

文章编号: 1007- 2985(2008) 02- 0092- 04

# 一株环己酮高效降解菌株的筛选及鉴定\*

何 倩, 刘祝祥, 易浪波, 肖怀东, 黄 苛, 陈义光, 彭清静

(吉首大学生物资源与环境科学学院, 湖南 吉首 416000)

**摘 要:**自岳阳巴陵石化公司环己酮生产车间总出水口污泥中分离得到一株能快速降解环己酮的菌株, 菌号为 JDM-3-11. 通过形态观察、生理生化特征检测和基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析, 初步鉴定其为赤红球菌 (*Rhodococcus ruber*) 的一个菌株. 当环己酮的质量浓度为 2 000 mg/L 时, 在温度为 30 ℃, 转速为 150 r/min, pH 值为 7 的条件下, 70 h 内该菌株对环己酮的降解率达到 94.79%.

**关键词:**环己酮; 生物降解; 16S rRNA 基因序列; 赤红球菌 (*Rhodococcus ruber*)

**中图分类号:** Q939.92

**文献标识码:** A

环己酮 (*Cyclohexanone*) 是一种低毒类物质, 但其气味强烈, 可经吸入、食入和皮肤吸收而进入人体内, 对眼睛、皮肤、粘膜和上呼吸道有明显的刺激作用, 进入身体后产生刺激和麻醉作用, 可引起呼吸衰竭<sup>[1]</sup>. 它是一种重要的工业有机化合物, 广泛用于生产己内酰胺 (CPL) 和己二酸, 作为有机溶剂可用于制造橡胶防老剂, 合成医药和有机合成工业的原料. 随着环己酮在工业生产上的应用越来越广泛, 其产量也不断增加<sup>[2]</sup>, 在其生产和使用过程中产生的含环己酮废水也日益增多. 对于环己酮生产和使用过程中产生的废水的处理方法有汽提法<sup>[3]</sup>和蒸发浓缩并综合回收利用后重油焚烧处理法<sup>[4-6]</sup>. 近年来关于有机污染物微生物降解的研究越来越热, 它成功地解决了常规水相处理中无法弥补的一些弊端<sup>[7]</sup>. 利用生物降解成本低, 能耗少, 是目前处理含环己酮废水常用方法之一.

目前发现的能降解环己酮的菌株主要属于以下几个属: 不动杆菌属 (*Acinetobacter*)<sup>[8]</sup>、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)<sup>[9]</sup>、黄色杆菌属 (*Xanthobacter*)<sup>[10]</sup>、诺卡氏菌属 (*Nocardia*)<sup>[11]</sup>、节杆菌属 (*Arthrobacter*)、红球菌属 (*Rhodococcus*)<sup>[12]</sup> 和邻单胞菌属 (*Plesiomonas*)<sup>[13]</sup> 等. 本实验拟从环己酮生产车间污泥中筛选出高度耐受和高效降解环己酮的菌株, 并进行初步鉴定, 以用于含环己酮废水处理及对被环己酮污染的环境的生物修复.

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种来源

菌种分离自岳阳巴陵石化公司环己酮生产车间总出水口污泥.

### 1.2 培养基

环己酮选择性培养基, 其配方参照文献[14]略加改动: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g, CaCl<sub>2</sub> 0.1 g, NaCl 0.2 g, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.03 g, FeCl<sub>2</sub> (10%) 0.05 mL, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, 121 ℃灭菌 30 min 后根据实验需要加入不同浓度的无菌环己酮.

琼脂平板培养基<sup>[15]</sup>: 牛肉膏 3 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL, 121 ℃灭菌 30 min

\* 收稿日期: 2007- 10- 08

作者简介: 何 倩 (1979- ), 女, 湖南益阳人, 吉首大学生物资源与环境科学学院硕士研究生, 主要从事环境和微生物生态学研究

通讯作者: 彭清静, 教授.

后根据实验需要加入不同浓度的无菌环己酮。

### 1.3 试验仪器

SPX-250B-Z 型生化培养箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);HZQ-F160 全温振荡培养箱(哈尔滨东联电子技术开发有限公司);TG16-WS 台式高速离心机(长沙平凡仪器仪表有限公司);LDZ5-2 台式低速自动平衡离心机(北京医用离心机厂);UV757CRT 紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);722N 可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);YXQ-LS-S II 全自动立式电热压力蒸汽灭菌器(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);VS-1300L-U 洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);HH-601 超级恒温水箱(金坛市富华仪器有限公司);DYY-12 型电脑三恒多用电子仪(北京市六一仪器厂);PTC-100 MJR PCR 扩增仪(美国 MJ Research 公司);GDS8000UVP 凝胶成像系统(英国 UVP 有限公司)。

### 1.4 方法

1.4.1 环己酮降解菌株的驯化和筛选 采用每个周期逐步增大环己酮质量浓度的驯化方法。取污泥 10 g 于有少量玻璃珠的 250 mL 无菌水中振荡约 20 min 使细胞充分分散,制成菌悬液。用无菌吸管取 10 mL 此菌悬液接种到 100 mL 环己酮选择性培养基(环己酮质量浓度为 500 mg/L)中,30 °C、150 r/min 条件下振荡培养 7 d,从中吸取 10 mL 转接至 100 mL 新鲜的环己酮选择性培养基中(环己酮质量浓度应逐次递增,增加梯度为 500 mg/L),连续转接数次。然后用稀释平板分离法在琼脂平板培养基上涂布分离,并在含较高质量浓度环己酮的平板上挑取单菌落反复划线分离纯化得到单一菌株。

将所得单菌株根据菌落大小、表面形状、隆起程度、透明程度、边缘形状和菌落颜色等差异及革兰氏染色的差异去重后,进行摇瓶培养,每株 3 瓶,测试平均降解环己酮的能力。选出降解能力强的菌株在斜面上传代 10~15 次后,再测试其降解环己酮的能力得到稳定性好的菌株。根据形态、显微特征、革兰氏染色、生长曲线等,选择形态差异大、生长周期短、容易培养的菌株为优势菌。

1.4.2 环己酮含量的测定方法 用分光光度法<sup>[19]</sup>测定培养液中的环己酮含量。

取 6 支 25 mL 具塞比色管,分别加入以 8% NaOH 溶液配制的质量浓度为 5, 10, 15, 30, 50, 100 mg/L 的环己酮标准溶液 1 mL,另取一支同样的比色管,加入 8% NaOH 溶液 1 mL 作空白。上述各管中分别加入 0.1% 糠醛溶液 1 mL 和 8% NaOH 溶液 2 mL,置于 65 °C 水浴中热 5 min,然后在水浴冷却条件下加入浓硫酸溶液 4 mL 和 40% 硫酸溶液 5 mL,摇匀。在 555 nm 处以空白液作参比比色,以吸光度对环己酮浓度作标准曲线。

培养液按同样的方法测得吸光度后,在标准曲线上找出相应质量浓度即为培养液中环己酮的浓度,培养液环己酮质量浓度太大时用未接种的培养基加以稀释,所得质量浓度再乘以稀释倍数即可。

1.4.3 菌株环己酮降解能力的测定 取 100 mL 环己酮质量浓度为 2 000 mg/L 的无菌环己酮选择性培养基(pH 值 7),接入 1 mL 菌悬液,30 °C、150 r/min 的条件下进行摇瓶培养 70 h 后测定环己酮含量,重复 3 次,据所得平均值计算环己酮的降解率。

1.4.4 菌株生长情况的测定 将活化后的菌株接种到环己酮选择性培养基(环己酮质量浓度为 2 000 mg/L)中,30 °C、150 r/min 的条件下进行摇瓶培养,重复 3 次,以未接种的培养液为空白调零,在不同的时间(间隔 6 h)分别取样用分光光度计测定培养液的 OD<sub>600</sub> 值,当 OD<sub>600</sub> 值超过 0.9 时用未接种的培养液加以稀释,所得 OD 值须乘以稀释倍数。以时间为横坐标,OD<sub>600</sub> 值为纵坐标,绘制菌株的生长曲线。

1.4.5 菌株形态与生理生化鉴定 按文献[15]进行菌体形态观察;按文献[17]进行生理生化试验。

1.4.6 菌株 16S rRNA 基因片段分离与序列分析 细菌总 DNA 的提取按文献[18]方法进行。

采用细菌 16S rRNA 通用引物(PA: 5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3' 和 PB: 5' - TTAAGGTGATG-CAGCCGCA - 3')扩增菌株的 16S rRNA 基因片段。PCR 反应条件:95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 1 min,54 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 2 min,30 个循环后再 72 °C 延伸 10 min。测序工作由上海生工生物工程技术有限公司完成。

根据测序结果用 Blast 搜索程序从 GenBank 中调出相似性较高的相关菌株的 16S rRNA 基因序列,用 CLUSTAL X 1.83 进行多重序列比对,系统进化距离矩阵根据 Kimura 模型估算,用 MEGA 3.1(Molecular Evolutionary Genetics Analysis)软件包采用邻接法(Neighbor-Joining)进行聚类分析和系统进化树构建<sup>[19-20]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌种的筛选

经过反复的驯化、富集培养、划线分离与纯化所得单菌株根据菌落大小、表面形状、隆起程度、透明程度、边缘形状和菌落颜色等差异及革兰氏染色的差异去除重复并在斜面上传代后得到遗传稳定的、能忍受高浓度环己酮的菌株,然后通过比较其环己酮降解能力得到一株能忍受 5 000 mg/L 环己酮且能高效降解环己酮的优势菌株,初步命名为 JDM- 3- 11,菌株 JDM- 3- 11 在 30 ℃、150 r/min 条件下培养 70 h 后对环己酮的降解率达到 94.79%.

### 2.2 菌株环己酮降解能力的测定

菌株 JDM- 3- 11 接入 100 mL 环己酮质量浓度为 2 000 mg/L 的无菌环己酮选择性培养基(pH 值 7)中,30 ℃、150 r/min 培养 70 h 后菌株对环己酮的降解率达到 94.79%.

### 2.3 菌株生长与时间的关系

菌株的生长情况与时间的关系如图 1 所示.由图 1 可知,菌株 JDM- 3- 11 在 0~ 6 h 因细菌数量少而繁殖速度慢,为延迟期;6~ 48 h 为对数期,此阶段细菌生长速率快,菌体活性最大,降解能力也最强;之后由于营养物质的限制,细菌繁殖率和死亡率接近,细菌数量稳定,开始进入稳定期.由于光密度表示的是培养液中的总菌数,包括活菌和死菌,因此所测的生长曲线衰亡期不明显.此菌生长周期较短,在以后的研究和生产中具有一定的优势.

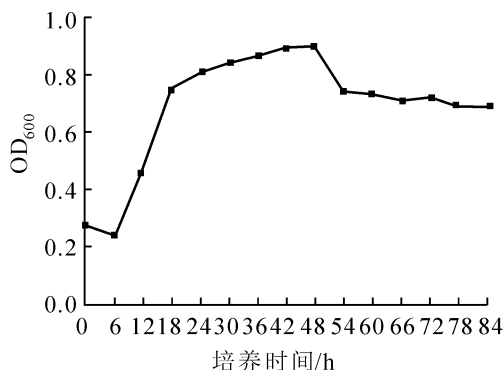


图 1 菌株 JDM- 3- 11 的生长曲线

Fig. 1 Growth Curve of Strain JDM- 3- 11

### 2.4 菌株的初步鉴定

2.4.1 菌株的形态与生理生化特性 菌落圆形、隆起、颜色为桔红色、湿润、奶酪状、不透明、边缘整齐、

光滑.细胞革兰氏阳性,杆状.芽孢球形,端生或偏端生.生理生化特性检如表 1 所示.该菌的菌落形态特征、革兰氏染色特征及接触酶和葡萄糖产酸等生理生化特征与红球菌属特征一致.

表 1 菌株 JDM- 3- 11 的生理生化特征

Table 1 Physiological and Biochemical Characteristics of Strain JDM- 3- 11

特征	结果	特征	结果
革兰氏染色	+	葡萄糖	+
柠檬酸盐	+	阿拉伯糖	-
接触酶	+	产酸 甘露糖	-
尿素酶	-	果糖	+
黄嘌呤	-	棉子糖	-
次黄嘌呤	-	酪氨酸酶	+
反硝化	-	酪蛋白	-
甲基红	-	水解 明胶	-
V- P	+	淀粉	-

注 “+”为阳性,“-”为阴性

2.4.2 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析 用 Blast 程序对菌株 JDM- 3- 11 的 16S rRNA 基因序列和 GenBank 中已登录的 16S rRNA 序列进行核苷酸序列同源性比较,发现菌株 JDM- 3- 11 与多株红球菌的 16S rRNA 核苷酸序列的同源性高达 98%,依据此结果,菌株 JDM- 3- 11 可归属于红球菌属(Rhodococ-

cus). JDM-3-11 菌株的系统发育树见图 2.

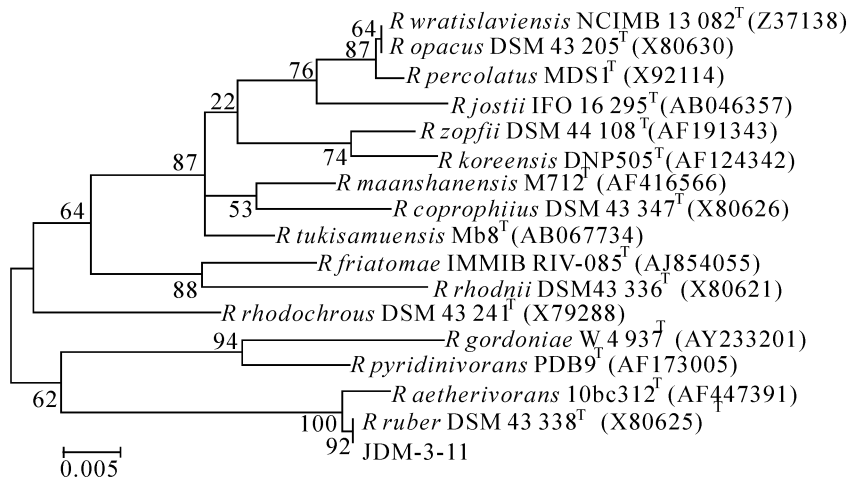


图 2 菌株 JDM-3-11 的系统发育树

Fig. 2 The Phylogenetic Tree of Strain JDM-3-11. Numerals on Branches are the Supporting Percentage by 1 000 Replicates. Scale bar, 5 Nucleotide Substitution Per 1 000 Nucleotides of 16S rRNA Gene Sequence

从图 2 中可以看出, 菌株 JDM-3-11 与红球菌属聚在一起, 且与红球菌属的 *R. aetherivorans* 10bc312T 和 *R. ruber* DSM 43338T 系统发育关系最密切, 与其分别以 99.45% 和 100% 的 16S rRNA 基因核苷酸序列相似性聚为一簇。且菌株 JDM-3-11 与赤红球菌 (*Rhodococcus ruber*) DSM43338T 以 100% 的 16S rRNA 基因核苷酸序列相似性和极高的自展值 (bootstrap value, 92%) 支持聚为 1 个分支, 与其它细菌均相距较远, 表明 JDM-3-11 与 *Rhodococcus ruber* 亲缘关系最近, 结合菌株的形态和生理生化特征, 菌株 JDM-3-11 初步鉴定为赤红球菌 (*Rhodococcus ruber*) 的一个菌株。要进一步确定其分类地位的正确性, 还需结合其他现代分类学的方法如 DNA-DNA 杂交、G+C% 的测定等。

## 参考文献:

- [1] 姚燕来, 闵航, 吕振华. 环戊酮和环己酮的微生物降解途径、相关酶和基因研究进展 [J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(3): 445-448.
- [2] 周万荣. 我国环己酮产业现状与市场分析 [J]. 精细与专用化学品, 2001, 8: 17-18.
- [3] 周万荣. 汽提法处理环己酮废水 [J]. 化工生产与技术, 1999, 1: 36-39.
- [4] 唐丽华. 环己醇和环己酮生产中 BI 废水的综合利用 [J]. 化工环保, 1997, 17(2): 100-104.
- [5] 宋星星. 环己烷氧化废碱液先进蒸发技术的开发与应用 [J]. 现代化工, 2001, 21(10): 36-39.
- [6] 王孝弟. 巨化锦纶厂依靠技术创新挖潜创效 [J]. 化工管理, 2003, 8: 49.
- [7] 孙菁, 王, 陈代杰. R-(+)-硫辛酸关键手性中间体的微生物转化进展 [J]. 药物生物技术, 2002, 9(3): 165-170.
- [8] DONOGHUE N A, TRUDGILL P W. The Metabolism of Cyclohexanol by *Acinetobacter* NCIB 9871 [J]. Eur. J. Biochem, 1975, 60: 1-7.
- [9] TANAKA H, OBATA H, TOKUYAMA T, et al. Metabolism of Cyclohexanol by *Pseudomonas* Species [J]. Hakkokogaku Kaishi, 1977, 55: 62-67.
- [10] TROWER M K, BUCKLAND M, HIGGINS R, et al. Isolation and Characterization of Cyclohexane-Metabolizing *Xanthobacter* sp [J]. Appl. Environ Microbiol, 1985, 49: 1282-1289.
- [11] NORRIS D B, TRUGDILL P W. Multiple Forms of Cyclohexanone Oxygenase from *Nocardia Globerulea* CL1 [J]. Eur. J. Biochem, 1976, 63: 193-198.
- [12] PATRICIA C B, et al. mRNA Differential Display in a Microbial Enrichment Culture: Simultaneous Identification of Three Cyclohexanone Monooxygenases from Three Species [J]. Appl. & Environ Microbiol, 2003, 69(1): 334-342.
- [13] 郑爱芳, 李大平. 由环己酮生物合成己内酯的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18: 787-791.
- [14] 王永强, 毕贵芹, 张洪林, 等. 氯苯降解菌的筛选及其降解特性的研究 [J]. 工业用水与废水, 2003, 34(6): 35.

(下转第 116 页)

# Environment for the Community Sports in the Medium-Sized Cities of Southwest Minority Region

—A Case in Jishou, Hunan

PENG Chang-jin

(College of Physical Education, Jishou University, Jishou 416000, Hunan China)

**Abstract:** In the southwest minority region, the economic development and social development demand and provide economic background for the community sports development. Although the sportsmanship cultivated through centuries is a good foundation for developing the community sports, the lack of regulations forms the greatest obstacle. Therefore, to make the community sports develop in harmony with the city development, it is important to work out related regulation.

**Key words:** southwest minority region; medium-sized city; Jishou City; environment for the community sports

(责任编辑 易必武)

(上接第 95 页)

- [ 15] 沈萍,范秀荣,李广武.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社,2002.
- [ 16] 蒋文强,吕霞,邱光正.一次性使用输液(血)器水浸液中环己酮的分光光度法测定[J].药物分析杂志,1998,18(3):195-196.
- [ 17] 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.
- [ 18] 奥斯伯 F,布伦特 R,金斯顿 R E,等著.精编分子生物学实验指南[M].第 4 版.马学军,舒跃龙,译.北京:科学出版社,2005.
- [ 19] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAK F. The Clustal X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 24(4): 876- 488.
- [ 20] KUMAR S, TAMURA K, JAKOBSEN, et al. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software [J]. Bioinformatics, 2001, 17: 1 244- 1 245.

## Screening and Identification of a High-Efficiency Cyclohexanone-Degrading Strain JDM-3-11

HE Qian, LIU Zhixiang, YI Langbo, XIAO Huai-dong, HUANG Ke, CHEN Yiguang, PENG Qing-jing

(College of Biological Resources and Environmental Science, Jishou University, Jishou, 416000, Hunan China)

**Abstract:** This paper reported screening a strain numbered JDM-3-11 for effectively degrading cyclohexanone, which was acclimated and isolated from the sludge from Baling Petrochemical Company in Yueyang. The strain was tentatively identified as *Rhodococcus ruber* by bacterial morphological observation, physiological and biochemical test, and 16S rRNA sequences analysis. The study showed that when the content of cyclohexanone was 2000 mg/L, the temperature was 30 °C, the rotate speed was 150 r/min and pH was 7, the cyclohexanone biodegrading rate of strain JDM-3-11 within 70 hours reached 94.79%.

**Key words:** cyclohexanone; biodegradation; 16S rRNA gene sequence; *Rhodococcus ruber*

(责任编辑 易必武)