

睾丸酮丛毛单胞菌对喹啉类化合物的降解^{*}

崔明超¹ 陈繁忠¹ 傅家谟¹ 盛国英¹ 孙国平² 蔡小伟²

(1 中国科学院广州地球化学研究所, 有机地球化学国家重点实验室, 广州, 510640;

2 广东省微生物研究所, 广州, 510070)

摘 要 对喹啉、异喹啉、2-甲基喹啉、3-甲基喹啉、4-甲基喹啉和 6-甲基喹啉在睾丸酮丛毛单胞菌 (*Comamonas testosteroni* Q₁₀) 作用下的降解及底物之间的相互作用进行研究。结果表明, 喹啉和 3-甲基喹啉不仅能有效地被降解, 而且细菌也有明显的生长, 而其它化合物虽有部分降解但没有观察到细胞生长。底物初始浓度的增加对菌 Q₁₀ 有一定抑制作用。喹啉的存在对其它化合物的降解具有不同的促进效应, 其中尤以 6-甲基喹啉和 4-甲基喹啉最为明显, 能在较短时间内得到完全去除, 而在各二元体系中喹啉的降解受到这些化合物的抑制作用。

关键词 生物降解, 喹啉, 睾丸酮丛毛单胞菌 Q₁₀。

喹啉类化合物是多种工业废水尤其是焦化废水中常见的污染物。生物降解是目前治理喹啉类化合物污染的重要手段, 目前已从自然界分离得到一些能够降解喹啉类化合物的菌株^[1-3]。这些菌株通常只能对一种化合物起作用, 而被污染环境中的喹啉类化合物通常都以多组分混合物形式存在, 因此, 分离得到一种广谱的高效菌种, 并研究喹啉类化合物在降解过程中的相互作用具有重要的实际意义。

我们从油制气厂废水的活性污泥中分离到一株细菌 Q₁₀, 该菌可以利用喹啉作为唯一碳源和能源。本文研究了该菌对不同浓度水平的喹啉、3-甲基喹啉、4-甲基喹啉和 6-甲基喹啉以及异喹啉、2-甲基喹啉的降解, 并探讨了喹啉存在时对其它化合物降解的影响。

1 材料与方法

1.1 培养基

底物培养基: MgSO₄·7H₂O 0.2g·L⁻¹, KH₂PO₄ 0.5g·L⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 0.5g·L⁻¹, K₂HPO₄ 1.5g·L⁻¹, pH= 7.0, 121℃湿热灭菌 20min; 1% 备用微量元素溶液; 底物 (喹啉、异喹啉、2-甲基喹啉、3-甲基喹啉、4-甲基喹啉、6-甲基喹啉)。

微量元素储备液: Na₂EDTA·2H₂O 12g·L⁻¹, FeSO₄·7H₂O 2.0g·L⁻¹, CaCl₂ 1.0g·L⁻¹, ZnSO₄·7H₂O 0.4g·L⁻¹, MnSO₄ 0.4g·L⁻¹, CuSO₄·5H₂O 0.1g·L⁻¹, Na₂MoO₄·2H₂O 0.1g·L⁻¹, 5ml 浓 H₂SO₄, pH= 7.0, 115℃湿热灭菌 15min。冷却后置于 4℃冰箱备用。

1.2 菌种的分离和鉴定

2003 年 1 月 17 日收稿。

^{*} 中国科学院知识创新工程前沿性研究项目 (001108)。

将某油制气废水的活性污泥样品接种到以一定浓度的喹啉作为唯一碳源的底物培养基中, 30℃振荡富集培养三周, 其间重复三次, 追加相同浓度的喹啉. 将培养物作梯度稀释, 涂布到以喹啉为唯一碳源的无机盐琼脂平板上, 挑取单菌落, 经营养琼脂平板纯化得到菌 Q₁₀. 用 16S rDNA 序列分析和法国生物梅里埃公司 API 系统的 API 20NE 试条两种方法鉴定. 菌 Q₁₀ 是一株革兰氏阴性杆菌, 呈乳白色, 圆形, 边缘整齐.

1.3 细菌悬浮液的制备

将菌种 Q₁₀ 接种在营养肉汤培养基中, 在 30℃, 120 r·min⁻¹ 振荡富集培养 24h, 10000 r·min⁻¹ 离心 10min, 收集菌体, 悬浮于灭菌蒸馏水中制成菌悬液. 此菌悬液用稀释营养琼脂平板 30℃培养 24h, 计数活菌, 得到的细菌悬浮液浓度为 1.9×10^9 个·ml⁻¹.

1.4 降解实验

取 1ml 菌悬液加入到含有 100ml 新鲜底物培养基的 250ml 三角烧瓶中, 在 30℃, 120 r·min⁻¹ 振荡培养, 每隔一段时间取样一次, 经 0.2μm 膜过滤除菌后测定底物的浓度. 实验中以未加菌的相同介质进行培养作为空白对照.

以喹啉作为第一底物, 异喹啉、2-甲基喹啉、3-甲基喹啉、4-甲基喹啉和 6-甲基喹啉分别作为第二底物, 用菌 Q₁₀ 分别对上述二元混合物进行降解.

1.5 分析方法

细胞浓度的变化用 600nm 处的吸光度值表示, 仪器为 Helios Alpha 紫外可见分光光度计 (Thermo Spectronic). 底物浓度用高压液相色谱法分析, 仪器型号为 HP1100, 色谱柱为迪马公司 DiamonsilTM C18 (150×4.6mm, 5μm), 流动相为甲醇: 水 = 70: 30 (V/V) (喹啉的检测为甲醇: 水 = 60: 40), 流速 1ml·min⁻¹, 检测波长为 225nm, 进样量 5 μl.

2 结果与讨论

2.1 羧基酮丛毛单胞菌对喹啉类化合物的降解

图 1 和图 2 分别给出了菌 Q₁₀ 在初始浓度为 50 mg·l⁻¹ 的喹啉、异喹啉、2-甲基喹啉、3-甲基喹啉、4-甲基喹啉和 6-甲基喹啉时, 各底物的浓度变化曲线和细菌生长曲线.

从图 1 和图 2 可以看出, 喹啉和 3-甲基喹啉可以快速完全降解, 细菌的浓度也有明显增加, 这表明菌 Q₁₀ 可以利用喹啉和 3-甲基喹啉作为唯一碳源和能源进行生长. 4-甲基喹啉和 6-甲基喹啉经过 72h 分别降解了 28.9% 和 52.5%, 但细菌却没有明显的生长. 异喹啉和 2-甲基喹啉则基本没有降解作用, 细菌也不能生长. 从图 2 还可以看出, 菌 Q₁₀ 对喹啉的降解速度比 3-甲基喹啉要快, 细菌生长也没有滞后期, 但是在降解 3-甲基喹啉时细菌的最终浓度要高于降解喹啉时的浓度, 说明相同浓度的 3-甲基喹啉的降解与喹啉相比为细菌提供了更多的碳源. 4-甲基喹啉和 6-甲基喹啉虽然在 72h 内均有一定程度的减少, 却没有细菌生长的现象, 说明它们不能作为唯一碳源和能源支持菌 Q₁₀ 生长. 而异喹啉和 2-甲基喹啉基本上不能被菌 Q₁₀ 降解, 这可能是因为喹啉降解菌在降解喹啉时一般都是首先进攻 2 位碳原子^[4], 而异喹啉和 2-甲基喹啉分子上的 2 位被氮原子和甲基所占据, 从而降低了被细菌进攻的机率.

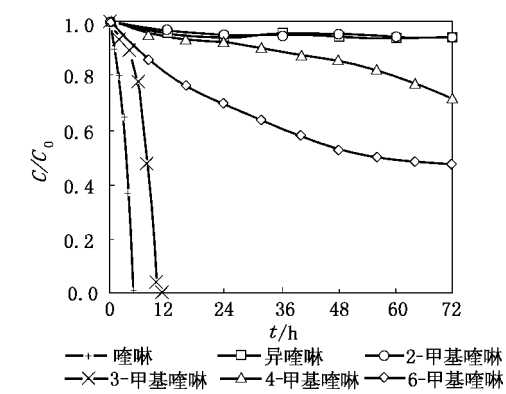


图1 菌 Q₁₀对不同喹啉类化合物的降解

Fig. 1 Degradation of quinoline and its derivatives by strain Q₁₀

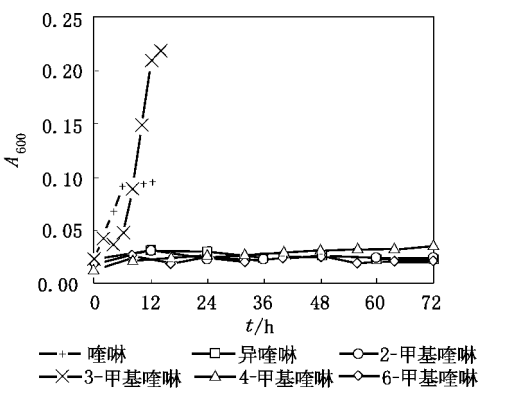


图2 菌 Q₁₀在不同底物上的生长曲线

Fig. 2 Growth curves of strain Q₁₀ on different substrates

2.2 睾丸酮从毛单胞菌对不同起始浓度喹啉类化合物的降解

表1 给出了不同初始浓度下, 菌 Q₁₀对其它底物的降解效果. 由表1可以看出, 菌 Q₁₀对喹啉的利用效率比较高, 对较大范围内的喹啉都能完全去除; 一定浓度范围内的3-甲基喹啉可以完全降解, 但随着浓度的增加, 降解速率也明显减小, 所需完全降解时间延长, 如 100mg·l⁻¹的3-甲基喹啉要比浓度为 50mg·l⁻¹的3-甲基喹啉慢 12h. 4-甲基喹啉与6-甲基喹啉在较低浓度时可以被有效降解, 但随着浓度的升高, 二者的降解速率迅速下降, 而4-甲基喹啉的去除率下降更明显, 当浓度由 25mg·l⁻¹增加到 50mg·l⁻¹时, 48h 的去除率由原来的 100% 减少到 14.9%, 72h 的去除率也仅为 28.9%, 说明高浓度的4-甲基喹啉对菌 Q₁₀具有较强的毒害作用.

表1 菌 Q₁₀对不同初始浓度的喹啉及其衍生物的降解结果

Table 1 Effect of initial concentration of quinoline and its derivatives on the removal efficiencies

底物	初始浓度/mg·l ⁻¹	浓度/mg·l ⁻¹ 降解率/%		浓度/mg·l ⁻¹ 降解率/%		浓度/mg·l ⁻¹ 降解率/%	
		6h		12h		24h	
喹啉	50	0	100	—	—	—	—
	100	21.4	78.6	0	100	—	—
	200	129.8	35.1	0	100	—	—
3-甲基喹啉	50	38.9	22.3	0	100	—	—
	100	91.0	9.0	59.2	40.8	0	100
	200	189.6	5.2	183.2	8.4	137.2	31.4
底物	初始浓度/mg·l ⁻¹	浓度/mg·l ⁻¹ 降解率/%		浓度/mg·l ⁻¹ 降解率/%		浓度/mg·l ⁻¹ 降解率/%	
		24h		48h		72h	
4-甲基喹啉	25	18.5	25.9	0	100	—	—
	50	46.2	7.7	42.6	14.9	35.6	28.9
	100	94.1	5.9	93.2	6.8	90.3	9.7
6-甲基喹啉	25	7.4	70.4	0.4	98.5	0.25	99.0
	50	34.7	30.7	26.6	46.8	23.8	52.5
	100	84.6	15.4	78.0	22.0	74.3	25.7

2.3 喹啉与其衍生物共存时底物的降解

图3—5分别给出了喹啉初始浓度为 $100\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ，异喹啉、2-甲基喹啉、3-甲基喹啉、4-甲基喹啉和6-甲基喹啉浓度均为 $50\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 时各二元体系中底物、喹啉的降解变化情况以及相应的细菌生长曲线。

比较图3与图1可以看出，在二元混合体系中，喹啉的存在对6-甲基喹啉和4-甲基喹啉的降解具有明显的促进作用，这表明菌 Q_{10} 利用这些二元混合物作为底物时发生了共代谢效应，喹啉的存在可以大大提高菌 Q_{10} 对其它化合物的降解能力。例如，6-甲基喹啉降解时72h的去除率为52.5%，喹啉存在时10h完全去除；4-甲基喹啉降解时72h的去除率仅为28.9%，喹啉存在时28h完全去除。喹啉的存在对异喹啉具有一定的促进作用，72h的去除率从6.1%提高到24.1%，是异喹啉降解去除率的近4倍，对2-甲基喹啉的降解影响较小，72h的去除率从5.9%变为9.7%。表明这两种化合物对菌 Q_{10} 的毒性作用较强，喹啉的加入虽然提高了它们的去除率，但并不能使它们完全去除。喹啉存在时对3-甲基喹啉降解的影响很小，这是因为菌 Q_{10} 能同时利用这两种化合物作为生长底物。

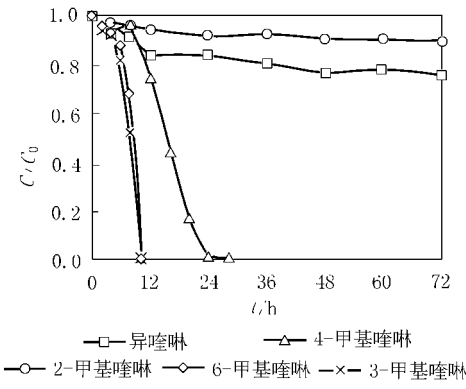


图3 喹啉存在时其衍生物的降解

Fig. 3 The degradation of its derivatives in the presence of quinoline

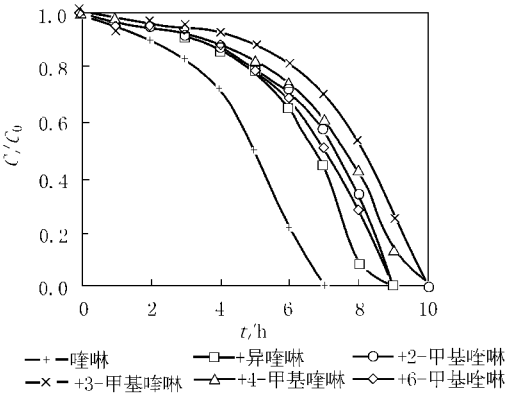


图4 喹啉衍生物存在时喹啉的降解

Fig. 4 The degradation of quinoline in the presence of its derivatives

由图4可知，在二元混合体系中喹啉的降解均受到抑制，降解速率明显下降，完全去除时间由7h增加到9h或10h。这是因为3-甲基喹啉与喹啉产生了竞争性抑制作用，而其它化合物对菌 Q_{10} 均有一定的毒性，它们的存在会使菌 Q_{10} 活性受到抑制。比较图5与图2可见，喹啉存在时细菌浓度明显比各化合物单独存在时提高，这是因为喹啉可以被细菌利用。与喹啉单质的生长曲线比较，除加入3-甲基喹啉的曲线外，其它曲线变化不明显，说明这四种化合物不能支持细菌的生长，但并不抑制细菌对喹啉的利用。在喹啉与3-甲基喹啉二元体系中，两者均可被细菌利用，所以最终细菌浓度显著提高。

综上所述，羧丸酮丛毛单胞菌可以快速有效地降解并利用喹啉和3-甲基喹啉作为唯一碳源和能源生长；缓慢转化4-甲基喹啉和6-甲基喹啉，对异喹啉和2-甲基喹啉仅有极弱降解能力。底物初始浓度的增加使菌 Q_{10} 对这些化合物降解效率下降。喹啉的存在对6-甲基喹啉和4-甲基喹啉的降解具有明显的促进作用，两种化合物能在较短时间内完全去除。异喹啉和2-甲基喹啉的降解效率得到改善，但仍不能完全降解。对3-甲基喹啉降解影响较小。喹啉在二元混合物体系中的降解受到不同程度的抑制。

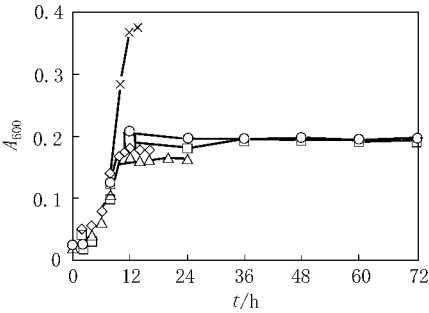


图 5 喹啉单质及其衍生物存在时的生长曲线

—+ 奎林 —□— 异喹啉 —○— +2-甲基喹啉
—*— +3-甲基喹啉 —△— +1-甲基喹啉 —◇— +6-甲基喹啉

Fig. 5 Growth curves of strain Q₁₀ on quinoline and in the presence of its derivatives

参 考 文 献

[1] HundH K, De Beyer A, Lingens F, Microbial Metabolism of Quinoline and Related Compounds VI Degradation of Quinaldine by *Arthrobacter* sp. [J]. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 1990, **371**: 1005—1008
[2] Ruger A, Schwartz G, Lingens F, Microbial Metabolism of Quinoline and Related Compounds. XIX. Degradation of 4 Methylquinoline and Quinoline by *Pseudomonas Putida* K1 [J]. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 1993, **374**: 479—488
[3] Rothenburger S, Atlas R M, Hydroxylation and Biodegradation of 6-Methyl quinoline by pseudomonads in aqueous and non aqueous immobilized cell bioreactors [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59**: 2139—2144
[4] Fetzer S, Tshisuaka B, Lingens F et al., Bacterial Dagradaion of Quinoline and Derivatives——Pathways and Their Biocatalysts. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1998, **37**: 576—597

BIODEGRADATION ABILITY OF QUINOLINE AND ITS DERIVATIVES BY *COMAMONAS TESTOSTERONI* Q₁₀ AND THE SUBSTRATES INTERACTIONS

CUI Ming-chao¹ CHEN Fan-zhong¹ FU Jia-mo¹ SHENG Guorying¹
SUN Guoping² CAI Xiaowei²

(1 State Key Laboratory of Organic Geochemistry, Guangzhou Institute of Geochemistry,

Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, 510640; 2 Guangdong institute of Microbiology, Guangzhou, 510070)

ABSTRACT

A bacterial strain Q₁₀ with the ability to degrade quinoline was isolated from activated sludge of a gas-generating wastewater and identified as *Comamonas testosteroni*. This paper focused on the study of the biodegradation ability of quinoline, 2-methylquinoline, 3-methylquinoline, 4-methylquinoline, 6-methylquinoline, isoquinoline and the substrates interactions. The results showed that quinoline and 3-methylquinoline can be effectively removed and they can stimulate the growth of strain Q₁₀ simultaneously. However, no apparent cell growth was observed during other substrates degradation though they can partly be degraded. The increase of initial concentration of the substrates had inhibitory effect on the activity of strain Q₁₀. The presence of quinoline can stimulate the degradation of other compounds to different degrees, in which the enhancement effects were significantly for the degradation of 6-methylquinoline and 4-methylquinoline and they can be completely removed in a short time. In all binary systems, however, the degradation of quinoline was inhibited.

Keywords: biodegradation, quinoline, *comamonas testosteroni* Q₁₀