

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
52(2):250-255; 4 February 2012
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

一株乙腈降解菌的鉴定及其生物学特性

李悦¹ 熊明华¹ 成小松² 孙晶¹ 臧海莲³ 潘俊波¹ 李春艳^{1*}

¹东北农业大学资源与环境学院 哈尔滨 150030

²哈尔滨医科大学第一临床医学院 哈尔滨 150001

³伊春林业科学院 伊春 153000

摘要: 【目的】明确乙腈降解菌 BX2 的分类地位及生物学特性,评价其处理含乙腈废水的可行性。【方法】通过形态特征、生理生化特性以及系统发育分析对菌株 BX2 进行鉴定。考察温度、初始 pH 及接种量等因素对菌株生长的影响,确定菌株的最佳生长条件及在该条件下的乙腈降解能力。测定菌株 BX2 对 NaCl 的耐受能力。【结果】乙腈降解菌 BX2 的形态特征及生理生化特性与紫红红球菌 (*Rhodococcus rhodochrous*) 最相近。其 16S rRNA、*gyrB*、*secA1* 基因序列与紫红红球菌的相似性分别为 99.37%、99.29%、97.87%。最佳生长条件为 35℃,初始 pH 7.5,接种量 1%。此条件下,菌株 BX2 在 16 h 内对浓度为 800 mg/L 乙腈的降解率为 95.87%。菌株 BX2 在 NaCl 含量高于 6% 的培养基中无法生长。【结论】菌株 BX2 被鉴定为紫红红球菌。该菌株有较强的环境适应能力,可降解高浓度乙腈,在含氰废水的生物修复中有很好的应用前景。

关键词: 乙腈,生物降解,鉴定,紫红红球菌,生物学特性

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012)02-0250-06

乙腈是一种含氰基(R-CN)的有机化工原料,广泛用于制药、合成纤维、石油化工等领域。随着乙腈产量和用量的迅速增加,含乙腈废水的排放量亦逐年增大。由于乙腈在生物体内能够转化为剧毒物质——氰化氢和乙醛,当未经处理的含乙腈废水、废液进入自然水域后会引引起鱼类等水生生物大批死亡,造成严重的生态环境破坏,危害人畜健康^[1]。目前已筛选到的能够降解乙腈的微生物主要包括:恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*),玫瑰色诺卡氏菌 LL100-21 (*Nocardia rhodochrous* LL100-21),色素杆菌属 (*Chromobacterium* sp.),铜绿假单胞菌

(*Pseudomonas aeruginosa*)^[2],地丝菌 JR1 (*Geotrichum* sp. JR1)^[3],*Natronocella acetinitrilica*^[4] 红球菌 RHA1 (*Rhodococcus* sp. RHA1)^[5] 和中慢生根瘤菌 F28 (*Mesorhizobium* sp. F28)^[6]。本实验室从农药生产厂污水处理池活性污泥中筛选到 1 株苄嘧磺隆降解菌 BX2,后期实验发现其对乙腈具有超强降解能力,有望用于含乙腈废水的生物处理。

本研究为了解菌株 BX2 的系统分类地位,采用形态特征、生理生化特性、16S rRNA、*gyrB*、*secA1* 基因序列比对的方法对菌株 BX2 进行鉴定,并对其生物学特性进行研究。

基金项目:黑龙江省教育厅课题(11541015);黑龙江省博士后科研启动资助金(LBH-Q09158);黑龙江省自然科学基金(C201021);“十一五”国家科技支撑计划项目(2007BAD87B03)

* 通信作者。Tel: +86-451-55190034; E-mail: chunyanli@neau.edu.cn

作者简介:李悦(1986-),女,黑龙江,硕士研究生,主要从事环境微生物学研究。E-mail: liyue19860715@126.com

收稿日期:2011-08-27;修回日期:2011-11-28

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和试剂:菌株 BX2 由本实验室分离、保存。所用乙腈为色谱纯 购自哈尔滨欧瑞德生物试剂有限责任公司。其余试剂均为分析纯。

1.1.2 培养基:无机盐培养基(g/L): KH_2PO_4 1.7, Na_2HPO_4 9.8, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, CaCO_3 0.002, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.00144, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0009, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.00025, H_3BO_3 0.00006, 自然 pH7.2。LB 培养基(g/L):酵母膏 5,蛋白胨 10, NaCl 10。pH 调至 7.0 固体培养基加 2% 琼脂。

1.2 菌株 BX2 的形态特征及生理生化特性

将 BX2 采用平板涂布法接种于固体 LB 培养基上 利用光学显微镜和电子显微镜观察不同生长时期菌体。参照《常见细菌系统鉴定手册》^[7] 进行生理生化测试。

1.3 PCR 扩增 16S rRNA、*gyrB* 和 *secA1* 基因

用碱裂解法提取细菌总 DNA。以总 DNA 为模板 用表 1 中的引物扩增 16S rRNA、*gyrB*、*secA1* 基因。

表 1 引物序列

Table 1 The sequences of primers

Gene	Primer	Sequence (5'→3')
16S rRNA	27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
	1492R	GGTTACCTTGTACGACTT
<i>gyrB</i>	UP1	GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGC- NNGNGNAARTTYGA
	UP-2r	AGCAGGTTACGGATGTGCCAGCCRT- CNACRTCNCRCTCNGTCAT
<i>secA1</i>	<i>secA1</i> F	GACAGYGAGTGGATGGGYCGSGTGCACCG
	<i>secA1</i> R	GCGGACGATGTAGTCCTTGTC

PCR 扩增反应体系 (50 μL) 为: 10 \times buffer 5 μL , dNTP 4 μL , 正反向引物各 2 μL , ExTaq 酶 0.5 μL , 模板 2 μL , 去离子水补齐至 50 μL 。16S rRNA 基因 PCR 扩增条件: 95 $^\circ\text{C}$ 5 min; 94 $^\circ\text{C}$ 30 s, 54 $^\circ\text{C}$ 45 s, 72 $^\circ\text{C}$ 90 s 35 个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 10 min。*gyrB* 和 *secA1* 基因 PCR 扩增条件: 95 $^\circ\text{C}$ 5 min; 94 $^\circ\text{C}$ 30 s, 60 $^\circ\text{C}$ 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 1 min 35 个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 10 min。产物经 1% 琼脂糖凝胶中电泳鉴定后委托华大基因公司测序。将菌株 BX2 的 16S rRNA、*gyrB*、*secA1* 基因序列提交 GenBank 进行 BLAST 比对, 用 MEGA 软

件中的 Kimura2-Parameter 距离模型计算进化距离, 用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树。

1.4 菌株 BX2 生长条件的优化

以 20 $^\circ\text{C}$ 、25 $^\circ\text{C}$ 、30 $^\circ\text{C}$ 、35 $^\circ\text{C}$ 、40 $^\circ\text{C}$ 、45 $^\circ\text{C}$ 作为温度实验组; 以 pH = 5.0、6.0、7.0、7.5、8.0、9.0、10.0 作为初始 pH 实验组; 以接种量 (V/V) 0.1%、0.5%、1.0%、2.0%、3.0%、5.0%、8.0% 作为接种量实验组。以上各实验组用 150 ml 三角瓶培养, 每瓶盛装含乙腈 800 mg/L 的无机盐培养基 50 mL。接种用菌悬液 OD_{600} 调至 2.0。恒温摇床 180 r/min 振荡培养, 每隔 8 h 测定 600 nm 处吸光值。每个实验设 3 个平行。

1.5 最佳培养条件下菌株生长及降解曲线的测定

1.5.1 气相色谱检测条件:GC-14C 型气相色谱仪, FID 检测器; 色谱柱: 内涂 14% OV-1701 大口径毛细管柱 (30 m \times 0.53 mm); 温度条件: 进样口 200 $^\circ\text{C}$, 柱温 110 $^\circ\text{C}$, 检测器 200 $^\circ\text{C}$; 气体流量: 高纯氮气 300 kPa (分压 50 kPa)、氢气 50 kPa、空气 50 kPa; 进样量 1 μL 。

1.5.2 菌株降解乙腈测定:将菌液按 1.4 中所得到的最佳接种量接种到含 800 mg/L 乙腈的无机盐基础培养液中, 在最适培养条件下培养, 定时取样离心, 收集上清液, -20 $^\circ\text{C}$ 保存待测。在相同的条件下做 3 个平行样 取其平均值。另设不接菌对照, 确定乙腈的自然挥发量, 按 1.5.1 中所述条件测定乙腈含量 按公式 (1) 计算降解菌株对乙腈的降解率。

$$X = (C_{ck} - C_x) / C_{ck} \times 100\% \quad (1)$$

式中 X 为乙腈的生物降解率; C_{ck} 为未接菌对照培养液中乙腈的浓度 (mg/L); C_x 为接菌培养液中乙腈的浓度 (mg/L)。

1.6 菌株 BX2 对 NaCl 的耐受性

以不同浓度 NaCl (0%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%) 作为降解菌耐盐性实验组, 每个实验设 3 个平行, 1% 接种至含乙腈 800 mg/L 的无机盐培养基, 180 r/min 摇床 35 $^\circ\text{C}$ 恒温培养 24 h, 测定 600 nm 处吸光值。

2 结果

2.1 菌株 BX2 的形态特征与生理生化特性

菌株 BX2 在固体 LB 培养基上形成边缘整齐,

表面光滑、湿润,凸起,不透明的淡红色菌落。随培养时间延长,菌落颜色变深为橘红色。菌体形态可变,在不同培养时间呈现杆状-球状变化,无鞭毛,不形成芽孢,革兰氏染色呈阳性。细胞大小 $1.5\ \mu\text{m} \times 0.8\ \mu\text{m}$ 。该菌株能还原硝酸盐、过氧化氢酶,不能还原氧化酶。能产生硫化氢,水解 Tween 80,不能水解干酪素、尿素、淀粉、明胶。可利用 D-果糖、D-葡萄糖、麦芽糖、甘露醇、山梨糖及甘油产酸,但不能利用鼠李糖产酸。可利用乙酸钠、苯甲酸钠、丁二酸钠及柠檬酸钠为碳源。将菌株 BX2 的形态特征、生理生化与已报道的菌株进行比较发现:菌株 BX2 的形态特征、生理生化特性与红球菌属及戈登氏菌属具有较高的相似性,其中与紫红红球菌最相近。

2.2 菌株 BX2 的 16S rRNA、*gyrB* 和 *secA1* 基因序列分析

扩增 16S rRNA、*gyrB*、*secA1* 基因,得到 PCR 产物分别约为 1.5kb、1.3kb、0.5kb,与预期条带大小一致。委托华大基因公司测序得到菌株 BX2 的 16S rRNA 部分序列长 1419 bp,GenBank 登录号为 FJ617562;*gyrB* 部分序列长 1263bp,GenBank 登录号为 JF506741;*secA1* 部分序列长 470bp,GenBank 登录号为 JN562728。采用 BLAST 将菌株 BX2 的 3 个基因序列分别与 GenBank 中已登录的基因序列进行比对,选择其中在 IJSEM (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology) 等国际刊物上发表的具有代表性的模式菌株构建系统发育树(图 1)。菌株 BX2 的 16S rRNA 基因核苷酸序列与红球菌属及其相近属戈登氏属和诺卡氏属的模式菌株有较高的相似性,与 *Gordonia rubripertincta* 相似性 99.65%,与嗜吡啉红球菌 (*Rhodococcus pyridinivorans*) 相似性为 99.58%,与紫红红球菌 (*Rhodococcus rhodochrous*) 相似性为 99.37%。3 个数据均高于 99%,差异并不显著。为此,我们分析了进化速度更快的 *gyrB* 基因^[8]及能够精细区分近缘菌株的 *secA1* 基因。以 *gyrB* 基因序列相似性为基础的系统发育分析表明:菌株 BX2 与紫红红球菌形成同一分支,核苷酸序列相似性最高,为 99.29%,氨基酸序列相似性

99.76%;与嗜吡啉红球菌核苷酸序列相似性为 96.99%,氨基酸序列相似性 99.52%;与 *Gordonia rubripertincta* 核苷酸序列的相似性仅为 74.05%,氨基酸序列相似性 89.05%。以 *secA1* 基因序列相似性为基础的系统发育分析表明:菌株 BX2 与紫红红球菌形成同一分支,核苷酸序列相似性最高,为 97.87%,氨基酸序列相似性 100%;与 *Gordonia rubripertincta* 核苷酸序列相似性仅为 87.05%,氨基酸序列相似性 91.67%。综合以上数据,菌株 BX2 应鉴定为紫红红球菌。

2.3 生长条件优化结果

各因素条件对降解菌 BX2 生长量的影响情况如下:温度在 35℃ 以内,菌株 BX2 的生长量随温度的升高而增加,温度范围在 20–40℃ 之间菌株 BX2 均能良好生长,在温度为 35℃ 时生长量最大,由此确定 35℃ 为菌株 BX2 的最佳生长温度。pH 值在 6.0–9.0 范围内菌株 BX2 均能良好生长,初始 pH 为 7.5 时菌株 BX2 生长量最大,因此菌株 BX2 的最佳初始 pH 为 7.5。接种量为 0.1% 和 0.5%,菌体生长延滞期较长,生长缓慢;接种量为 8% 时,菌体短期内生长迅速,但养分消耗较快,抑制了菌体大量生长,32h 到达衰亡期。接种量 1%–5%,菌体稳定期时生长量均达到较高水平。因此,从节约成本角度考虑,以 1% 作为最佳接种量。

2.4 最佳培养条件下 BX2 的生长曲线及乙腈降解曲线

图 2 为最佳培养条件下菌株 BX2 在含乙腈 800 mg/L 的无机盐培养基中的生长曲线及乙腈降解曲线。由图可见,随着菌体数量 (OD_{600} 值) 的增加,乙腈降解率明显提高。接种后 16 h 乙腈降解速率达到 95.87%。

2.5 菌株 BX2 对 NaCl 的耐受性

含氟废水中常含有较高的盐分,不利于微生物生长,给废水的生物处理增加难度。本研究对 BX2 的耐盐性进行了试验。结果表明,NaCl 浓度在 0%–3% 范围内对菌株 BX2 的生长量影响不明显。当 NaCl 浓度大于 4% 时,菌株 BX2 生长量明显下降;NaCl 浓度大于 6% 时菌体几乎不生长。

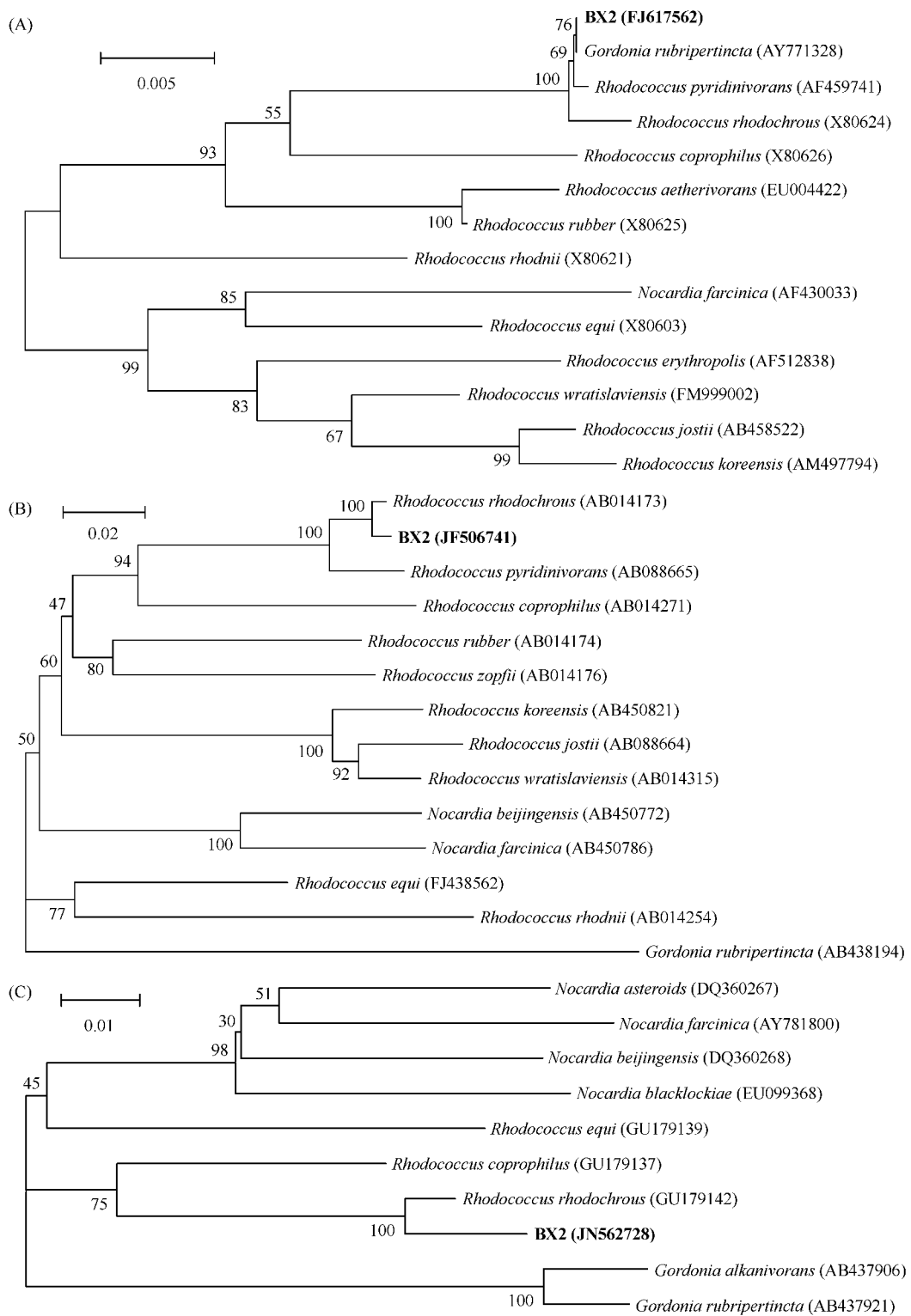


图1 基于16S rRNA (A), *gyrB* (B) 和 *secA1* (C) 基因的 BX2 系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of BX2 based on 16S rRNA (A), *gyrB* (B) and *secA1* (C) gene. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Scale bar indicates the number of substitutions per nucleotide position.

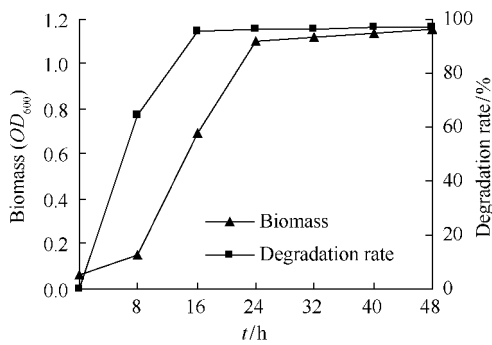


图2 菌株 BX2 的生长曲线和乙腈降解曲线

Fig. 2 Growth of strain BX2 and degradation of acetonitrile.

3 讨论

菌株在污染环境中的存在状态及其丰度是污染位点原位修复的关键。为评估其在环境中随时间的分布和丰度,鉴定到种是非常必要的^[9-10]。目前公认的用于细菌分类鉴定的基因是 16S rRNA 基因,但大量的研究表明,对于亲缘关系较近的菌株,单纯依靠菌株间的 16S rRNA 基因序列相似性来定种是不够的。*gyrB* 基因是细菌鉴定和分类的又一理想靶基因,可对假单胞菌、芽孢杆菌、弧菌、肠杆菌、分枝杆菌、气单胞菌、乳酸菌等不同属或科内的近缘种进行区分鉴定^[11-12],已成为当前国内外用于近缘种研究的热点。另外,多项研究结果表明,*secA1* 基因序列具有足够的可变性,对近缘菌株的分离效果好^[13-14],可用于进行菌种水平的鉴定及系统进化研究。结合本实验数据分析,虽然菌株 BX2 与红球菌属及戈登氏菌属 16S rRNA 基因相似性均大于 99%,但我们通过分析 *gyrB* 和 *secA1* 基因的系统发育关系排除了 BX2 为戈登氏菌属的可能性。以 *gyrB* 和 *secA1* 基因序列相似性为基础的系统发育分析表明:菌株 BX2 与紫红红球菌 *gyrB* 和 *secA1* 基因相似性均为最高,*gyrB* 基因相似性为 99.29%,氨基酸序列相似性 99.76%;*secA1* 基因相似性为 97.87%,氨基酸序列相似性 100%。菌株 BX2 与紫红红球菌在形态特征和生理生化特性上的高度相似性也辅证了上述结果。故将菌株 BX2 鉴定为紫红红球菌,命名为 *Rhodococcus rhodochrous* BX2。

目前,含氰化物废水的处理主要为物理化学方法。但这些方法存在成本高、产生二次污染的问题。而微生物降解法克服了以上缺点,以其成本低、外排

水质好等优点引起了人们的广泛关注。但是,含氰废水中盐浓度大、水质差、pH 不适合微生物生长、微生物对氰化物处理负荷小等因素使微生物降解法的应用受到限制。我们在实验过程中发现,菌株 BX2 可在 NaCl 浓度为 0% - 6% 的培养基中生长,在温度 20 - 40℃、pH 6.0 - 9.0 范围内均生长良好,能以乙腈为唯一碳氮源生长,能快速降解高浓度乙腈(在最适生长条件下对浓度 800 mg/L 乙腈的降解率 16 h 达到 95.87%)。综上所述, BX2 作为一个环境适应性强、生长范围广泛且具有很高降解能力的菌株,在含氰废水的生物修复方面有巨大潜力。

参考文献

- [1] 景德武. 乙腈对自然水域的污染及氰化物毒性的降解试验. 黑龙江水产 (*Heilongjiang Fisheries*), 2008, 2: 19-23.
- [2] Chapatwala KD, Nawaz MS, Richardson JD, Wolfram JH. Isolation and characterization of acetonitrile utilizing bacteria. *Journal of Industrial Microbiology*, 1990, 5 (2-3): 65-70.
- [3] Rezende RP, Dias JCT, Monterio AS, Carraza F, Linardi VR. The use of acetonitrile as the sole nitrogen and carbon source by *Geotrichum* sp. JR1. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2004, 35 (1-2): 117-120.
- [4] Sorokin DY, Pelt SV, Tourova TP, Takaichi S, Muyzer G. Acetonitrile degradation under haloalkaline conditions by *Natronocella acetinitrilica* gen. nov., sp. nov. *Microbiology*, 2007, 153 (4): 1157-1164.
- [5] Okamoto S, Eltis LD. Purification and characterization of a novel nitrile hydratase from *Rhodococcus* sp. RHA1. *Molecular Microbiology*, 2007, 65 (3): 828-838.
- [6] Feng YS, Lee CM. The potential of the acetonitrile biodegradation by *Mesorhizobium* sp. F28. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 164 (2-3): 646-650.
- [7] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 353-398.
- [8] Motoshima M, Yanagihara K, Matsuda J, Sugahara K, Hirakata Y, Yamada Y, Kohno S, Kamihira S. Rapid and accurate detection of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time polymerase chain reaction with melting curve analysis targeting *gyrB* gene. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*. 2007, 58 (1): 53-58.
- [9] Costas, BA, McManus GB, Doherty M, Katz LA. Use of species-specific primers and PCR to measure the distributions of planktonic ciliates in coastal waters. *Limnology and Oceanography: Methods*, 2007, 5: 163-173.
- [10] McManus GB, Katz LA. Molecular and morphological methods for identifying plankton: what makes a successful marriage? *Journal of Plankton Research*, 2009, 31 (10): 1119-1129.

- [11] Wang LT, Lee FL, Tai CJ, Hiroaki K. Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(8): 1846-1850.
- [12] 李献梅, 王小芬, 杨洪岩, 高秀芝, 崔宗均. 促旋酶 (*gyrase*) B 亚单位基因 *gyrB* 在鉴别细菌近缘种中的应用. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2008, 48(5): 701-706.
- [13] Kang YQ, Takeda K, Yazawa K, Mikami Y. Phylogenetic studies of *Gordonia* species based on *gyrB* and *secA1* gene analyses. *Mycopathologia*, 2009, 167: 95-105.
- [14] Kong FR, Wang HP, Zhang EQ, Sintchenko V, Xiao M, Sorrell TC, Chen XY, Chen SC-A. *secA1* gene sequence polymorphisms for species identification of *Nocardia* and recognition of intraspecies genetic diversity. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010, 48(11): 3928-34.

Identification and biological characterization of an acetonitrile degrading strain

Yue Li¹, Minghua Xiong¹, Xiaosong Cheng², Jing Sun¹, Hailian Zang³, Junbo Pan¹, Chunyan Li^{1*}

¹ College of Resource and Environment, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

² First Clinical Medical College, Harbin Medical University, Harbin 150001, China

³ Yichun Academy of Forestry, Yichun 153000, China

Abstract: [Objective] To identify and characterize an acetonitrile degrading strain BX2, thus to assess its potentials in the treatment of acetonitrile containing wastewater. [Methods] By means of phenotype and physio-biochemical characterization as well as phylogenetic analysis, we identified strain BX2. The optimum culture conditions of the strain were studied with single factor test, and the degradation of acetonitrile under the optimal growth conditions was determined. Additionally, NaCl tolerance was investigated. [Results] The phenotype and physio-biochemical characteristics of strain BX2 were similar to those of *Rhodococcus* sp.. The phylogenetic analysis based on 16S rRNA, *gyrB* and *secA1* gene suggested strain BX2 was the closest relative of *Rhodococcus rhodochrous* with 99.37%, 99.29% and 97.87% sequence similarity respectively. The optimal conditions for cell growth were 35°C, initial pH 7.5, and 1% inoculum. Under these conditions, the degradation rate of acetonitrile was 95.87% (800mg/L) within 16 h. Strain BX2 was able to grow in defined medium containing NaCl up to 6%. [Conclusion] Strain BX2 was identified as *Rhodococcus rhodochrous* and named *Rhodococcus rhodochrous* BX2. It showed great environmental adaptation and high capability of degrading acetonitrile.

Keywords: acetonitrile, biodegradation, identification, *Rhodococcus rhodochrous*, biological characteristics

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Science and Technology Research Project of Heilongjiang Education Bureau (11541015), by the Postdoctoral Science & Research Foundation of Heilongjiang (LBH-Q09158), by the Natural Science Foundation of Heilongjiang (C201021) and by the National Key Technology R&D Program (2007BAD87B03)

* Corresponding author. Tel: +86-451-55190034; E-mail: chunyanli@neau.edu.cn

Received: 27 August 2011 / Revised: 28 November 2011