

研究报告



可降解吡啶的全食副球菌 B21-3 的筛选鉴定及降解特性

孙磊^{1,2} 宋彤彤¹ 王佳硕¹ 刘存歧^{*1}

1 河北大学生命科学学院 河北 保定 071002

2 河北省微生物多样性研究与应用实验室 河北 保定 071002

摘要:【背景】吡啶作为一种难降解的有机污染物普遍存在于焦化、炼油、皮革和制药等行业的废水中,并对环境造成危害。【目的】治理废水中残留的有机污染物吡啶,筛选高效降解菌。【方法】采用富集培养和选择培养,以石家庄某污水处理厂的活性污泥为材料进行吡啶降解菌的筛选,通过形态特征、生理生化特性、(G+C)mol%测定及16S rRNA基因序列系统发育分析对筛选到的降解菌进行鉴定,并分析其对吡啶的降解特性。【结果】分离筛选到一株能以吡啶为唯一碳源和氮源生长代谢的降解菌 B21-3,经鉴定该菌株为全食副球菌(*Paracoccus pantotrophus*)。菌株 B21-3 对吡啶的最适降解温度为 32 °C,最适降解 pH 为 7.0,吡啶浓度为 100 mg/L 时降解率为 48.50%±0.02%;通过逐步提高吡啶初始浓度对菌株进行驯化,驯化后菌株可耐受较高浓度吡啶且吡啶降解率显著增加,吡啶浓度为 100 mg/L 时驯化后菌株 B21-3 对吡啶的降解率为 90.26%±1.70%。驯化后菌株在含吡啶的无机盐平板上传代培养 15 代后,对吡啶的降解率为 89.39%±2.03%。【结论】菌株 B21-3 具有较强的吡啶降解能力及降解稳定性,该菌株可作为吡啶污染水体生物修复的潜在资源。

关键词: 吡啶, 生物降解, 全食副球菌

Screening, identification and characterization of a pyridine degrading bacterium *Paracoccus pantotrophus* B21-3

SUN Lei^{1,2} SONG Tong-Tong¹ WANG Jia-Shuo¹ LIU Cun-Qi^{*1}

1 College of Life Sciences, Hebei University, Baoding, Hebei 071002, China

2 Laboratory of Microbial Diversity Research and Application of Hebei Province, Baoding, Hebei 071002, China

Abstract: [Background] As a refractory organic pollutant, pyridine is commonly found in wastewater from coking, refining, leather and pharmaceutical industries, causing harm to the environment. [Objective] To treat pyridine contaminated wastewater, bacteria capable of degrading pyridine were screened. [Methods] Pyridine degrading bacteria were isolated from the activated sludge of a wastewater plant in Shijiazhuang by enrichment and selective medium. Bacterium B21-3 was identified by morphological, physiological and biochemical characteristics, (G+C)mol% assay, and 16S rRNA gene phylogenetic analysis. The pyridine degradation characteristics were analyzed. [Results] A bacterial strain B21-3 that used pyridine as the sole carbon and energy source was isolated and identified as *Paracoccus*

Foundation item: National Water Pollution Control and Management Technology Major Projects (2012ZX07203003)

***Corresponding author:** Tel: 86-312-5079364; E-mail: liucunqi@sina.com

Received: 11-09-2018; **Accepted:** 07-12-2018; **Published online:** 24-12-2018

基金项目: 水体污染控制与治理科技重大专项(2012ZX07203003)

***通信作者:** Tel: 0312-5079364; E-mail: liucunqi@sina.com

收稿日期: 2018-09-11; **接受日期:** 2018-12-07; **网络首发日期:** 2018-12-24

pantotrophus. The optimal pH and temperature for pyridine degradation were 7.0 and 32 °C, respectively. When the initial concentration of pyridine was 100 mg/L, the degradation percentage of pyridine was 48.50%±0.02%. After acclimation by increasing the initial concentration of pyridine, strain B21-3 tolerated higher concentrations of pyridine and the degradation of pyridine increased significantly. Under the pyridine concentration of 100 mg/L, the degradation percentage of pyridine by domesticated strain B21-3 was 90.26%±1.70%. After the acclimatized strain B21-3 was subcultured on mineral salt plates supplemented with pyridine for 15 generations, the degradation percentage of pyridine was 89.39%±2.03%. **[Conclusion]** Strain B21-3 had strong pyridine degradation ability with potential for bioremediation of pyridine contaminated wastewater.

Keywords: Pyridine, Biodegradation, *Paracoccus pantotrophus*

生物难降解有机污染物是指被微生物分解时速度慢、降解不彻底的有机物及一些代谢产物^[1]。吡啶(Pyridine)是含有一个氮原子的六元杂环化合物,被广泛应用于医药、农药和染料等生产中,属于中度毒性有机物,是一种易挥发、难降解的恶臭污染物^[2]。吡啶普遍存在于焦化、炼油、皮革和制药等行业的废水中^[3],并且很容易通过渗透扩散进入地下水系统,引起水资源的污染^[4]。因此,对含吡啶的工业废水进行直接有效的处理具有十分重要的意义。

难降解有机污染物的生物降解法是目前应用最广、最有效的处理方法,国内外已分离出可降解吡啶的细菌,主要归属于副球菌属(*Paracoccus*)^[5]、不动杆菌属(*Acinetobacter*)^[6]、申氏杆菌属(*Shinella*)^[3]、红球菌属(*Rhodococcus*)^[7]、假单胞菌属(*Pseudomonas*)^[8]、无色杆菌属(*Achromobacter*)^[9]、根瘤菌属(*Rhizobium*)^[10]、节杆菌属(*Arthrobacter*)^[11]等。目前对可降解吡啶菌株的研究主要集中在菌株降解特性^[12]及降解代谢途径等方面^[4],并有研究结果显示降解吡啶的基因存在于质粒上^[13-14],从而导致菌株质粒易丢失、吡啶降解稳定性差等问题,而且高效降解菌因世代周期较长,特殊降解活性也会逐渐退化。因此,基于降解性能的保证,在筛选降解吡啶菌株的过程中不仅要考虑降解能力,更要考虑其遗传的稳定性。本文从活性污泥中分离出一株可降解吡啶的全食副球菌(*Paracoccus pantotrophus*),并对其降解特性及遗传稳定性进行了分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

2014年3月采集石家庄某污水处理厂曝气池出水口的污泥,装入无菌瓶中带回实验室用于吡啶降解菌的分离。

1.1.2 主要试剂和仪器

吡啶盐酸盐,化学纯,含量≥98%,天津市光复精细化工研究所。紫外分光光度计,上海美谱达仪器有限公司;高速冷冻离心机,上海天美生化仪器设备工程有限公司。

1.1.3 培养基

LB培养基(g/L):蛋白胨 10.0,酵母粉 5.0,NaCl 10.0,pH 7.0。固体培养基中加入2%(质量体积比)的琼脂。

吡啶无机盐培养基(g/L)^[15]: NaH₂PO₄ 1.42, KH₂PO₄ 1.36, MgSO₄·7H₂O 0.216, CaCl₂ 0.006; 固体培养基中加入2%(质量体积比)的琼脂;微量元素(g/L): MnSO₄·H₂O 1.69, CoCl₂·6H₂O 0.24, H₃B₃O 1.16, Na₂MoO₄·2H₂O 0.024, FeSO₄·7H₂O 2.78, ZnSO₄·7H₂O 1.15, CuSO₄·5H₂O 0.38, 吸取1 mL 微量元素加入吡啶无机盐培养基中,pH 7.0-7.2。1×10⁵ Pa 高压蒸汽灭菌30 min 备用。吡啶盐酸盐作为碳源和氮源,以去离子水配制成吡啶含量为10 g/L的溶液,经有机滤膜(0.22 μm)过滤除菌后按比例加入。

1.2 试验方法

1.2.1 样品的富集与菌种初筛

将10 g 沉积物加入到吡啶浓度为100 mg/L的

无机盐培养基中, 30 °C、180 r/min 振荡培养 5 d 后, 以 5% 的转接量转接到新的相同浓度的吡啶无机盐培养基, 连续转接 3 次。然后用生理盐水将富集后的培养液进行梯度稀释, 涂布于吡啶无机盐固体培养基, 进行菌株的分离筛选, 30 °C 培养 72 h, 挑取颜色、大小不同的单菌落划线纯化后接种于 LB 培养基斜面, 4 °C 保存。

1.2.2 吡啶降解菌的复筛

将初筛获得的菌株接种至吡啶浓度为 100 mg/L 的无机盐液体培养基中, 30 °C、180 r/min 振荡培养 3 d。吸取 5 mL 菌悬液 10 000 r/min 离心 8 min, 吸取上清进行吡啶含量的定量测定。采用紫外分光光度法于 256 nm 波长下测定吡啶含量^[16]。根据测定值计算降解率, 进行数据统计。

降解率=[(对照吸光值-样品吸光值)/对照吸光值]×100%。

1.2.3 菌株的鉴定

(1) 16S rRNA 基因序列分析

采用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F^[17] (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492r^[18] (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: 10×PCR 缓冲液 5 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μL, 引物(10 μmol/L)各 2 μL, DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.6 μL, 模板 DNA (20 ng/μL) 2 μL, 灭菌超纯水补至 50 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 54 °C 45 s, 72 °C 45 s, 30 个循环; 72 °C 7 min。PCR 产物经切胶回收后由北京宝锐通技术有限公司测序, 测序结果提交 EzTaxon 数据库(<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon/identify>)进行序列比对, 选取相似性较高的序列用 Neighbor-Joining 法^[19]进行分析, 采用 MEGA 7.0 构建系统发育树。

(2) 形态学及生理生化鉴定

将菌株接种于固体 LB 培养基, 30 °C 培养 24 h 后进行鞭毛染色和革兰氏染色^[20], 48 h 后观察菌落形态。根据《常见细菌鉴定手册》^[20]主要进行了氧化酶试验、接触酶试验、VP 试验、甲基

红试验、硝酸盐还原试验等, 同时进行 Biolog 试验确定菌株对碳源的利用。

(3) (G+C)mol%的测定

采用 HPLC 法^[21]测定菌株基因组的(G+C)mol%。

1.2.4 菌株降解特性的研究

将吡啶降解菌 B21-3 接种于 LB 液体培养基, 30 °C、180 r/min 培养 48 h, 将培养液在 10 000 r/min 转速下离心 5 min, 弃去上清液, 用已灭菌的无机盐培养基洗涤菌体 2-3 次后, 用无机盐液体培养基将洗涤后的菌体重悬并调整 OD₆₀₀ 为 2.0, 得到种子液。

温度、初始 pH 对降解率的影响: 将菌株 B21-3 以 2% 接种量接入含 100 mg/L 吡啶的无机盐培养基中, 在不同初始温度(15、20、25、32、37 和 42 °C) 或初始 pH (5.0、6.0、7.0、8.0、9.0) 条件下 180 r/min 培养 72 h, 每 12 h 取样一次, 同时测定菌浓度 OD₆₀₀ 和吡啶残余浓度, 计算降解率。

菌株的驯化: 为提高菌株对污染物的耐受能力, 对吡啶降解菌 B21-3 进行驯化。将菌株接入吡啶初始浓度为 100 mg/L 的无机盐培养基中, 32 °C、180 r/min 条件下振荡培养 72 h 后进行转接, 吡啶浓度每次增大 100 mg/L, 当吡啶浓度增大到 900 mg/L 时完成驯化。将培养液在 10 000 r/min 转速下离心 5 min, 弃去上清液, 用已灭菌的无机盐培养基洗涤 2-3 次, 以除去含有吡啶的培养基组分, 最后用不含吡啶的无机盐液体培养基将菌体重悬, 接入吡啶浓度为 100、200、300、500、700、900 mg/L 的无机盐培养基中, 32 °C、180 r/min 摇床培养 96 h, 测定菌株对吡啶的降解能力, 同时以未驯化的菌株为对照。

以上每个实验均设 3 次重复, 以不接吡啶降解菌的处理作为空白对照。

1.2.5 菌株降解吡啶的稳定性

驯化后菌株在吡啶含量为 100 mg/L 的无机盐固体培养基中进行 15 次传代后, 接入吡啶浓度为 100 mg/L 的无机盐液体培养基中, 测定菌株对吡啶的降解能力。

2 结果与分析

2.1 降解菌的筛选与鉴定

样品富集后经初筛共得到 198 株能以吡啶为唯一碳源和氮源生长的细菌。复筛后有 76 株细菌可测得其吡啶降解率, 17 株细菌的降解率介于 40%–50%, 34 株细菌降解率介于 20%–40%, 25 株细菌的降解率低于 20%, 其中菌株 B21-3 的降解率最高。

将菌株 B21-3 的 16S rRNA 基因序列提交 GenBank 数据库, 序列登录号为 KT715779, 与 EzTaxon 数据库中的序列进行比对并构建系统发育树(图 1)。如图 1 所示, 菌株 B21-3 与全食副球菌(*Paracoccus pantotrophus* ATCC35512^T)在同一个分支中, 序列相似性为 99.49%。根据此结果可初步鉴定菌株 B21-3 归属于副球菌属。

菌株 B21-3 在 LB 培养基平板上菌落呈淡粉色, 表面粘质, 边缘整齐, 易挑起。细胞形态为球形。革兰氏染色阴性, 不产芽孢, 无鞭毛。Biolog 测定结果显示, 菌株 B21-3 可利用的单糖包括 D-麦芽糖、D-海藻糖、蔗糖、D-松二糖、 α -D-葡萄糖、D-甘露糖、D-果糖、D-半乳糖、L-果糖; 醇类物质包括 D-山梨醇、D-阿拉伯醇、肌醇; 可利用氨基酸的种类包括 L-天冬氨酸、L-谷氨

酸、L-组胺、L-丝氨酸; 已糖酸包括果胶、D-半乳糖醛酸、D-葡萄糖酸、奎宁酸; 羧酸及酯和脂肪酸包括丙酮酸甲酯、D-乳酸甲酯、L-乳酸、L-苹果酸、溴-丁二酸、 γ -氨基-丁酸、 β -羟基-D,L-丁酸、乙酰乙酸、丙酸、乙酸、甲酸。在 pH 6.0 的 1%、4% NaCl 条件下均可进行生长。能够利用乳酸钠。利福霉素 SV、林肯霉素、硫酸四癸钠、四唑紫、四唑蓝、萘啶酮酸、氯化锂、丁酸钠反应呈阳性。经测定菌株 B21-3 的(G+C)mol%含量为 69.2 mol%。根据形态特征、生理生化特征、(G+C)mol%含量及 16S rRNA 基因系统发育分析, 菌株 B21-3 被鉴定为全食副球菌(*Paracoccus pantotrophus*)。

2.2 菌株 B21-3 的降解特性分析

2.2.1 吡啶的降解

菌株 B21-3 能以吡啶为唯一碳源和氮源生长, 图 2 显示了菌株 B21-3 在 32 °C、pH 7.0、吡啶无机盐培养基中的生长曲线和吡啶的降解情况。可见吡啶的降解和菌株的生长成正相关, 菌株培养的前 48 h 为快速生长阶段, 此时培养基中剩余吡啶浓度下降最快, 即吡啶被降解速度最快。随着 48 h 后菌株生长进入稳定期, 剩余吡啶浓度的下降也趋于平缓。

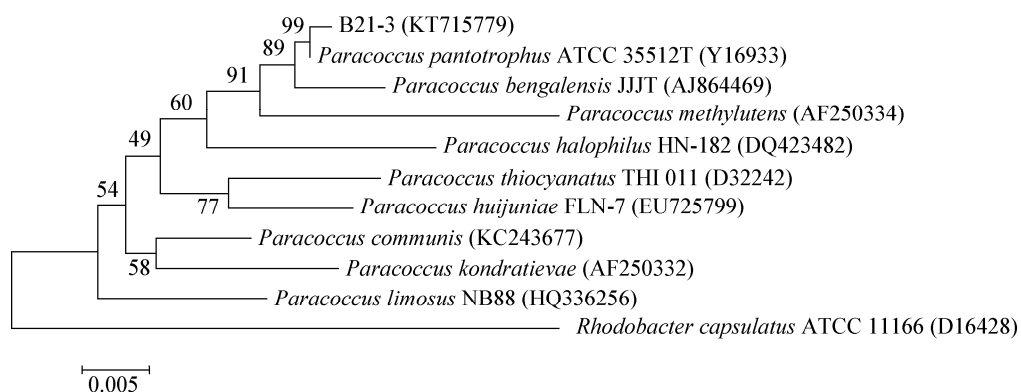


图 1 邻接法构建菌株 B21-3 及其相关菌株 16S rRNA 基因的系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences of strain B21-3 and related strains by Neighbor-Joining method

注: 括号内数字为 GenBank 登录号; 分支数表示 1 000 次 Bootstrap 重抽样分析的支持百分比; 图例 0.005 为遗传距离。

Note: The number in parentheses is the GenBank accession number; The number of branches indicates the percentage of support for 1 000 Bootstrap resampling analysis; The legend 0.005 is the genetic distance.

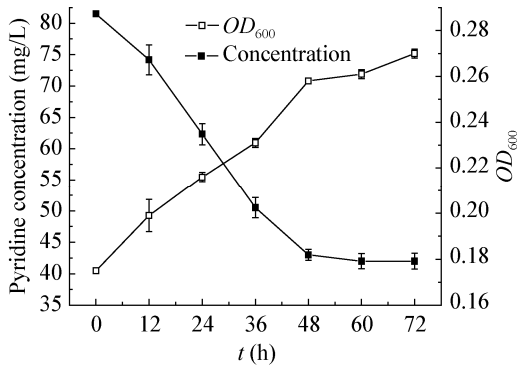


图2 菌株 B21-3 的生长曲线和吡啶的降解
Figure 2 The growth curve of the strain and degradation for pyridine

2.2.2 温度对菌株 B21-3 生长和吡啶降解的影响

从图 3 可以看出, 降解菌 B21-3 对温度有较宽的适应范围, 在 20–42 °C 之间生长良好, 尤其在 32 °C 时生长最佳, 此时对吡啶的去除效果也最好。

菌株 B21-3 在 32 °C 生长 72 h 后, 剩余吡啶浓度为 47.30±1.70 mg/L, 降解率达到 46.80%±1.91%。

2.2.3 pH 对菌株 B21-3 生长和吡啶降解的影响

从图 4 可以看出, 菌株 B21-3 能在 pH 6.0–8.0 的范围内生长, 在 pH 7.0 的条件下生长最好, 此时菌株对吡啶的降解效果最佳。菌株 B21-3 在 32 °C、pH 7.0 的条件下生长 72 h 后, 剩余吡啶浓度为 42.00±2.42 mg/L, 降解率达到 48.50%±2.97%。

2.2.4 驯化后菌株 B21-3 对吡啶的降解率

驯化后吡啶降解菌 B21-3 对不同底物浓度的降解能力得到显著提高, 如图 5 所示, 吡啶浓度为 100、300、500、700 和 900 mg/L 条件下, 96 h 时未驯化菌株 B21-3 对吡啶的降解率分别为 58.95%±5.40%、33.86%±3.10%、30.10%±4.50%、26.10%±3.40% 和 22.40%±2.05%, 驯化后菌株 B21-3 对吡啶的降解率分别为 90.62%±1.70%、75.00%±5.40%、

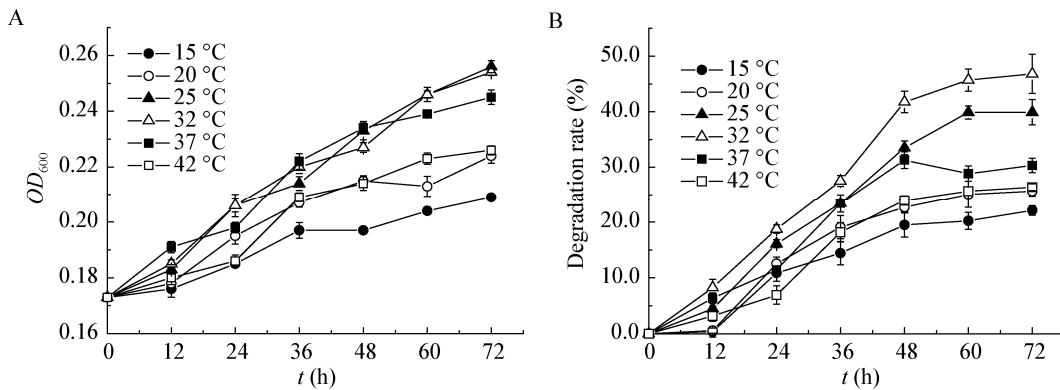


图3 温度对菌株 B21-3 生长(A)和吡啶降解率(B)的影响
Figure 3 Effect of temperature on growth (A) and degradation (B) of strain B21-3

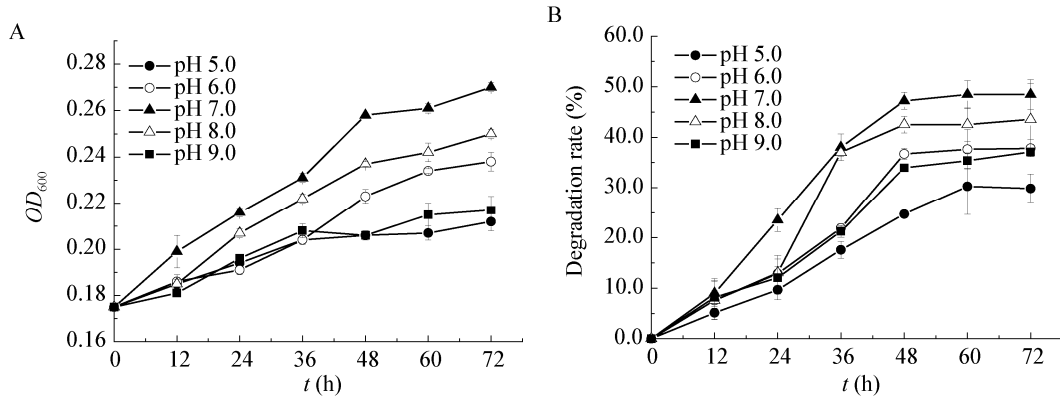


图4 pH 对菌株 B21-3 生长(A)和吡啶降解率(B)的影响
Figure 4 Effect of initial pH on growth (A) and degradation (B) of strain B21-3

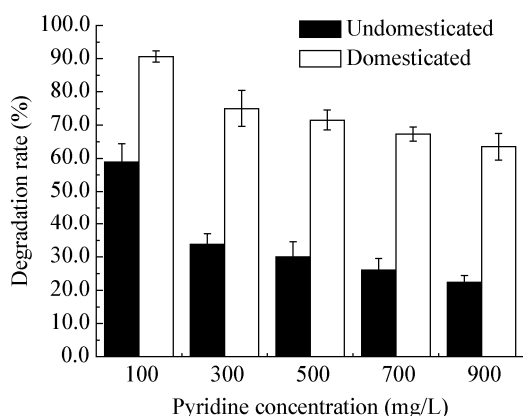


图5 驯化对菌株 B21-3 降解吡啶的影响

Figure 5 Effect of domesticated on degradation of strain B21-3

71.50%±3.00%、67.30%±2.10%和 63.50%±4.00%，对相应浓度下驯化前后菌株对吡啶的降解率进行统计分析显示 P 值均小于 0.01，说明驯化前后菌株对吡啶的降解能力差异极显著。驯化显著提高了菌株对吡啶的耐受性。

2.2.5 菌株传代培养对降解率的影响

驯化后的降解菌株 B21-3 在含有吡啶的无机盐培养基中进行传代，15 代后测定降解率，结果显示未传代菌株的降解率为 90.62%±1.70%，15 代后菌株的降解率为 89.39%±2.03%，说明菌株 B21-3 对吡啶的降解具有稳定性。

3 讨论与结论

吡啶作为重要的工业原料被广泛使用的同时，对环境的污染也日益严重。生物降解作为吡啶的主要降解方式备受人们关注。目前已分离出多株可有效降解吡啶的菌株，但是关于具有降解吡啶能力的全食副球菌尚未见相关报道。本研究分离到可降解吡啶的菌株 B21-3，通过 16S rRNA 基因序列分析和生化实验，鉴定该菌株为全食副球菌。研究显示全食副球菌具有脱色^[22]、产生抗菌物质^[23]等能力，因此全食副球菌 B21-3 的发现为吡啶的生物降解提供了新资源。

该菌株是从处理药厂废水为主的污水处理厂活性污泥中筛选得到的，这可能与细菌对环境存在物质的趋化性有关，主要是细菌在适应外界环境的

过程中会由于物质的变化改变自身的代谢需求，增强其对环境中化学物质的利用能力^[24]。研究结果显示，pH 对吡啶降解菌株的生长与降解能力的影响都表现出先增加后降低的效果，这是由于偏酸或偏碱时会使酶的分子结构受到破坏，导致菌株利用物质的能力下降、降解率降低。吡啶降解菌 B21-3 在中性及碱性条件下降解能力明显优于酸性条件，芽孢杆菌属、微球菌属菌株降解吡啶时也有同样现象，这可能是因为吡啶降解过程中产生的酸性物质使 pH 下降，不利于降解菌株的代谢^[25-26]。菌株的降解能力除跟自身的特性有关外，经过逐步增加底物浓度对菌株进行驯化也可增强其降解能力。驯化后菌株在吡啶浓度为 100 mg/L 时降解率达到 90.62%±1.70%，比驯化前提高了近 1 倍，这不仅满足了制药厂废水正常负荷时处理的需求，同时也提高了菌株对高浓度吡啶冲击的耐受性。驯化过程显示在高浓度吡啶存在下菌体生长和降解率都有所下降，这可能是因为吡啶浓度过高超过了菌体承受能力范围，阻碍了菌体对吡啶的降解^[6]。目前关于吡啶降解菌的降解稳定性鲜有报道，本研究将菌株 B21-3 传代 15 代后，其对吡啶的降解率基本不下降，说明该菌株对吡啶降解具有遗传稳定性。

综上所述，全食副球菌 B21-3 可有效降解难降解有机污染物，而且具有降解稳定性，该菌株可作为吡啶污染水体生物修复的潜在资源。

REFERENCES

- [1] Zhao QX, Lin Z, Zhang T. Strategies for treatment of bio-refractory organic pollutants[J]. Environmental Protection of Chemical Industry, 1995, 15(5): 276-279 (in Chinese)
赵庆祥, 林喆, 张彤. 生物难降解有机污染物的治理对策[J]. 化工环保, 1995, 15(5): 276-279
- [2] Zhuo M, He CD, Liu WH. Purification of refractory pyridine waste gas by anoxic denitrification[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2017, 11(12): 6345-6350 (in Chinese)
卓猛, 何成达, 刘伟慧. 利用反硝化法净化难降解吡啶废气[J]. 环境工程学报, 2017, 11(12): 6345-6350
- [3] Jin TT, Ren JH, Zhang H, et al. Identification and characterization of a pyridine degrading bacterium[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2016, 25(7): 1217-1224 (in Chinese)
晋婷婷, 任嘉红, 张晖, 等. 一株吡啶高效降解菌的鉴定及其降解特性[J]. 生态环境学报, 2016, 25(7): 1217-1224

- [4] Yi X, Zhong J. Biodegradation of pyridine and quinoline by two *Pseudomonas* strains[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(8): 1087-1097
- [5] Liu JJ, Chen LJ, Xiong RL, et al. Physiological and biochemical characteristics of a pyridine-degrading bacterial strain[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis*, 2008, 44(6): 983-986 (in Chinese)
刘江江, 陈吕军, 熊瑞林, 等. 一株吡啶降解菌的生理生化特性研究[J]. *北京大学学报: 自然科学版*, 2008, 44(6): 983-986
- [6] Chen P, Yan JB, Yu YD. Screening of a pyridine-degrading strain and its biodegradation capability[J]. *Environmental Protection of Chemical Industry*, 2015, 35(6): 566-570 (in Chinese)
陈佩, 颜家保, 余永登. 一株吡啶降解菌的筛选及其降解性能[J]. *化工环保*, 2015, 35(6): 566-570
- [7] Sun JQ, Xu L, Tang YQ, et al. Degradation of pyridine by one *Rhodococcus* strain in the presence of chromium (VI) or phenol[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 191(1/3): 62-68
- [8] Padoley KV, Mudliar SN, Pandey RA. Microbial degradation of pyridine and α -picoline using a strain of the genera *Pseudomonas* and *Nocardia* sp.[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2009, 32(4): 501-510
- [9] Deng XQ, Wei CH, Ren Y, et al. Isolation and identification of *Achromobacter* sp. DN-06 and evaluation of its pyridine degradation kinetics[J]. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2011, 221(1/4): 365-375
- [10] Shen JY, Zhang X, Chen D, et al. Characteristics of pyridine biodegradation by a novel bacterial strain, *Rhizobium* sp. NJUST18[J]. *Desalination and Water Treatment*, 2015, 53(7): 2005-2013
- [11] Zefirov NS, Agapova SR, Terentiev PB, et al. Degradation of pyridine by *Arthrobacter crystallopoietes* and *Rhodococcus opacus* strains[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1994, 118(1/2): 71-74
- [12] Sun JQ, Xu L, Tang YQ, et al. Degradation characteristics of pyridine and phenol by *Rhodococcus* sp. Chr-9[J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2012, 18(4): 647-650 (in Chinese)
孙纪全, 徐莲, 汤岳琴, 等. 红球菌 Chr-9 降解吡啶和苯酚的特性[J]. *应用与环境生物学报*, 2012, 18(4): 647-650
- [13] Mohan SV, Sistla S, Guru RK, et al. Microbial degradation of pyridine using *Pseudomonas* sp. and isolation of plasmid responsible for degradation[J]. *Waste Management*, 2003, 23(2): 167-171
- [14] Ma YF, Wang L, Shao ZZ. *Pseudomonas*, the dominant polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Antarctic soils and the role of large plasmids in horizontal gene transfer[J]. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(3): 455-465
- [15] Bai YH. Microbial degradation of pyridine and quinoline and bioaugmentation for their removal: characteristics and mechanisms[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Peking University, 2009 (in Chinese)
柏耀辉. 吡啶、喹啉微生物降解及生物强化去除的特性与机理[D]. 北京: 北京大学博士学位论文, 2009
- [16] Li YX, Zhao CH. Determination of main pollutants in coking wastewater by ultraviolet spectrophotometry[J]. *China Water & Wastewater*, 2001, 17(1): 54-56 (in Chinese)
李亚新, 赵晨红. 紫外分光光度法测定焦化废水的主要污染物[J]. *中国给水排水*, 2001, 17(1): 54-56
- [17] Edwards U, Rogall T, Blöcker H, et al. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17(19): 7843-7853
- [18] Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing[A]//Stackebrandt E, Goodfellow M. *Nucleic Acid Techniques in bacterial Systematics*[M]. New York: John Wiley & Sons, 1991: 115-175
- [19] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406-425
- [20] Dong XZ, Cai MY. *Common Bacteria System Classification and Appraisal Method*[M]. Beijing: Science Press, 2001: 62-63, 349-398 (in Chinese)
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: 62-63, 349-398
- [21] Mesbah M, Premachandran U, Whitman WB. Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1989, 39: 159-167
- [22] Santal AR, Singh NP, Saharan BS. A novel application of *Paracoccus pantotrophus* for the decolorization of melanoidins from distillery effluent under static conditions[J]. *Journal of Environmental Management*, 2016, 169: 78-83
- [23] Faridha BI, Mohankumar R, Jeevan M, et al. GC-MS analysis of bio-active molecules derived from *Paracoccus pantotrophus* FMR19 and the antimicrobial activity against bacterial pathogens and MDROs[J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2016, 56(4): 426-432
- [24] Jiang JD, Zhang RF, He J, et al. Bacterial chemotaxis to environmental pollutants and its significance in bioremediation[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(7): 1764-1771 (in Chinese)
蒋建东, 张瑞福, 何健, 等. 细菌对环境污染物的趋化性及其在生物修复中的作用[J]. *生态学报*, 2005, 25(7): 1764-1771
- [25] Wang SP, Tuo BH, Ma XF, et al. Study on isolation and degradation kinetics of pyridine-degrading bacterium[J]. *Fuel & Chemical Processes*, 2013, 44(6): 41-45 (in Chinese)
王书萍, 虞保华, 马雄风, 等. 吡啶降解菌的分离及降解动力学研究[J]. *燃料与化工*, 2013, 44(6): 41-45
- [26] Zhou M, Wang XH, Wei SB, et al. Strain isolation from the coking effluent and the degradation condition of pyridine by the strain[J]. *Fuel & Chemical Processes*, 2011, 42(2): 44-46, 49 (in Chinese)
周敏, 王小虎, 魏松波, 等. 焦化废水吡啶降解菌的筛选及降解条件[J]. *燃料与化工*, 2011, 42(2): 44-46, 49