

熊瑞林, 陈吕军, 刘江江. 2009 脱氮副球菌 W 12 降解吡啉的影响因素及其赋存质粒特性 [ J ]. 环境科学学报, 29(2): 252- 258

Xiong R L, Cheng L J, Liu J J. 2009. Pyridine degradation by *Paracoccus denitrificans* W 12 and the characteristics of its plasmids [ J ]. Acta Scientiae Circumstantiae 29(2): 252- 258

# 脱氮副球菌 W 12 降解吡啉的影响因素及其赋存质粒特性

熊瑞林, 陈吕军\*, 刘江江

清华大学环境科学与工程系, 北京 100084

收稿日期: 2008-04-14 修回日期: 2008-06-16 录用日期: 2008-12-31

**摘要:** 从实验室的废水生物处理反应器内的活性污泥样本, 筛选出来一株以吡啉为唯一碳、氮源的脱氮副球菌 (*Paracoccus denitrificans*), 命名为 W 12 研究了温度、pH 值、吡啉初始浓度和投菌量对 W 12 降解吡啉的影响. 结果显示, 在试验温度范围内高温有利于 W 12 降解吡啉; 同时 W 12 降解吡啉的最适 pH 值范围在 7~ 9. 吡啉初始浓度越大降解时间越长, 且投菌量越大吡啉降解越快. 此外还研究了 W 12 菌上赋存的质粒特性. 脉冲场试验表明, W 12 菌上 2 个质粒的大小分别为 169 kb 和 182 kb 并通过质粒消除试验证实了质粒参与了编码吡啉降解基因.

**关键词:** 脱氮副球菌; 吡啉; 生物降解; 质粒消除; 脉冲场电泳

文章编号: 0253-2468(2009)02-252-07 中图分类号: X 172 文献标识码: A

## Pyridine degradation by *Paracoccus denitrificans* W 12 and the characteristics of its plasmids

XIONG Ruilin, CHEN L jun\*, LIU Jiangjiang

Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084

Received 14 April 2008 received in revised form 16 June 2008 accepted 31 December 2008

**Abstract** A bacterial strain W 12, that could utilize pyridine as the sole source of carbon and nitrogen was isolated from an activated sludge reactor and identified as a strain of *Paracoccus denitrificans*. Its ability to degrade pyridine under different conditions was studied by adjusting temperature, pH, initial concentration of pyridine, and cell dosage. Higher temperature (from 25°C to 37°C) and higher cell dosage accelerated the degradation of pyridine and the optimum pH was 7~ 9. The degradation time increased as the initial concentration of pyridine increased or the cell concentration decreased. In addition, the characteristics of two plasmids in *P. denitrificans* W 12 were studied. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) showed that the molecular sizes of the plasmids were 169 kb and 182 kb. Plasmid elimination experiments showed that the plasmids might be involved in encoding the pyridine degradation gene.

**Keywords** *Paracoccus denitrificans*; pyridine biodegradation; plasmid curing; pulse field gel electrophoresis

### 1 引言 (Introduction)

吡啉作为一种含氮杂环化合物, 由于其具有难降解性, 有毒性, 致畸性而使得它成为环境中备受关注的一种污染物 (Padoley *et al.*, 2006). 较之难降解有机物的其它处理方法, 生物处理技术因其高效、无二次污染及低廉等特点成为一种有效的处理方法. 目前, 有多篇文献报道了吡啉的高效菌种法, 如 Sims 等 (1986) 从土壤中提取到一株降解吡啉的

藤黄微球菌; Lee 等 (1994) 比较研究了在悬浮状态和固定化状态下脂肪杆菌对吡啉的降解; Rhee 等 (1997) 从泥岩的氧化层中提取到一株吡啉的降解菌, 确定为诺卡氏菌 OS4. Padoley 等 (2006) 研究了一株假单胞菌在活性污泥中对吡啉的生物降解. 尽管对于吡啉的生物降解研究较多, 但对于吡啉的降解基因和降解质粒研究却较少, 仅有 Agapova 等 (1992) 通过质粒消除试验和转化试验证实了一株节杆菌属中的 2 个大小分别 100 Md 和 80 Md 的质

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (No. 2004AA649090, 2006AA06Z336)

Supported by the High-Tech Research and Development of China (No. 2004AA649090, 2006AA06Z336)

作者简介: 熊瑞林 (1986-), 女; \* 通讯作者 (责任作者), E-mail: chenlj@tsinghua.edu.cn

Biography: XIONG Ruilin (1986-), female; \* Corresponding author. E-mail: chenlj@tsinghua.edu.cn

粒参与了吡啶的降解; 另外, Mohan 等 (2003) 从一株假单胞菌中提取到一个质粒, 并将其转化到大肠杆菌 DH 5 $\alpha$  中, 从而证实该质粒为吡啶的降解质粒。

本研究中拟考察不同温度、pH 值、吡啶初始浓度和投菌量条件下脱氮副球菌 W 12对吡啶的降解, 并在 W 12菌中提取到质粒, 通过脉冲场电泳试验确定质粒大小, 并通过质粒消除试验了解消除质粒后的菌株在降解吡啶的性能上的变化, 旨在了解质粒是否参与了编码吡啶的降解基因。

## 2 材料与方法 (Materials and methods)

### 2.1 菌种来源

从实验室的废水生物处理反应器内采集活性污泥样本, 以吡啶为唯一碳、氮源筛选出来一株细菌, 标号 W 12 经菌种鉴定, 为脱氮副球菌。

### 2.2 降解试验方法

投加菌制备: 向 100 mL 的 LB 液体培养基中接种 W 12 菌, 加入 50 L 的吡啶 (吡啶浓度大概为 500 mg L<sup>-1</sup>) 防止杂菌的污染及保持菌生长活力, 富集培养 36 h 菌液离心 (5000 r min<sup>-1</sup>, 5 min) 后, 用无菌水清洗 3 次, 以去除 LB 培养液及一些代谢产物和杂质, 再用 25 mL 的液体无机盐培养基重悬菌体, 制备成菌悬液。

降解实验过程: 各加 1 mL 的菌悬液至含有一定浓度吡啶的液体无机盐培养基中, 终体积为 100 mL 封口膜密封, 在 35°C, 180 r min<sup>-1</sup> 条件下振荡培养, 每隔一定时间取少量 (一般取 0.1 mL) 样品用 0.45  $\mu$ m 的滤膜过滤后, 对滤液进行分析测定。

### 2.3 分析方法

吡啶浓度通过高效液相色谱 (岛津 LC10ADVP, SPD10AVP UV-V is Detector; Diamonsil C18 色谱柱, 250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m) 测定。流动相为 V<sub>甲醇</sub>:V<sub>水</sub> = 4:1, 流速为 1 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>; 吡啶检测波长为 254 nm; 喹啉检测波长为 275 nm, 进样体积均为 10  $\mu$ L。

菌密度 OD<sub>602</sub> 用分光光度计测定。OD (optical density) 表示被检测物吸收掉的光密度, 以此来代表菌的生长情况。

投菌量以菌干重计。测定方法: 取 10 mL 制备好的菌悬液, 5000 r min<sup>-1</sup> 下离心 5 min 后倒掉上清液, 将装有底部菌体的离心管放在烘箱中, 在 105°C 下烘干后, 取出放在干燥器中冷却后称重, 再放入烘箱中, 反复称重直至恒重。结合 2.2 节降解实验过

程的制备, 投菌量  $M$  的计算如公式 (1) 所示。

$$M = \frac{(W_1 - W_2)}{V_1} \times \frac{V_2}{V_3} \quad (1)$$

式中,  $W_1$  为总重量 (g),  $W_2$  为离心管的空重量 (g),  $V_1$  为菌悬液的体积 (mL),  $V_2$  为投加到反应体系中的菌液体积 (mL),  $V_3$  为反应体系的终体积 (mL)。

### 2.4 质粒提取方法 (萨姆布鲁克等, 2002)

用 LB 培养基富集培养 W 12 菌 36 h 离心去上清后用 P1 溶液 (50 mmol L<sup>-1</sup> Tris base, pH 8.0, 10 mmol L<sup>-1</sup> EDTA; 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> RNase A) 溶解菌体; 加入 P2 溶液 (200 mmol L<sup>-1</sup> NaOH; 1% SDS), 轻柔颠倒混匀, 室温放置 5 min, 加入 P3 溶液 (3.0 mol L<sup>-1</sup> 乙酸钾, pH 5.5), 轻柔颠倒混匀, 冰浴 20 min 离心后取上清液, 用酚-氯仿抽提, 离心后取上清液, 用异丙醇沉淀 DNA, 离心后小心地倒出液体, 晾干后加入 70% 乙醇, 已去除沉淀的盐类, 离心后小心倒出液体, 晾干至乙醇挥发干净, 加入 TE 溶液 (10 mmol L<sup>-1</sup> Tris base, pH = 8.0, 1 mmol L<sup>-1</sup> EDTA) 溶解质粒 DNA。

### 2.5 脉冲场电泳

在分子生物学中, 琼脂糖凝胶电泳是一项常用的技术, 可是普通的琼脂糖凝胶电泳可分离的 DNA 的范围在 50 kb 之内, 而无法分离大片段的 DNA (Fangnan, 1978; Herschleb, 2007), 针对这一现象, Schwartz 等 (1983, 1984) 发明了脉冲场电泳, 其分离的片段最高可达到 10 Mb 脉冲电泳是在琼脂糖凝胶上外加正交的交变脉冲电场, 其方向、时间与电流大小交替改变, 每当电场方向发生改变, 大分子的 DNA 便滞留在爬行管内, 直至沿新的电场轴重新定向后, 才能继续向前移动, DNA 分子越大, 这种重排所需时间就越长。当 DNA 分子变换方向的时间小于脉冲周期时, DNA 就可以按其分子量大小分离开 (付晓燕等, 2006)。

本研究中脉冲电泳仪使用 Bio-Rad CHEF MAPPERTM XA。脉冲条件: 1% Agarose (Certified megabase agarose, Bio-Rad); 23:52 h 电泳, 120 角度, 6 V  $\cdot$  cm<sup>-1</sup>, 0.5  $\times$  TBE, 14°C。电泳完后取出胶, 用 SYBR-GOLD 染色 30 min, 在紫外透射仪上成像。

### 2.6 质粒消除及抗性试验

质粒作为独立于染色体之外的能够自主复制的遗传因子, 在细菌中广泛存在, 细菌的某些表型特征, 包括抗性、代谢能力、致病性、共生现象、接合转移等往往由质粒控制 (吴乃虎, 1998)。为了研究 W 12 菌赋存的质粒与 W 12 具有降解吡啶的能力之

间的关系,做了质粒消除试验.目前,质粒消除的常用方法有嵌合染料法和冻融法(姜恺等,2002),前者包括吡啶橙(Trevors 1986; Mesas *et al.*, 2004; 李钧敏等,2005)和溴化乙锭(Cramer *et al.* 1986), SDS法(Jungmann *et al.*, 1987; Mansi *et al.*, 2000).

质粒消除方法:实验采用吡啶橙和 SDS 分别作为消除剂对菌体进行质粒消除.首先,将菌富集培养后接种至一系列含有不同浓度消除剂的 LB 培养基内,放置于  $180 \text{ r} \cdot \text{m} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $35 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下的摇床内培养 48 h 将上述培养液分别平板划线接种至 LB 固体培养基上,在培养箱内  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  下培养 48 h 确定菌株能够在 LB 液体培养基内耐受消除剂的最高浓度.将能够耐受消除剂最高浓度的菌株再进行质粒提取实验,确定其质粒 DNA 是否被消除.

质粒消除后降解性能的比较:将质粒消除后的菌在 LB 培养基中富集培养后接种至含有  $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  吡啶的无机盐培养基中,放置于  $180 \text{ r} \cdot \text{m} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $35 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下的摇床内培养,每隔一定时间取样测吡啶浓度.

质粒消除后抗性的对比试验:将质粒消除后的菌划线至含有  $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的壮观霉素的 LB 固体培养基上,放置于  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  的恒温培养箱中.

### 3 结果 (Results)

#### 3.1 温度对 W 12 降解吡啶的影响

试验初始吡啶浓度为  $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,投菌量为  $0.047 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,分别在  $25$ 、 $30$ 、 $35$  和  $37^\circ\text{C}$  4 个不同温度下进行降解试验,做 3 组平行试验,并设有空白对照.图 1 表示不同温度下吡啶浓度随降解时间的变化,图 2 表示不同温度下 W 12 的菌密度  $\text{OD}_{602}$  随降

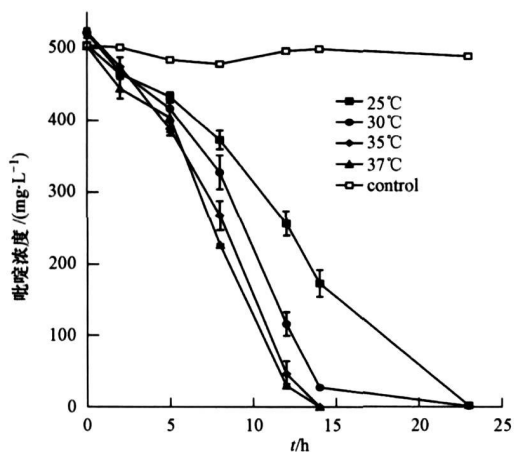


图 1 不同温度下 W 12 对吡啶降解影响

Fig. 1 Pyridine degradation by W 12 at different temperatures

解时间的变化.

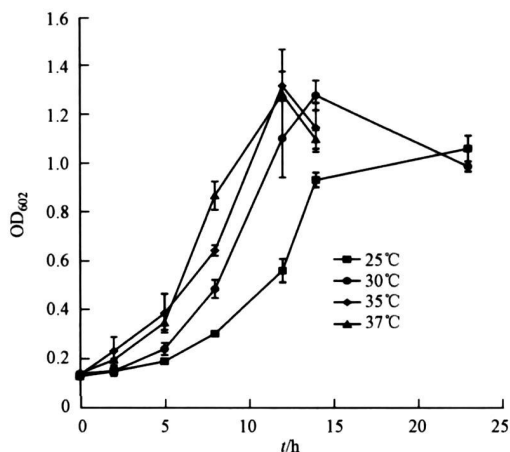


图 2 不同温度下 W 12 菌的生长曲线

Fig. 2 The growth curve of W 12 at different temperatures

由图 1 可以看出,在试验温度范围内,温度越高,越利于 W 12 菌降解吡啶.当温度为  $25^\circ\text{C}$  和  $30^\circ\text{C}$  时,经过 23 h 后  $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的吡啶降解完全;当温度为  $35^\circ\text{C}$  和  $37^\circ\text{C}$  时,只需 14 h 吡啶即可降解完全.这可能是因为高温较利于微生物的生长繁殖,从而能较快的降解目标污染物.由图 2 也可以证明,在试验温度范围内,温度越高,菌生长越快.当温度为  $35$ 、 $37^\circ\text{C}$  时,  $\text{OD}_{602}$  在 12 h 已增至最高值;当温度为  $30^\circ\text{C}$  时, 14 h  $\text{OD}_{602}$  增至最高,而温度为  $25^\circ\text{C}$  时,  $\text{OD}_{602}$  增长很慢.当然,不能无限制升高温度,微生物有生长的最适温度,再高会使菌致死.另外,一定时间后  $\text{OD}_{602}$  会下降(图 2),这是因为随着体系中吡啶的耗尽,没有可以利用的氮源来维持菌的生长繁殖,从而菌种进入衰退期.

#### 3.2 pH 对 W 12 降解吡啶的影响

试验初始吡啶浓度为  $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,投菌量为  $0.137 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,反应体系的 pH 值分别为 4、5、6、7、8、9、10(用 1% 的盐酸和  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NaOH 调节),设 3 组平行试验,并设有空白对照.图 3 表示不同 pH 下吡啶浓度随降解时间的变化,图 4 表示不同 pH 下 W 12 的菌密度  $\text{OD}_{602}$  随降解时间的变化.

由图 3 图 4 可以看出, W 12 菌比较利于在偏碱性环境下生长. pH 为 4、5 时,不论是  $\text{OD}_{602}$  还是吡啶浓度变化不大,即 W 12 在此环境下不生长也不能降解吡啶,这可能是过酸会破坏细胞内的电位和酶活所致. pH 为 6、7、8、9、10 时, W 12 均能生长.其中 pH 为 7、8、9 时, W 12 生长迅速,吡啶在 12 h 降解完全; pH 为 10 时,吡啶在 23 h 内降解完全,而 pH 为 6

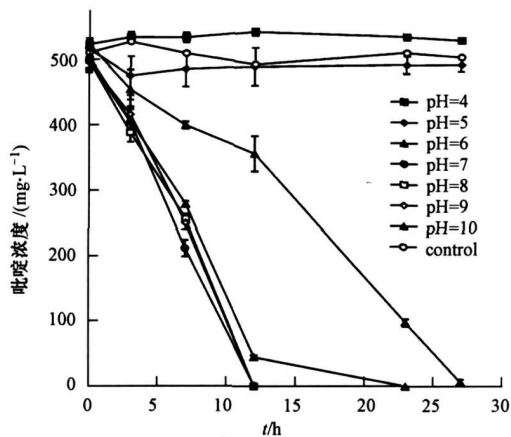


图3 不同 pH 下 W12 对吡啶的降解曲线图

Fig. 3 Pyridine degradation by W12 at different pH

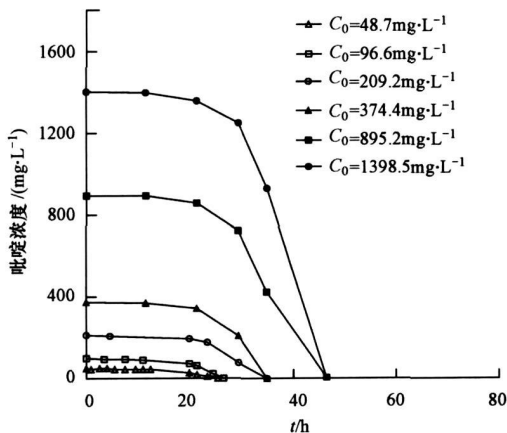


图5 不同吡啶初始浓度下 W 12对吡啶的降解曲线图

Fig 5 Pyridine degradation by W 12 at different initial concentrations of pyridine

大而增大。③吡啶初始浓度越高,抑制期的时间也就越长,但菌适应后,吡啶初始浓度越高,吡啶下降的速度也越快。

### 3.4 投菌量对 W 12 降解吡啶的影响

试验分为 3 组,其中 1、2、3 组的吡啶初始浓度经测定后分别为 374.4 mg·L<sup>-1</sup>、380.7 mg·L<sup>-1</sup>、367.9 mg·L<sup>-1</sup>,投菌后菌浓度分别为 0.310 g·L<sup>-1</sup>、0.886 g·L<sup>-1</sup>、1.690 g·L<sup>-1</sup>,结果如图 6 所示。从图 6 中可以看出,投菌量为 0.310、0.886、1.690 g·L<sup>-1</sup>时,降解相同量的吡啶所需的降解时间分别为 36.1、29.9、26.5 h 这说明投菌量越大吡啶降解越快。

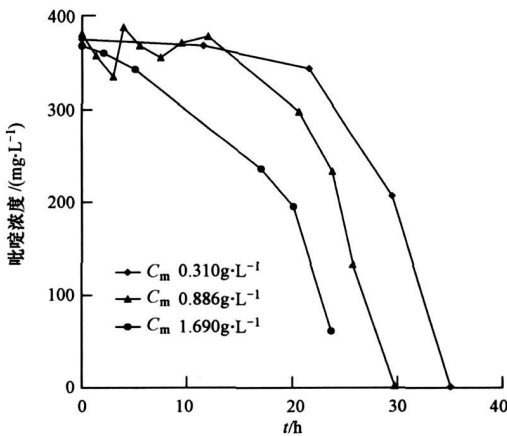


图6 不同投菌量下 W 12对吡啶的降解曲线图

Fig 6 Pyridine degradation by W 12 at different cell concentrations

### 3.5 脉冲场电泳图

试验结果如图 7 所示,其中第 1 道是 DNA 的标

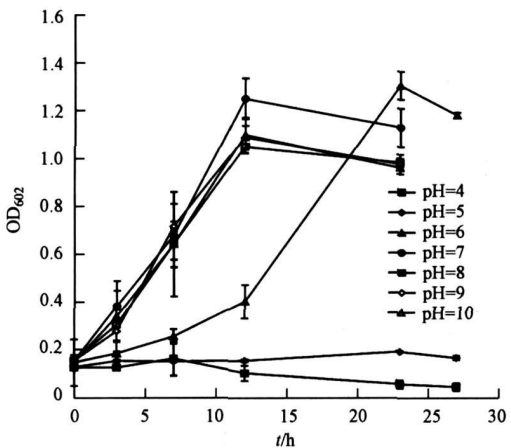


图4 不同 pH 下 W12 菌的生长曲线

Fig. 4 Growth curve of W12 at different pH

时,27 h 吡啶降解完全。这说明, W 12 降解吡啶的最适 pH 值在 7~9 的范围内。

### 3.3 吡啶初始浓度对 W 12 降解吡啶的影响

试验分为 6 组,吡啶初始浓度 (C₀) 分别为 48.7、96.6、209.2、374.4、895.2、1398.5 mg·L<sup>-1</sup>,投菌量为 0.310 g·L<sup>-1</sup>,W 12 菌对吡啶的降解过程结果如图 5 所示。

从图 5 中可以看出:①W 12 对吡啶的降解初期存在一个延滞期,这是因为在 LB 培养基里扩大培养 W 12 时未加入少量的吡啶,使得 W 12 从 LB 转接到无机盐培养基时,由于环境的变化,导致 W 12 需要一定的适应期,而图 1 和图 3 中由于 LB 中加入了吡啶,不存在适应期。②当吡啶初始浓度为 48.7 mg·L<sup>-1</sup> 时,吡啶的降解时间为 26.7 h 当吡啶初始浓度为 1398.5 mg·L<sup>-1</sup> 时,吡啶的降解时间为 48.9 h 这说明,吡啶的降解时间随着吡啶初始浓度的增

准品 marker(M idRange PFG M arker I NEB), 第 2道是 W 12 由图 7 可以发现, W 12 共有 2 个质粒, 其分子量分别为 169 kb, 182 kb.

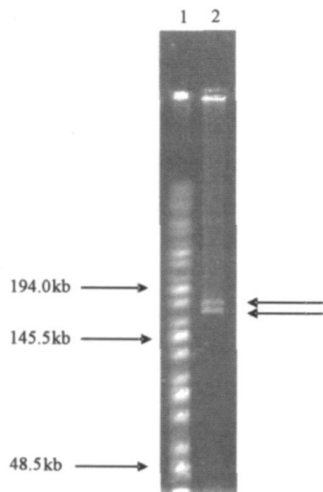


图 7 W 12 脉冲场电泳图

Fig 7 Pulsed field gel electrophoresis of the DNA extracted from W 12

### 3.6 质粒消除及抗性试验结果

为了研究 W 12 菌上的 2 个大质粒在 W 12 降解吡啶过程中所起的作用, 分别用吡啶橙和 SDS 对 W 12 菌进行质粒消除试验. 吡啶橙浓度为  $900.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , SDS 浓度为  $160.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 对处理后的 W 12 菌再培养, 再次提取质粒, 确定质粒已被消除, 结果如图 8 所示. 图中, 1 道为原菌 W 12, 2 道为吡啶橙消除后的 W 12, 3 道为 SDS 消除后的 W 12. 由图

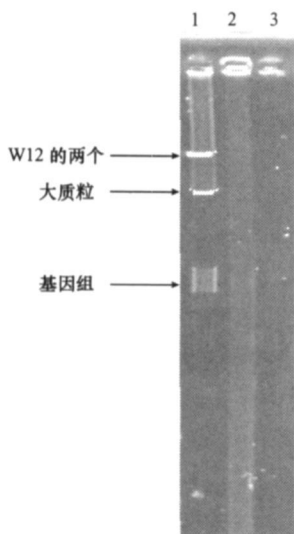


图 8 质粒消除前后 W 12 菌 DNA 电泳结果比较

Fig 8 Comparison of agarose gel electrophoresis before and after plasmid elimination from W 12

8 可以看出, 第 1 道中有 W 12 的 2 条大质粒条带, 而在 2 道和 3 道中却没有这 2 条条带, 说明经过吡啶橙和 SDS 处理后, W 12 菌的 2 个大质粒均已消除.

经吡啶橙和 SDS 消除后的 W 12 菌降解吡啶和野生菌降解吡啶能力的试验结果见图 9. 从图中可以看出, 野生菌在 1 d 就能将  $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的吡啶降解完全, 而经吡啶橙和 SDS 消除的菌与野生菌相比不能较好地利用吡啶, 8 d 后吡啶浓度才有一些下降. 在反应过程中监测了部分菌密度的  $\text{OD}_{600}$ , 如表 1 所示, 从表 1 中可以看出, 经吡啶橙和 SDS 消除的菌在反应过程中并未增长繁殖, 且空白对照在 8 d 后吡啶浓度也有一些下降; 这说明, 吡啶浓度的下降并不是由质粒消除后的 W 12 菌降解的, 可能是由于挥发或别的损失造成的. W 12 菌的质粒消除试验说明, W 12 降解吡啶的能力可能与其含有的 2 个质粒有关.

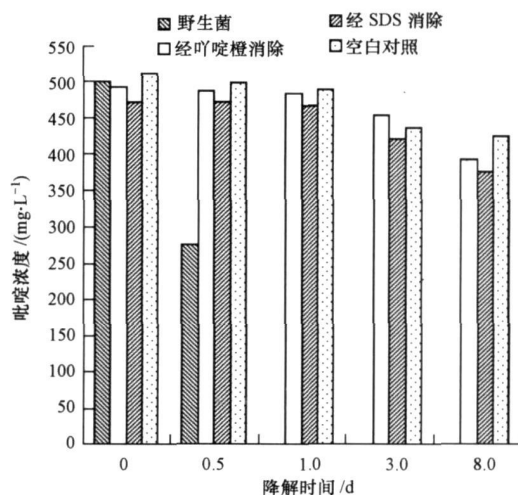


图 9 质粒消除前后降解性能的比较

Fig 9 Comparison of pyridine biodegradation between wild strain W 12 and the plasmid-eliminated strain

表 1 质粒消除后降解试验过程中菌密度的变化

Table 1 Comparison of  $\text{OD}_{600}$  between the wild strain and the plasmid-eliminating strain of the W 12

时间 /d	经吡啶橙消除后的菌密度	经 SDS 消除后的菌密度
0	0.166	0.153
0.5	0.092	0.087
1.0	0.074	0.068
8.0	0.008	0.007

表 2 表示的是 W 12 质粒消除前后抗性试验对比结果. 由表 2 可以看出, 质粒消除后的菌仍然能在含有壮观霉素的固体培养基上生长, 说明 W 12 编码

该抗性的基因不在质粒上; 而原本 W 12可以在含有潮霉素的固体培养基上生长, 质粒消除后却不能在含有潮霉素的固体培养基上生长, 这说明质粒上含有编码该抗性的基因. 这个结果可以用作 W 12质粒转化试验的一个平板筛选条件.

表 2 W 12质粒消除前后抗性试验

Table 2 Comparison of antibiotic resistance between the wild strain and the plasmid-eliminated strain

抗生素	浓度 / ( $\text{mg L}^{-1}$ )	W 12	质粒消除 后的 W 12
头孢	100.0	-	
氯霉素	100.0	-	
壮观	200.0	+	+
卡那	100.0	-	
羧苄	100.0	-	
利福平	100.0	-	
潮霉素	100.0	+	-
四环素	100.0	-	
氨基	100.0	-	

注: + 表示生长; - 表示不生长

#### 4 讨论 (Discussion)

通过研究温度、pH、目标污染物初始浓度和投菌量等 4 个因素对 W 12菌降解吡啉的影响, 获得了该吡啉降解菌的降解性能. 与已有文献报道的吡啉降解菌比较发现, W 12菌具有较强的降解吡啉的能力. Rhee 等 (1996) 研究了一株脂肪杆菌 (*Pimelobacter*), 在  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $170\text{ r min}^{-1}$  条件下, 其完全降解  $474\text{ mg L}^{-1}$  的吡啉需要 40 h 以上; Mohan 等 (2003) 研究了一株假单胞菌 (*Pseudomonas*) 对吡啉的降解, 在  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $150\text{ r min}^{-1}$  条件下, 其完全降解  $750\text{ mg L}^{-1}$  吡啉需要近 120 h 而 W 12菌在  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $180\text{ r min}^{-1}$  条件下, 降解浓度高达  $1398.5\text{ mg L}^{-1}$  的吡啉仅需 48.9 h 此外, 研究结果显示, W 12 菌适应能力较强, 能在较宽泛的温度和 pH 条件下生长代谢.

目前, 虽然研究人员已发现多株以吡啉为唯一碳、氮源的降解菌株, 但仍未解析吡啉的代谢酶及其调控基因——降解基因. 相对于基因组, 细菌所携带的质粒 DNA 较小, 且往往控制着某些表型特征, 包括抗性、代谢能力、致病性、共生现象、接合转移等 (吴乃虎, 1998); 对于环境污染治理而言, 最有价值的是代谢质粒, 又名降解质粒 (degradative plasmid), 其上含降解某些基质的酶的基因, 可以将

复杂的有机物降解成能被其作为碳源和能源利用的简单形式 (Van *et al.*, 2002). 因此, 研究人员试图发现吡啉的降解质粒, 从而迅速定位吡啉的降解基因. Mohan 等 (2003) 报导从一株吡啉降解菌中提取一个质粒, 并将其化学转化至大肠杆菌 DH 5 $\alpha$  中, 使受体菌能够降解吡啉, 但该研究未对这个质粒的特性, 如质粒 DNA 大小、功能测序、遗传稳定性等进行深入研究. 本研究中从 W 12 菌中提取到 2 个质粒, 通过质粒脉冲场电泳确定 2 个质粒均在 150 kb 以上, 将这 2 个质粒从 W 12 菌细胞内消除后, 发现质粒消除株不再能降解吡啉, 说明这 2 个质粒参与了 W 12 降解吡啉的过程; 然而, 这还不能充分证明这 2 个质粒上带有整套的吡啉降解基因, 有待于进一步的转化试验加以证实.

总之, 脱氮副球菌 W 12 能够高效的降解吡啉, 且生长环境不苛刻, 可作为高效降解菌应用于反应器中处理含吡啉的难降解废水, 还可以投加到泥浆 (刘江江 等, 2006) 和土壤体系进行生物修复. 另外, 如果能够证实 W 12 菌的 2 个质粒为降解质粒, 可以将它们转化到可降解其它底物 (如污染环境中常与吡啉共存的苯酚和喹啉) 的细菌中, 则可以得到具有多种降解功能的基因工程菌.

#### 5 结论 (Conclusions)

1) 在试验温度范围内, W 12 菌对吡啉的降解率随着温度的提高而增大, 高温有利于 W 12 的生长, 从而使得 W 12 能更好的降解吡啉.

2) pH 值对 W 12 菌降解吡啉有影响, 在 pH 值为 4.5 的酸性环境中, W 12 菌基本不生长, 也不利用吡啉; W 12 降解吡啉的最适 pH 值范围为 7~9.

3) 吡啉的降解时间随着吡啉初始浓度的增大而增大.

4) 当投菌量分别为  $0.310$ 、 $0.886$ 、 $1.690\text{ g L}^{-1}$  时, 降解相同浓度的吡啉所需的降解时间分别为  $36.1\text{ h}$ 、 $29.9\text{ h}$ 、 $26.5\text{ h}$  这说明投菌量越大, 吡啉降解越快.

5) W 12 质粒的脉冲场电泳试验发现 W 12 的 2 个质粒大小分别在 169 kb 和 182 kb.

6) 质粒消除试验说明, W 12 菌的质粒参与了编码吡啉降解基因, 同时抗性试验说明质粒消除后 W 12 不再能在含有潮霉素的无机盐平板上生长. 这一现象可以作为日后转化试验的筛选条件之一.

**责任作者简介:** 陈吕军 (1965—), 男, 工学博士, 清华大学环境科学与工程系教授, 博士生导师. 浙江省有突出贡献的中年专家, 中华全国青年联合会第十届委员会委员. 致力于污水生物处理新技术的开发与应用研究和企业生态工程及工业园区循环经济的研究.

#### 参考文献 (References):

- Agapova S R, Andreeva A L, Starovoitov I *et al.* 1992 Plasmids for biodegradation of 2,6-dimethylpyridine, 2,4-dimethylpyridine and pyridine in strains of *Athrobacter* [J]. *Molecular Microbiology* (5-6): 10—13
- Cramer R, Davies J E, Hutner R. 1986. Plasmid curing and generation of mutations induced with ethidium-bromide in streptomycetes [J]. *Journal of General Microbiology*, 132: 819—824
- Fang X W L. 1978. Separation of very large DNA molecules by gel electrophoresis [J]. *Nucleic Acids Res* 5: 653—665
- 付晓燕, 胡克兴, 范黎. 2006 脉冲场凝胶电泳技术及其在真菌学研究中的应用 [J]. *微生物学通报*, 33 (1): 144—148
- Fu X Y, Hu K X, Fan L. 2006 Pulsed Field Gel Electrophoresis and Its Application in Fungi [J]. *Microbiology*, 33 (1): 144—148 (in Chinese)
- Herschleb J, Ananiev G, Schwartz D C. 2007 Pulsed-field gel electrophoresis [J]. *Nature Protocols* 2 (3): 677—684
- 萨姆布鲁克 J 拉塞尔 D W. 2002 分子克隆实验指南 (第3版) [M]. 北京: 科学出版社, 26—32
- Sambrook J, Russell D W. 2002 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (The 3rd ed.) [M]. Beijing: Science Press, 26—32 (in Chinese)
- Jungmann D M, Ferreira L C D. 1987 Plasmid Curing of *Escherichia Coli* and *Salmonella-Typhimurium* by Treatment with Sodium Dodecylsulfate and High-Temperature Incubation [J]. *Revista De Microbiologia* 18 (2): 178—183
- Lee S T, Rhee S K, Lee G M. 1994 Biodegradation of Pyridine by Freely Suspended and Immobilized *Pimobacter Sp* [J]. *Appl Microbiol Biot* 41 (6): 652—657
- 李钧敏, 金则新. 2005 两株有机物降解菌株质粒特性的研究 [J]. *中国环境科学*, 25 (4): 403—407
- Li J M, Jing Z X. 2005. Studies on the character of plasmids in two organism degrading bacteria strains [J]. *China Environmental Science*, 25 (4): 403—407 (in Chinese)
- 刘江江, 陈吕军, 温东辉, 等. 2006 泥浆体系中吡啶的生物降解研究 [J]. *生态环境*, 15 (6): 1180—1184
- Liu J J, Chen L J, Wen D H, *et al.* 2006. Biodegradation of pyridine in the slurry system [J]. *Ecology and Environment* 15 (6): 1180—1184 (in Chinese)
- 姜恺, 班睿, 赵学明. 2002 细菌质粒的消除 [J]. *微生物学通报*, 29 (5): 99—103
- Lou K, Ban R, Zhao X M. 2002 Plasmid curing in bacteria [J]. *Microbiology*, 29 (5): 99—103 (in Chinese)
- Mansi E M, Karen J, Craig A I. 2000. Isolation and curing of the *Klebsiella pneumoniae* large indigenous plasmid using sodium dodecyl sulphate [J]. *Res Microbiol* 151: 201—208
- Mesas J M, Rodriguez M C, Alegre M T. 2004 Plasmid curing of *Oenococcus oeni* [J]. *Plasmid* 51 (1): 37—40
- Mohan S V, Sistla S, Guni R K, *et al.* 2003. Microbial degradation of pyridine using *Pseudomonas sp* and isolation of plasmid responsible for degradation [J]. *Waste Manage*, 23 (2): 167—171
- Padoley K V, Rajvardya A S, Subbarao T V, *et al.* 2006 Biodegradation of pyridine in a completely mixed activated sludge process [J]. *Bioresour Technol* 97 (10): 1225—1236
- Rhee S K, Lee G M, Lee S T. 1996 Influence of a supplementary carbon source on biodegradation of pyridine by freely suspended and immobilized *Pimobacter sp* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol* 44: 816—822
- Rhee S K, Lee K Y, Chung J C, *et al.* 1997 Degradation of pyridine by *Nocardioles sp* strain OS4 isolated from the oxic zone of a spent shale column [J]. *Can J Microbiol* 43 (2): 205—209
- Schwartz D C. 1983 New techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packaging [J]. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 47: 189—195
- Schwartz D C, Cantor C R. 1984 Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis [J]. *Cell* 37: 67—75
- Schwartz D C, Smith L C, Baker M, *et al.* 1989. ED pulsed electrophoresis instrument [J]. *Nature* 334: 575—576
- Sims G K, Sammers L E, Konopka A. 1986 Degradation of Pyridine by *Micromycoccus-Luteus* Isolated from Soil [J]. *Appl Environ Microb* 51 (5): 963—968
- Trevors J T. 1986. Plasmid Curing in Bacteria [J]. *Fems Microbiology Reviews* 32 (3-4): 149—157
- Van Elsland J D, Bailey M J. 2002. The Ecology of Transfer of Mobile Genetic Elements [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 42 (2): 187—197
- 吴乃虎. 1998 基因工程原理 (第2版) [M]. 北京: 科学出版社, 176—179
- Wu N H. 1998. *Genetic engineering principle* (The 2nd ed) [M]. Beijing: Science Press, 176—179 (in Chinese)