

孙晶,熊明华,成小松,等.2012. *Rhodococcus* sp. BX2 菌对乙腈的降解特性及降解途径研究[J]. 环境科学学报,32(5):1041-1048  
Sun J, Xiong M H, Cheng X S, et al. 2012. Characteristics and pathway of acetonitrile degradation by *Rhodococcus* sp. BX2 [J]. Acta Scientiae Circumstantiae,32(5):1041-1048

# *Rhodococcus* sp. BX2 菌对乙腈的降解特性及降解途径研究

孙晶<sup>1</sup>,熊明华<sup>1</sup>,成小松<sup>2</sup>,李悦<sup>1</sup>,臧海莲<sup>3</sup>,李春艳<sup>1,\*</sup>

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

收稿日期:2011-08-25 修回日期:2011-10-08 录用日期:2011-10-21

**摘要:**对 *Rhodococcus* sp. BX2 菌降解乙腈的特性及其降解途径进行了研究. 结果显示,在底物浓度为  $800 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,接种量为 1.0%,培养温度为  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ ,环境 pH 为 7.5 的条件下,16 h 时 *Rhodococcus* sp. BX2 菌对乙腈的降解率为 95.98%;添加葡萄糖可在培养初期加快 *Rhodococcus* sp. BX2 菌的生长和对乙腈的降解,蔗糖、乙酰胺和尿素对其影响不大. 将 BX2 菌接种到含有高乙腈浓度 ( $25000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 的合成废水中,培养 180 h 后,乙腈降解率可达 88.59%. 在催化反应 60 min 后,*Rhodococcus* sp. BX2 腈水合酶与腈水解酶的总酶活可达到  $422.81 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,对其相关基因序列的分析结果表明,*Rhodococcus* sp. BX2 中同时存在腈水解酶基因和腈水合酶基因,因此,确定乙腈的降解主要由腈水合酶途径完成,可能同时存在腈水解酶的降解途径.

**关键词:**乙腈;*Rhodococcus* sp. BX2;降解特性;腈水合酶;腈水解酶;酰胺酶

文章编号:0253-2468(2012)05-1041-08 中图分类号:X172 文献标识码:A

## Characteristics and pathway of acetonitrile degradation by *Rhodococcus* sp. BX2

SUN Jing<sup>1</sup>, XIONG Minghua<sup>1</sup>, CHENG Xiaosong<sup>2</sup>, LI Yue<sup>1</sup>, ZANG Hailian<sup>3</sup>, LI Chunyan<sup>1,\*</sup>

1. College of Resource and Environment, Northeast Agricultural University, Harbin 150030
2. First Clinical Medical College, Harbin Medical University, Harbin 150001
3. Yichun Academy of Forestry, Yichun 153000

Received 25 August 2011; received in revised form 8 October 2011; accepted 21 October 2011

**Abstract:** The characteristics and pathway of acetonitrile degradation by *Rhodococcus* sp. BX2 were investigated in this study. Results showed that with the initial acetonitrile concentration of  $800 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , the degradation rate was 95.98% in 16 hours under the condition of inoculum 1.0%,  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  and pH value 7.5. Glucose could accelerate the degradation of acetonitrile in the initial period, while sucrose, acetamide and urea had slight impact. The degradation rate could reach 88.59% when BX2 was cultured in the synthetic wastewater with high concentration of acetonitrile ( $25000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for 180 hours. Total enzyme activities was  $422.81 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  when incubated for 60 minutes. The results of related genes sequence showed that *Rhodococcus* sp. BX2 had both nitrile hydrolase gene and nitrile hydratase gene. The degradation pathway of acetonitrile by *Rhodococcus* sp. BX2 was mainly nitrile hydratase (NHase), with possible pathway of the nitrile hydrolase.

**Keywords:** acetonitrile; *Rhodococcus* sp. BX2; degrading characteristics; nitrile hydrolase; nitrile hydratase; amidase

### 1 引言(Introduction)

腈是一类重要的化工和化纤工业原料,同时又是一类含 CN—基团的具有强烈生物毒性的化合物,

具有高度致癌、致突变作用(Li *et al.*, 2007). 乙腈(又称甲基氰或氰甲烷)是腈化物的典型代表,在制药、石化、织物染色、香料和感光材料制造等领域广泛应用,也是用于高效液相色谱的重要分析试剂

**基金项目:** 黑龙江省自然科学基金(No. C201021);黑龙江省博士后科研启动资助基金(No. LBH-Q09158);“十一五”国家科技支撑计划(No. 2007BAD87B03);黑龙江省教育厅课题项目(No. 11541015)

**Supported by** the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province(No. C201021), the Postdoctoral Science & Research Foundation of Heilongjiang Province(No. LBH-Q09158), the National Key Technology R&D Program (No. 2007BAD87B03) and the Science and Technology Research Project of Heilongjiang Education Bureau(No. 11541015)

**作者简介:** 孙晶(1985—),女,E-mail: sunjing-229@163.com; \*通讯作者(责任作者),E-mail: chunyanli@neau.edu.cn

**Biography:** SUN Jing(1985—),female,E-mail: sunjing-229@163.com; \*Corresponding author,E-mail: chunyanli@neau.edu.cn

(方萍等,2005).随着乙腈工业产量和用量的迅速增加,含乙腈废水的排放量亦逐年增大.美国环境保护署(USEPA)公布的对人体无影响的自由态氰基(CN<sup>-</sup>)服用剂量是 $0.06\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,对其它小动物(如禽鸟等)、水生生物的致死剂量更低(Kjeldsen,1999).含有乙腈的废水、废液若未经处理直接排入自然水域,不仅会破坏生态环境,还将威胁到人、畜的健康(Bhalla *et al.*,2005).

工业上对含腈废水的处理主要采用化学方法,但化学处理法成本高、效率低,对腈降解不彻底(Li *et al.*,2009;姜文勇等,2001).而生物处理法不但能弥补化学方法的诸多缺陷,且不会产生二次污染,已被公认为更经济、有效,对环境友好的处理方法(Sorokin *et al.*,2007).国外在20世纪70年代开始进行假单胞菌属对乙腈的降解途径研究,80年代逐渐开始对腈转化酶的研究(谢树华等,1990),近年来已筛选到多种可产生腈转化酶的细菌(邓林,2005).然而,国内对乙腈的研究多数集中在其生产、利用和回收工艺方面(宫晓燕,2008;白聪丽等,2010),有关乙腈生物降解的报道则相对较少.

基于此,本文利用实验室筛选保藏的1株乙腈高效降解菌 *Rhodococcus* sp. BX2,通过降解率测定、降解产物分析、相应酶活测定和PCR扩增等方法对其乙腈降解特性及降解途径进行研究,以期对含腈废水的生物修复提供菌株资源和实验依据.

## 2 材料与方法(Materials and methods)

### 2.1 菌株

BX2从江苏激素研究所污水处理池污泥中分离获得,经形态学、生理生化及16S rRNA、*gyrB*、*SecA1*看家基因鉴定为 *Rhodococcus* sp.,由本实验室保存.

### 2.2 试剂与培养基

乙腈(色谱纯,99.9%)、Tris-平衡酚等试剂购自哈尔滨欧瑞德生物试剂有限责任公司,PCR扩增引物由生工生物工程(上海)有限公司合成.

牛肉膏蛋白胨培养基:牛肉膏3.0 g,蛋白胨10.0 g,NaCl 5.0 g,蒸馏水1000 mL,pH=7.5,121℃灭菌25 min.

无机盐基础培养基:KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.7 g,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 9.8 g,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0 g,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1 g,MgO 0.01075 g,FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.9 mg,CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.25 mg,CaCO<sub>3</sub> 2.0 mg,ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.44 mg,H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub>

0.06 mg,蒸馏水1000 mL,pH=7.5,121℃灭菌25 min.

合成废水:乙腈终浓度为 $25000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的无机盐基础培养液.

### 2.3 菌悬液制备

在无菌条件下,挑取一环斜面菌种接种到50 mL牛肉膏蛋白胨培养基中,35℃、180 r·min<sup>-1</sup>过夜培养.取适量培养液,8000 r·min<sup>-1</sup>离心3 min,弃上清,无菌水洗涤沉淀2~3次,再用无菌水重悬沉淀,调至OD<sub>600</sub>=2.0±0.1.

### 2.4 乙腈含量的测定

采用气相色谱测定乙腈含量,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×0.53 mm);温度条件:进样口200℃,FID检测器200℃,柱温110℃;气体流量:载气为高纯N<sub>2</sub>,流量300 kPa,分压50 kPa,氢气50 kPa,空气50 kPa;进样量为1 μL,以外标法定量.*Rhodococcus* sp. BX2对乙腈的降解率按公式(1)进行计算.

$$X = \frac{(C_{\text{CK}} - C_X)}{C_{\text{CK}}} \times 100\% \quad (1)$$

式中, $X$ 为乙腈的生物降解率, $C_X$ 为接菌处理培养液中乙腈浓度( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), $C_{\text{CK}}$ 为未接菌对照中乙腈浓度( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

样品制备:取待测培养液1 mL,12000 r·min<sup>-1</sup>离心2 min,将上清液转至新的离心管中,-20℃保存待测.

### 2.5 不同因素对BX2生长和乙腈降解的影响

分别以葡萄糖、蔗糖、乙酰胺、尿素作为外加碳源或氮源实验组,以0、8、16、24、32、40、48 h作为培养时间实验组,以接种量0.1%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%作为接种量实验组,以20、25、30、35、40、45℃作为温度实验组,以pH=5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0作为pH实验组.以上各实验组无机盐基础培养液均为50 mL,乙腈终浓度均为 $800\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .外加碳源或氮源的加入比例为0.1%,每处理设置3个平行,重复3次.培养条件为恒温摇床180 r·min<sup>-1</sup>振荡培养,除培养时间实验组外,其他各组均在16 h取样,测定其培养液在600 nm下的吸光度值及乙腈含量,同时设置空白对照组.

### 2.6 BX2对乙腈耐受能力的检测

设定无机盐基础培养液中乙腈的初始浓度分别为:800、1000、3000、6000、10000、15000、20000、

25000、30000、35000、40000、45000、50000、55000 和 60000  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 于 35  $^{\circ}\text{C}$ 、180  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  恒温摇床中振荡培养, 每处理设 3 个平行, 同时设对照组, 培养 7 d 后测定各组培养液在 600 nm 下的吸光度值。

### 2.7 BX2 对合成废水中乙腈降解能力检测

将 BX2 菌悬液按 1.0% 接种量接入装有 100 mL 合成废水的 250 mL 三角瓶中, 35  $^{\circ}\text{C}$ 、180  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  振荡培养, 设 3 组平行, 以不接菌的合成废水作对照, 每 12 h 取样 1 mL, 12000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 2 min, 取上清液进行气相色谱检测。

### 2.8 BX2 对乙腈降解产物分析

在 50 mL 无机盐基础培养基中加入一定量乙腈 (终浓度 800  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 按 1.0% 接种量接入 BX2 菌悬液, 于 35  $^{\circ}\text{C}$ 、180  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  振荡培养, 每隔 4 h 取样 1 mL, 12000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 2 min, 保留上清液, 进行气相色谱检测。

### 2.9 BX2 腈转化酶的活性测定

参考文献 (郝婷婷, 2005; 王平等, 2008) 测定酶活的方法, 对 BX2 的 24 h 培养物进行腈水合酶与腈水解酶总酶活和酰胺酶酶活的测定。腈水合酶与腈水解酶总酶活定义为: 每小时消耗 1  $\mu\text{mol}$  乙腈所需的细胞液或酶液的量为一个酶活力单位; 酰胺酶的酶活定义为: 每小时生成 1  $\mu\text{mol}$  乙酸所需的细胞液或酶液的量为一个酶活力单位。

### 2.10 腈水合酶与腈水解酶基因的克隆分析

利用红球菌腈水合酶基因和腈水解酶基因的 DNA 序列引物 (PN3: 5' CAGAATTCACGTCCCCGTACT3' PN4: 5' AAGGATCCGAAAGCGCGATG3'; N1: 5' AGG-

TACGCATATGGTCTGAATACACAA3' N2: 5' CAAGC TTCGAGTCAGATGGAGGC3') (Shi *et al.*, 2004; Luo *et al.*, 2010), 以 BX2 总 DNA 为模板进行 PCR 扩增。反应体系: 模板 DNA 2  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物各 2  $\mu\text{L}$ , 10  $\times$  Easy Taq buffer 5  $\mu\text{L}$ , Easy Taq DNA 聚合酶 0.5  $\mu\text{L}$ , 2.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  dNTPs 4  $\mu\text{L}$ , 加去离子水至 50  $\mu\text{L}$ 。腈水合酶条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 45 s, 56  $^{\circ}\text{C}$  退火 90 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 2 min, 35 个循环, 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min; 腈水解酶条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  退火 60 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 90 s, 30 个循环, 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。取 5  $\mu\text{L}$  PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 剩余 PCR 产物纯化后送至上海生工生物工程技术有限公司测序, 测序结果提交到 GenBank 进行比对分析。

## 3 结果 (Results)

### 3.1 不同因素对 BX2 生长和乙腈降解的影响

#### 3.1.1 碳、氮源对 BX2 生长和乙腈降解的影响

图 1a 表明, 外加有机碳、氮源均能促进 BX2 生长。培养 48 h 后, 补充葡萄糖组的生物量 ( $\text{OD}_{600}$ ) 最大, 蔗糖组和乙酰胺组次之, 尿素组的影响较小但均高于对照组。图 1b 表明, 外加碳、氮源对乙腈降解的影响主要体现在培养初期, 培养 8 h 时, 补充葡萄糖组的降解率为 92%, 蔗糖和乙酰胺组与对照组相近, 而尿素组仅为 7.67%; 培养至 16 h 时, 除葡萄糖组的降解率略有提高外, 其余各组的降解率均明显升高。此后继续延长培养时间, 乙腈降解率基本没有变化, 48 h 后降解率都可达到 97% 以上。

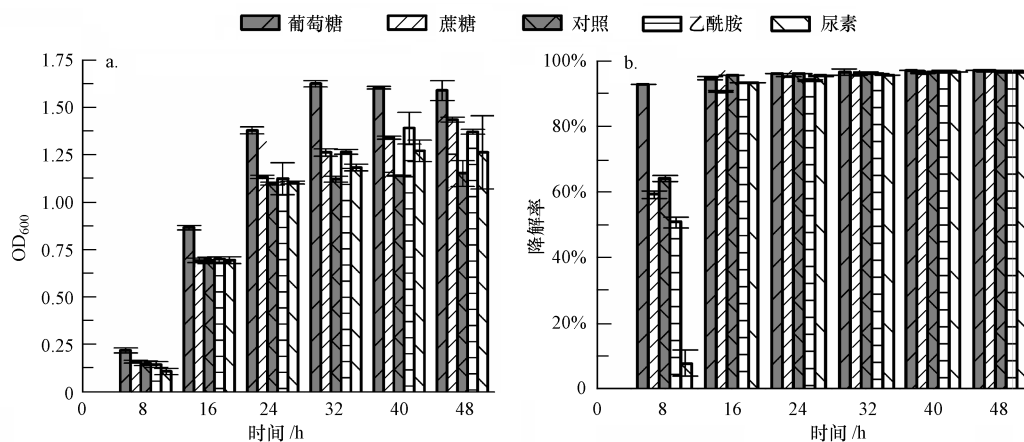


图 1 碳、氮源对 BX2 生长 (a) 和乙腈降解 (b) 的影响

Fig. 1 Effects of carbon and nitrogen source on the growth of BX2 (a) and acetonitrile degradation (b)

#### 3.1.2 不同环境因素对 BX2 生长和乙腈降解的影响

图 2 为各环境因素对 BX2 生长和乙腈降解的

影响情况。图 2a 所示, 菌体生物量 ( $\text{OD}_{600}$ ) 和乙腈降解率随培养时间的延长逐渐升高, 培养至 16 h 时菌

体  $OD_{600}$  为 0.694, 乙腈降解率为 95.87%; 此后, 继续延长培养时间, 虽然菌株的生物量略有上升, 但乙腈降解率几乎不变, 故选择 16 h 进行取样检测. 图 2b 所示, 当接种量小于 1.0% 时, BX2 的生物量和乙腈的降解率随接种量的增加而梯度上升, 当接种量大于 1.0% 时, 生物量继续上升, 但乙腈降解率的上升幅度较小, 从应用角度考虑, 以 1.0% 为最适接种量. 图 2c 表明, BX2 在 20~40 °C 范围内生长良好, 在 35 °C 时生物量和乙腈降解率均达到最大值,

分别为 0.694 和 95.82%, 在相邻的 30 °C 和 40 °C 条件下, BX2 的生物量及降解率均明显降低, 由此确定 35 °C 为 BX2 生长和乙腈降解的最适温度. BX2 能够适应的 pH 范围较宽, 在 pH = 5.5~9.0 均能生长(图 2d), 当初始 pH 为 5.5~6.0 时 BX2 生长极为缓慢, 乙腈降解率很低; 当 pH 为 7.5 时降解率达到最大值 95.98%, 此后 pH 继续增大, 生物量变化趋于平缓, 但乙腈降解率逐渐降低. 因此, pH = 7.5 为 BX2 生长及乙腈降解的最适 pH.

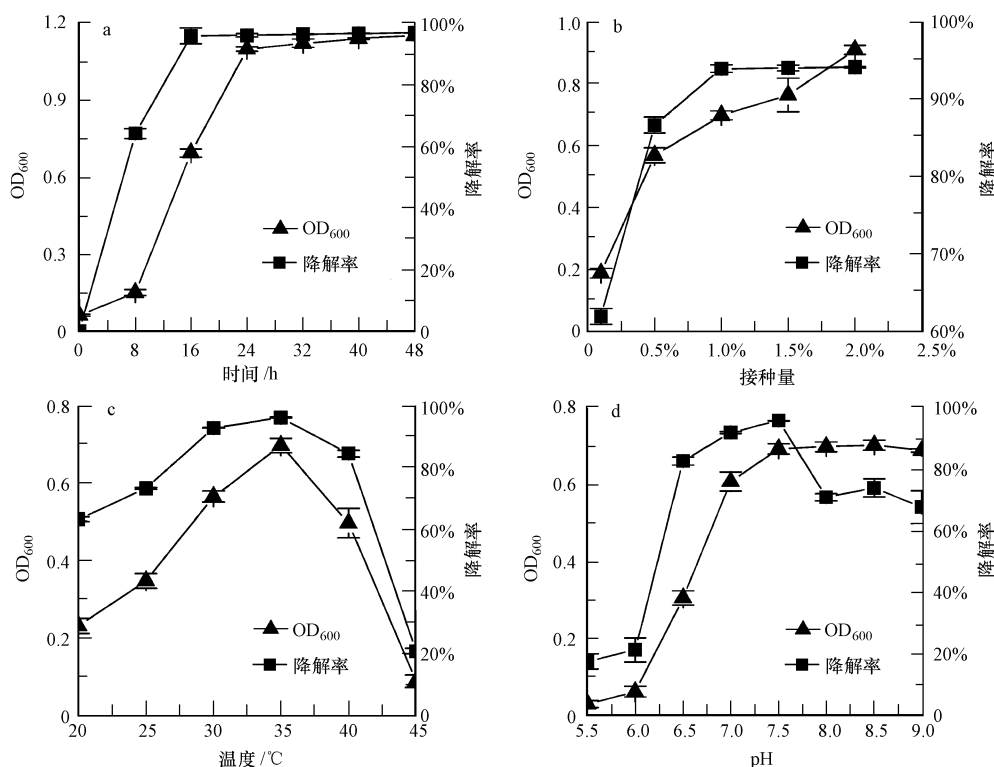


图 2 不同环境因素对 BX2 生长和乙腈降解的影响(a. 培养时间, b. 接种量, c. 温度, d. pH)

Fig. 2 Effect of different factors on the growth of BX2 and acetonitrile degradation (a. time, b. inoculum, c. temperature, d. pH)

### 3.2 BX2 对乙腈耐受能力的检测

BX2 对乙腈的耐受能力检测结果见图 3. 由图 3 可知, 当乙腈浓度为  $10000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时 BX2 的生物量达到最大, 培养 7 d 时  $OD_{600}$  可达到 1.573; 此后随着乙腈浓度的增大, BX2 的生物量逐渐降低, 当乙腈浓度超过  $25000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, BX2 的生物量急剧下降; 当乙腈浓度达到  $55000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时  $OD_{600}$  为 0.144, 而乙腈浓度达到  $60000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, BX2 基本不能生长,  $OD_{600}$  仅为 0.061. 由此可知,  $55000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  为 BX2 所能耐受的最高乙腈浓度.

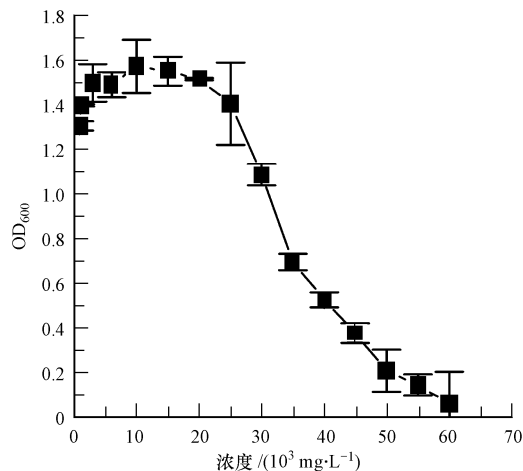


图 3 BX2 对乙腈的耐受性

Fig. 3 Tolerance of BX2 to acetonitrile

### 3.3 红球菌 BX2 在合成废水中的降解能力检测

图 4 结果表明,在乙腈终浓度为  $25000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的合成废水中,前 72 h 时 *Rhodococcus* sp. BX2 对乙腈的降解率较低,仅为 16.86%;72 h 后乙腈降解率

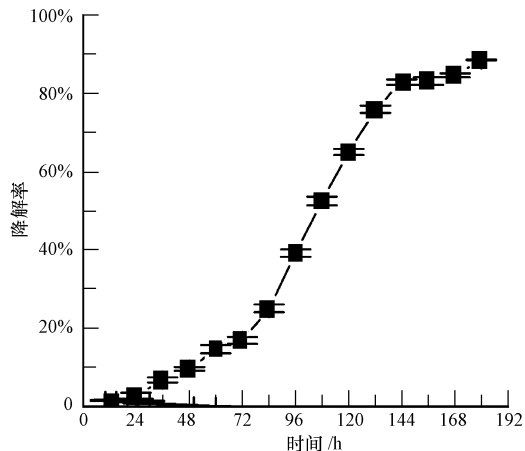


图 4 合成废水中乙腈的降解

Fig. 4 Degradation of acetonitrile by BX2 in synthesis wastewater

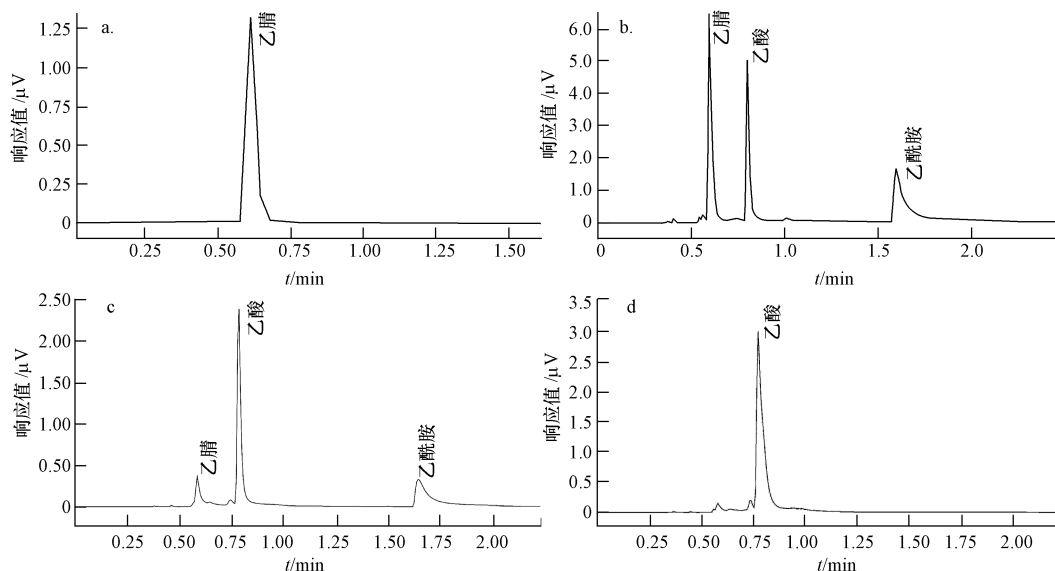


图 5 BX2 对乙腈降解产物分析 ( $\times 10000$ )

Fig. 5 Analysis of degradation products of acetonitrile by BX2 ( $\times 10000$ )

### 3.5 BX2 腈转化酶的活性测定

取 24 h 的 BX2 培养液进行腈水合酶与腈水解酶的总酶活及酰胺酶酶活测定,不同催化反应时间所得的实验结果如表 1 所示.由表 1 可知,随着反应时间的延长,各酶的酶活都逐渐增大,但酰胺酶活力远小于腈水合酶与腈水解酶的总酶活.当反应时间为 60 min 时,腈水合酶与腈水解酶总酶活达到  $422.81 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,而酰胺酶酶活却只有  $128.45 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

表 1 腈转化酶活力测定结果

Table 1 Detection of Nitrile-converting enzyme

时间/min	总酶活力/ $(\text{U} \cdot \text{mL}^{-1})$	酰胺酶活力/ $(\text{U} \cdot \text{mL}^{-1})$
10	$414.19 \pm 2.02$	$124.78 \pm 1.41$
30	$417.27 \pm 1.77$	$126.75 \pm 2.04$
60	$422.81 \pm 2.08$	$128.45 \pm 2.16$

迅速提高,144 h 时已达到 82.88%;此后,继续延长培养时间,降解率不再有显著变化,至 180 h 时乙腈的降解率达到了 88.59%.

### 3.4 BX2 对乙腈的降解产物分析及降解途径推测

乙腈降解产物分析的结果如图 5 所示.由图 5 可知,刚接入 BX2 时,培养液经气相色谱检测只能检测到乙腈(图 5a),且浓度很高,振荡培养 4 h 后,乙腈浓度降低,并同时检测到乙酰胺和乙酸(图 5b);继续培养,乙腈浓度大幅度下降,乙酸和乙酰胺含量略有降低,但明显高于乙腈含量(图 5c);随着培养时间的延长,乙腈和乙酰胺浓度逐渐下降直至不能检出(图 5d).由此推断,乙酰胺为乙腈降解过程中的中间产物,故推测 BX2 通过腈水合酶途径对乙腈进行降解.但由于腈水解酶途径降解乙腈的终产物与腈水合酶途径一致,均为乙酸和氨,因此无法排除 BX2 对乙腈降解过程中,有腈水解酶途径同时存在的可能性.

### 3.6 BX2 的腈水合酶与腈水解酶基因扩增及序列测定

从 BX2 基因组 DNA 中成功扩增到大小约为

1.1 kb 和 1.7 kb 的特异条带(图 6),测序结果表明,其大小依次为 1101bp 和 1690 bp. 将两个序列(JN255154, HQ388836)提交到 NCBI 进行 BLAST 同源性分析,结果显示,腈水解酶基因与 *Rhodococcus rhodochrous* tg6-A1 腈水解酶基因的 DNA 序列相似性为 98%;腈水合酶基因与 *Rhodococcus rhodochrous* J1 高分子量腈水合酶基因的 DNA 序列相似性可达到 99.60%. 由此可以判断,本研究中扩增出的片段依次为腈水解酶基因和腈水合酶基因.

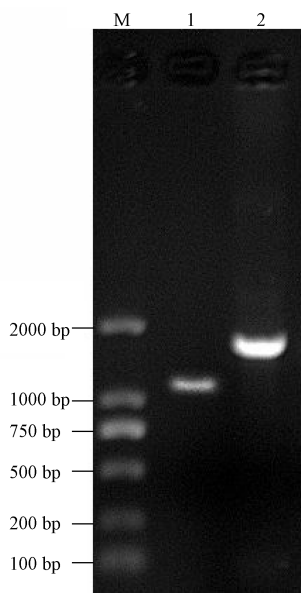


图 6 腈水解酶和腈水合酶基因的基因扩增结果(M:Marker;1. 腈水解酶基因;2. 腈水合酶基因)

Fig. 6 Amplification of nitrile hydrolase and nitrile hydratase genes (M: Marker; 1. nitrile hydrolase gene; 2. nitrile hydratase gene)

#### 4 讨论(Discussion)

通常情况下,微生物降解有机物的能力与碳、氮源营养、培养时间、接种量、温度、环境 pH 等因素均有一定的关系(Liu *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2010). 本研究考察了上述 5 个因素对 BX2 生长及乙腈降解的影响,并确定了 BX2 降解乙腈的最佳条件. 实验证实,在培养基中添加不同的碳氮源,都只会在短期对降解率产生影响,其中,葡萄糖产生的促进作用最强,培养 8 h 时,即可将乙腈降解 90% 以上,同时检测到 BX2 生长量也显著升高. 这可能是由于葡萄糖能够促进 BX2 快速生长,迅速提高菌体密度,进而加快对乙腈的分解和利用. 在最适降解条件下, BX2 可在乙腈浓度 800 ~ 55000 mg·L<sup>-1</sup> 的范

围内良好生长,即使在高浓度乙腈(25000 mg·L<sup>-1</sup>)的合成废水中仍能维持较高降解效率,表现出了其极强的底物耐受能力和降解能力,是一种十分理想的环境修复菌株.

微生物中所含有的腈转化酶主要包括腈水解酶、腈水合酶和酰胺酶,其对腈类化合物的降解主要通过两种途径,其一是将腈直接降解为酸和氨,即腈水解酶途径;其二是先将腈降解为酰胺,然后在酰胺酶的作用下降解为酸和氨,即腈水合酶途径(娄文勇等, 2001). 目前已知能产生腈水合酶的菌株有 *R. erythropolis* (Park *et al.*, 2006)、*Brevibacterium imperialis* CBS 489-74 (Alfani *et al.*, 2001)、*Nocardia* sp. (Liu *et al.*, 2004)、*P. putida* *R. rhodococcus* J1、*Ps. thermophila*、*B. smithii*、*Bacillus* sp. BR449 (Kim *et al.*, 2000) 等;产腈水解酶的菌株有 *Acidovorax facilis* 72W、*Agrobacterium radiobacter*、*Aliccaligenes faecalis* ATCC 8750、*Bacillus pallidus* Dac521、*Comamonas testoteroni*、*Nocardia* C21421、*Pseudomonas fluorescens* DSM7155 等(舒志愚, 2010). 但已报道的同时存在腈水解酶和腈水合酶活性的菌株资源却比较稀少(Lee *et al.*, 2009).

本研究对降解过程中的产物进行气相色谱分析,除检测到乙腈含量变化外,还检测到了乙酸和乙酰胺的存在,且发现乙酰胺随培养时间的延长逐渐消失. 因此,判断乙酰胺为 BX2 降解乙腈过程中的中间产物,并推断 BX2 通过腈水合酶途径降解乙腈. 但腈水解酶途径的终产物与腈水合酶途径一致,均为乙酸和氨,所以不排除同时存在腈水解酶降解途径的可能性,故对 BX2 进行了腈转化酶活力测定. 由于酰胺酶的存在,无论是通过计算方法,还是检测方法,都无法精确测定出腈水合酶或腈水解酶各自的活力,因此,对 BX2 腈水合酶与腈水解酶的总酶活和酰胺酶酶活进行分别测定. 结果显示,总酶活远高于酰胺酶酶活,且反应过程中检测到的终产物乙酸含量始终远高于中间产物乙酰胺含量,由此推测,在 BX2 中同时存在腈水合酶和腈水解酶. 因此,对 BX2 进行了两种酶的基因扩增和序列测定.

本研究成功扩增出了腈水解酶及腈水合酶基因,通过 NCBI 网站序列对比,发现这两个基因序列分别与 *Rhodococcus rhodochrous* tg6-A1 腈水解酶基因序列和 *Rhodococcus rhodochrous* J1 高分子量腈水合酶基因序列高度相似,相似性依次为 98%、

99.60%,证实了 BX2 中同时存在腈水解酶基因和腈水合酶基因.确定 BX2 通过腈水合酶途径降解乙腈,同时可能存在腈水解酶降解途径.

乙腈的衍生物种类繁多,其中很多是合成重要工业原料的基础物质,如羟基乙腈、羟基苯乙腈、苯胺基乙腈等,它们除了与乙腈具有相似的物理化学性质外,也同样具有腈化物特有的毒副作用.虽然这些衍生物的取代基结构不同,但其在应用过程中所发生的水解或水合反应均与乙腈的降解过程类似,通过腈水合酶途径或腈水解酶途径实现 CN-基团的转化,得到相应的酰胺或酸,其酶促反应条件也与本研究中的条件相近,且本研究已证实了 BX2 具有较高腈转化酶活性,因此,该菌株存在着对乙腈衍生物降解的可能性,使其在污染环境修复中有更好的应用前景.

## 5 结论(Conclusions)

1) *Rhodococcus* sp. BX2 降解乙腈的最适条件为接种量 1.0%、培养温度 35 °C、环境 pH = 7.5,在此条件下,16 h 可将终浓度为 800 mg·L<sup>-1</sup>的乙腈降解 95.98%;BX2 可耐受 55000 mg·L<sup>-1</sup>的乙腈,在乙腈浓度为 25000 mg·L<sup>-1</sup>的合成废水中,培养 180 h 时乙腈降解率可达 88.59%.

2) *Rhodococcus* sp. BX2 中同时含有腈水解酶基因和腈水合酶基因,确定该菌株以腈水合酶途径降解乙腈,可能同时存在腈水解酶降解途径.

**责任作者简介:**李春艳(1970—),女,博士,教授,博士生导师,主要研究方向:环境微生物与环境生物修复. E-mail: chunyanli@neau.edu.cn.

## 参考文献(References):

Alfani F, Cantarella M, Spera A, *et al.* 2001. Operational stability of *Brevibacterium imperialis* CBS489-74 nitrile hydratase[J]. *Journal of Molecular Catalysis (B: Enzymatic)*, 11(4/6): 687-697

Bhalla T C, Kumar H. 2005. *Nocardia globerula* NHB-2: a versatile nitrile-degrading organism [J]. *Can J Microbiol*, 51(8): 705-708

白聪丽,张奔,罗艳. 2010. 高纯乙腈的应用及其提纯与精制工艺[J]. *山东化工*, 39(3):22-27

Bai C L, Zhang B, Luo Y. 2010. Application of high-purity acetonitrile and its purification and refining processes [J]. *Shandong Chemical Industry*, 39(3): 22-27 (in Chinese)

邓林. 2005. 微生物降解丙腈腈及腈水合酶的研究[D]. 成都:四川大学. 56-58

Deng L. 2005. Microorganism biodegradation of acrylonitrile and nitrile hydratase[D]. Chengdu: Sichuan University. 56-58 (in Chinese)

方萍,徐德强,张亚雷,等. 2005. 诺卡氏菌株 C21421 中腈水解酶基因的鉴定、测序及分析[J]. *环境科学学报*, 25(10): 1414-1417

Fang P, Xu D Q, Zhang Y L, *et al.* 2005. Identification, sequencing and analysis of the Nitrilase Gene from *Nocardia* sp. C21421 [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 25(10): 1414-1417 (in Chinese)

宫晓燕. 2008. 乙腈后续产品加工利用综述[J]. *齐鲁石油化工*, 36(3): 226-230

Gong X Y. 2008. Overview of processing and utilization of acetonitrile downaertam products [J]. *Qilu Petrochemical*, 36(3): 226-230 (in Chinese)

郝婷婷. 2005. 腈转化酶及其腈纶纤维表面改性[D]. 上海:东华大学. 15-25

Hao T T. 2005. Nitrile converzymes and surface modification on polyacrylic fiber [D]. Shanghai: Donghua University. 15-25 (in Chinese)

Jin L Q, Liu Z Q, Zheng Y G, *et al.* 2010. Identification and characterization of *Serratia marcescens* ZJB-09104, a nitrile-converting bacterium [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 26: 817-823

Kjeldsen P. 1999. Behaviour of cyanides in soil and groundwater: A review water, air, and soil pollution [J]. *Earth and Environmental Science*, 115: 278-308

Kim S H, Oriol P. 2000. Cloning and expression of the nitrile hydratase and amidase genes from *Bacillus* sp. BR449 into *Escherichia coli* [J]. *Enzyme Microb Technol*, 27: 492-501

Lee C, Adrienne C, Patrick D, *et al.* 2009. Isolation of identical nitrilase genes from multiple bacterial strains and real-time PCR detection of the genes from soils provides evidence of horizontal gene transfer [J]. *Arch Microbiol*, 191: 761-771

Li T G, Liu J X, Bai R B, *et al.* 2007. Biodegradation of organonitriles by adapted activated sludge consortium with acetonitrile-degrading microorganisms [J]. *Water Research*, 41: 3465-3473

Li T G, Bai R B, Ohandja D G, *et al.* 2009. Biodegradation of acetonitrile by adapted biofilm in a membrane-aerated biofilm reactor [J]. *Biodegradation*, 20:569-580

Liu M, Li C, Huang X, *et al.* 2004. Purification of nitrile hydratase from *Nocardia* sp. [J]. *Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities*, 18(3): 324-328

Liu Z Q, Li Y, Ping L F, *et al.* 2007. Isolation and identification of a novel *Rhodococcus* sp. ML-0004 producing epoxide hydrolase and optimization of enzyme production [J]. *Process Biochem*, 42: 889-894

娄文勇,宗敏华,刘森林. 2001. 微生物酶催化腈水解反应的研究进展[J]. *微生物学通报*, 28(6): 76-81

Lou W Y, Zong M H, Liu S L. 2001. Research progress on enzymatic hydrolysis of nitrile [J]. *Microbiology*, 28(6): 76-81 (in Chinese)

Luo H, Fan L, Chang Y H, *et al.* 2010. Gene cloning, overexpression, and characterization of the nitrilase from *Rhodococcus rhodochrous* tg1-A6 in *E. coli* [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 160: 393-400

Park H J, Park H, Rutger J F, *et al.* 2006. Characterization of nitrile-hydrolyzing enzymes produced from *Rhodococcus erythropolis* [J].

- Korean Society for Microbiology and Biotechnology, 34(3): 204-210
- Shi Y, Yu H M, Sun X D, *et al.* 2004. Cloning of the nitrile hydratase gene from *Nocardia* sp. in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* and its functional expression using site-directed mutagenesis [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 35: 557-562
- 舒志愚. 2010. 产腈水解酶菌株的筛选及其培养条件优化[D]. 开封:河南大学. 2-5
- Shu Z Y. 2010. Selection of nitrilase-producing strains and optimization of the culture conditions [D]. Kaifeng: Henan University. 2-5 (in Chinese)
- Sorokin D Y, Pelt S, Tourova T P, *et al.* 2007. Acetonitrile degradation under haloalkaline conditions by *Natronocella acetinitrilica* gen. nov., sp. nov. [J]. *Microbiology*, 153: 1157-1164
- 王平, 陆大年. 2008. 红球菌的优化培养与腈纶改性用粗酶液的提取及应用[J]. *印染助剂*, 25(10): 38-41
- Wang P, Lu D N. 2008. The culture optimization of *Rhodococcus*. SP, extraction and application of crude enzyme on modification of acrylic fibers[J]. *Textile Auxiliaries*, 25(10): 38-41 (in Chinese)
- 谢树华, 杨惠芳. 1990. 不动杆菌(*Acinetobacter* sp.) 51-2 降解乙腈的研究[J]. *微生物学报*, 30(6): 471-474
- Xie S H, Yang H F. 1990. Degradation of acetonitrile by *Acinetobacter* sp. 51-2 [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 30(6): 471-474 (in Chinese)