
- [15] CHANDRA R, BHARAGAVA RN, KAPLEY A, PUROHIT HJ. Isolation and characterization of potential aerobic bacteria capable for pyridine degradation in presence of picoline, phenol and formaldehyde as co-pollutants[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 25(12): 2113-2119.
- [16] 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.
- [17] 邓秀琼. 焦化废水氮杂环化合物降解功能菌的分离、降解特性与代谢途径研究[D]. 广州: 华南理工大学博士学位论文, 2011.
- DENG XQ. Isolation, degradation characteristics and metabolic pathways of pyridine-degrading strain from activated sludge from a coking wastewater treatment[D]. Guangzhou: Doctor's Thesis of South China University of Technology, 2011 (in Chinese).
- [18] CHATTERJEE S, BISWAS S, GANGULY S, MATHUR AK. Isolation of pyridine degrading bacteria from soils contaminated with petrochemical industry effluents in purba medinipur[J]. *Journal of Biological and Environmental Sciences*, 2013, 7(20): 109-119.
- [19] 梁曦. 共絮凝作用下吡啶降解好氧颗粒污泥的快速培养[D]. 南京: 南京理工大学硕士学位论文, 2018.
- LIANG J. Rapid culture of aerobic granular sludge degraded by pyridine under co-flocculation[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing University of Science and Technology, 2018 (in Chinese).
- [20] 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.
- [21] ZHANG LG, QIU XY, HUANG L, XU JJ, WANG WW, LI Z, XU P, TANG HZ. Microbial degradation of multiple PAHs by a microbial consortium and its application on contaminated wastewater[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 419: 126524.
- [22] WATSON GK, CAIN RB. Microbial metabolism of the pyridine ring. Metabolic pathways of pyridine biodegradation by soil bacteria[J]. *The Biochemical Journal*, 1975, 146(1): 157-172.
- [23] FRANK JA, REICH CI, SHARMA S, WEISBAUM JS, WILSON BA, OLSEN GJ. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(8): 2461-2470.
- [24] CAPORASO JG, LAUBER CL, WALTERS WA, BERG-LYONS D, HUNTLEY J, FIERER N, OWENS

- SM, BETLEY J, FRASER L, BAUER M, GORMLEY N, GILBERT JA, SMITH G, KNIGHT R. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6(8): 1621-1624.
- [25] SUN JQ, XU L, TANG YQ, CHEN FM, LIU WQ, WU XL. Degradation of pyridine by one *Rhodococcus* strain in the presence of chromium (VI) or phenol[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 191(1/2/3): 62-68.
- [26] 张梦思. 联苯、吡啶降解菌的筛选及降解研究[D]. 武汉: 武汉科技大学硕士学位论文, 2011.  
ZHANG MS. Screening of pyridine and biphenyl degrading strains and study of their degradation[D]. Wuhan: Master's Thesis of Wuhan University of Science and Technology, 2011 (in Chinese).
- [27] 王璐. 丛毛单胞菌 pz-1 强化活性污泥对吡啶的生物降解和矿化[D]. 上海: 上海师范大学硕士学位论文, 2020.  
WANG L. Enhanced biodegradation and mineralization of pyridine by activated sludge by *Comamonas* pz-1[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Normal University, 2020 (in Chinese).
- [28] 张寅, 郑中原, 赵翠, 张永明, 刘锐, 温东辉. 一种复合菌剂对 3 种氮杂环芳烃化合物的降解机理[J]. *北京大学学报(自然科学版)*, 2013, 49(5): 915-920.  
ZHANG Y, ZHENG ZY, ZHAO C, ZHANG YM, LIU R, WEN DH. Degradation mechanism of three nitrogen heterocyclic compounds by a microbial consortium[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis (Natural Science Edition)*, 2013, 49(5): 915-920 (in Chinese).
- [29] SHEN JY, ZHANG X, CHEN D, LIU XD, ZHANG LB, SUN XY, LI JS, BI HP, WANG LJ. Kinetics study of pyridine biodegradation by a novel bacterial strain, *Rhizobium* sp. NJUST18[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2014, 37(6): 1185-1192.
- [30] ZHENG P, LI Y, CHI Q, CHENG YP, JIANG XB, CHEN D, MU Y, SHEN JY. Structural characteristics and microbial function of biofilm in membrane-aerated biofilm reactor for the biodegradation of volatile pyridine[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 437: 129370.
- [31] WANG QH, LONG JW, LIANG JH, EL-DIN MG, ZHAO P, XIE WY, CHEN CM. Nitrogen removal intensification of aerobic granular sludge through bioaugmentation with "heterotrophic nitrification-aerobic denitrification" consortium during petroleum wastewater treatment[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 361: 127719.
- [32] ZHU G, ZHANG YM, CHEN SY, WANG L, ZHANG ZC, RITTMANN BE. How bioaugmentation with *Comamonas testosteroni* accelerates pyridine mono-oxygenation and mineralization[J]. *Environmental Research*, 2021, 193: 110553.
- [33] MA Q, QU YY, SHEN WL, ZHANG ZJ, WANG JW, LIU ZY, LI DX, LI HJ, ZHOU JT. Bacterial community compositions of coking wastewater treatment plants in steel industry revealed by Illumina high-throughput sequencing[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 179: 436-443.
- [34] DWIVEDI S, SINGH BR, AL-KHEDHAIRY AA, ALARIFI S, MUSARRAT J. Isolation and characterization of butachlor-catabolizing bacterial strain *Stenotrophomonas acidaminiphila* JS-1 from soil and assessment of its biodegradation potential[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2010: 51(1): 54-60.
- [35] PATEL K, PATEL M. Improving bioremediation process of petroleum wastewater using biosurfactants producing *Stenotrophomonas* sp. S1VKR-26 and assessment of phytotoxicity[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 315: 123861.
- [36] WANG YT, LUO XY, CHU P, SHI HL, WANG R, LI JL, ZHENG SX. Cultivation and application of nicotine-degrading bacteria and environmental functioning in tobacco planting soil[J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2023, 10(1): 1-11.
- [37] DENG XQ, WEI CH, REN Y, CHAI XS. Isolation and identification of *Achromobacter* sp. DN-06 and evaluation of its pyridine degradation kinetics[J]. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2011, 221(1/2/3/4): 365-375.
- [38] ZHANG YM, CHANG L, YAN N, TANG YX, LIU R, RITTMANN BE. UV photolysis for accelerating pyridine biodegradation[J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(1): 649-655.
- [39] SINGH S, LO SL. Catalytic performance of hierarchical metal oxides for per-oxidative degradation of pyridine in aqueous solution[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2017, 309: 753-765.
- [40] QU YY, MA Q, LIU ZY, WANG WW, TANG HZ, ZHOU JT, XU P. Unveiling the biotransformation mechanism of indole in a *Cupriavidus* sp. strain[J]. *Molecular Microbiology*, 2017, 106(6): 905-918.
- [41] QIU JG, LIU B, ZHAO LL, ZHANG YT, CHENG D, YAN X, JIANG JD, HONG Q, HE J. A novel degradation mechanism for pyridine derivatives in *Alcaligenes faecalis* JQ135[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(15): e00910-18.