

一株孔雀石绿降解菌的分离鉴定及降解特性*

梅 媛 洪 青** 李顺鹏

(南京农业大学生命科学学院, 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室 南京 210095)

摘 要 从某化工厂的废水处理池污泥中分离到一株孔雀石绿降解菌, 命名为K4-W. 根据生理生化特征和16S rRNA基因序列相似性分析, 将其初步鉴定为*Raoultella* sp. 该菌在48 h内对20 mg/L的孔雀石绿降解率为82.5%, 降解孔雀石绿的最适温度为30 ℃, 外加碳源或Pb²⁺对其降解有明显的促进作用, 增大接种量也有利于提高降解效率, 较高浓度的孔雀石绿则对降解有抑制作用. 该菌在降解过程中没有生成无色孔雀石绿, 这不同于已报道的孔雀石绿降解途径, 但该菌是否具有新的降解途径还需进一步研究. 图3 参24

关键词 孔雀石绿; 生物降解; 降解途径; *Raoultella* sp.; 废水处理

CLC X172

Isolation, Identification and Characterization of a Malachite Green-degrading Bacterium*

MEI Huan, HONG Qing** & LI Shunpeng

(Key Laboratory of Microbiological Engineering Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract A bacterial strain capable of degrading malachite green was isolated from the sludge sample collected from wastewater treating system of a chemical plant, and it was designated as strain K4-W. According to the similarity analysis of its 16S rRNA gene sequence (GenBank Accession No. EU876828) and physiological-biochemical characteristics, it was preliminarily identified as *Raoultella* sp. Strain K4-W could degrade 82.5% of 20 mg/L malachite green within 48 h. The optimal temperature for the degradation was 30 ℃. The addition of Pb²⁺ or other carbon sources could promote the degradation significantly. The increasing in inoculum also showed promoting effect on the degradation. The high concentration of malachite green would inhibit the degradation. No leucomalachite green appeared during the degradation process, which was different from the reported malachite green degrading pathway. Therefore, a further study was needed to verify whether strain K4-W harbored a new degradation pathway. Fig 3, Ref 24

Keywords malachite green; biodegradation; degrading pathway; *Raoultella* sp.; wastewater treatment

CLC X172

孔雀石绿 (Malachite Green, MG) 又称碱性绿、盐基块绿、孔雀绿, 常作为染料被用于制陶业、纺织业、皮革业和细胞染色^[1]. 由于具有抗菌杀虫作用, 自1933年起孔雀石绿又被作为驱虫剂、杀菌剂、防腐剂在水产养殖中广泛使用^[2-3]. 但近年来国内外相关研究表明, 孔雀石绿及其代谢产物无色孔雀石绿在鱼体内和环境中残留时间长, 其化学官能团——三苯甲烷被确证具有高毒、高残留、“三致”等毒副作用^[4-7]. 因此, 孔雀石绿已经在美国、日本、欧盟等许多国家和组织被明令禁止用于水产养殖, 但由于其价格低廉, 抗菌杀菌效果显著, 在实际生产中仍被违规使用^[8-10]. 对英国、荷兰和中国市场上的水产品随机抽样, 发现孔雀石绿仍旧存在残留超标的现象^[11-13]. 目前, 关于如何消除水源中的孔雀石绿污染已成为环境科学和公共卫生安全领域关注的热点.

孔雀石绿废水处理的方法主要有吸附法、生物法和光

催化法^[14]. 其中以微生物降解为基础的生物法是一种环境友好型处理方式, 该方法关键在于获得具有孔雀石绿降解功能的微生物. 目前已报道的孔雀石绿降解菌主要有库特氏菌、柠檬酸杆菌以及假单胞菌等^[15-18], 但未见有关*Raoultella*属菌株降解孔雀石绿的研究报道. 本研究从化工厂废水处理池中分离到一株孔雀石绿降解菌, 将其初步鉴定为*Raoultella* sp., 并研究了其降解特性, 丰富了孔雀石绿降解菌资源.

1 材料与方法

1.1 培养基与试剂

基础盐培养基 (MSM, g/L): NaCl 1.00, NH₄NO₃ 1.00, K₂HPO₄ 1.50, KH₂PO₄ 0.50, MgSO₄·7H₂O 0.10, 以孔雀石绿 (MG) 为唯一碳源, 浓度视需要添加.

LB培养基 (g/L): 酵母膏 5.00, 蛋白胨 10.00, NaCl 10.00.

孔雀石绿 (MG), 纯度>90%, 购自SIGMA公司 (德国), 其他化学试剂均为分析纯.

1.2 菌株分离

将取自某化工厂废水处理池中的污泥5 g置于100 mL的基础盐培养基 (MG浓度为20 mg/L) 中, 于30 ℃、180 r/min培养5 d, 然后每5 d以4%的接种量转接到相同的培养基中, 连

收稿日期: 2009-07-29 接受日期: 2009-08-31

*国家“863计划”项目 (No. 2007AA061101) 和科技部自然科技资源平台项目 (No. 2005DKA21201-2) 资助 Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (No. 2007AA061101) and the National Technology Platform Program of the Ministry of Science & Technology of China (2005DKA-21201-2)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: hongqingnjau@yahoo.com.cn)

续传3次.然后取0.5 mL富集液梯度稀释,取 10^{-4} ~ 10^{-6} 稀释度的液体各0.15 mL涂布于20 mg/L的MG固体基础盐培养基上,30℃培养3 d后,挑取周围有透明圈的单菌落对其进行纯化后再验证其降解性能.

1.3 菌株鉴定

菌株的形态及生理生化特性测定参照文献[19]进行.菌株16S rRNA基因的克隆及序列测定和比较参照文献[20]进行,提取K4-W的基因组DNA作为模板,进行16S rRNA基因的扩增,正向引物:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',反向引物:5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3';50 μL体系为:模板1 μL, dNTP (25 mmol/L) 4 μL, 引物 (1 mmol/L) 各1 μL, 10×Taq缓冲液5 μL, Mg^{2+} (25 mmol/L) 4 μL, Taq酶 (5 U/μL) 0.5 μL, 用超纯水补至50 μL. PCR反应条件:95℃, 5 min; 94℃, 30 s; 55℃, 1 min; 72℃, 1 min; 循环30次, 72℃延伸10 min. 采用PCR回收试剂盒回收扩增片段, 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物的大小 (1.5 kb左右) 后, 将其TA克隆后进行测序 (由上海英骏生物技术有限公司完成). 将测序结果与GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 及其Ribosomal Database Project II (<http://rdp.cme.msu.edu>) 上的相关16S rRNA基因序列进行同源性比对分析.

1.4 MG和LMG (无色孔雀石绿) 测定

取培养液2 mL置于具塞的玻璃磨口试管中, 加入5 mL二氯甲烷, 剧烈振荡后静置分层, 弃去上层水相, 有机相经无水 Na_2SO_4 脱水后, 采用UV紫外-可见分光光度计 (PC-2450) 检测, MG和LMG的检测波长分别为在622nm和269 nm. 依据检测结果按照标准曲线换算培养液中孔雀石绿含量, 再根据降解率计算公式计算降解能力[21].

1.5 菌体生长量测定

由于MG在622 nm处的吸收峰会干扰 $D_{600\text{ nm}}$ 的测定, 故本实验采用稀释涂平板的方法来衡量菌株的生长量. 取0.1 mL培养液进行梯度稀释后涂布于LB平板上培养24 h, 对菌落计数.

2 结果与分析

2.1 菌株分离及其生理生化特性

经过富集培养和纯化, 获得一株能降解MG的细菌, 命名为K4-W. 该菌为革兰氏阴性, 短杆状, 无鞭毛, 菌体大小为 $(0.6\sim0.8)\mu\text{m} \times (1.0\sim1.2)\mu\text{m}$; 在LB板上1 d形成1.0~1.5 mm的菌落, 菌落为圆形, 表面凸起、呈乳白色, 粘稠, 不透明, 有光泽, 光滑, 边缘整齐. 该菌为兼性厌氧, 氧化酶阴性, VP试验阳性, MR试验阴性, 不产吡嗪, 不水解淀粉, 不液化明胶, 利用葡萄糖、乳糖和蔗糖, 柠檬酸盐试验及苯丙氨酸脱氨酶试验为阴性.

2.2 菌株16S rRNA基因序列分析

以菌株K4-W的基因组DNA为模板, 用细菌16S rRNA基因通用引物进行PCR扩增, 得到长度约为1.5 kb的扩增产物, 测序后在GenBank上登陆, 序列号为EU876828, 和其他菌株16S rRNA基因的同源性比较结果显示, 菌株K4-W与*Raoultella planticola*^T (GenBank Accession No. AF129443) 相似性为99.9%, 与*R. ornithinolytica*^T (GenBank Accession No. AF129441) 相似性99.6%, 结合生理生化特征将该菌初步鉴

定为*Raoultella* sp.

2.3 菌株K4-W对MG的降解

在孔雀石绿浓度为20 mg/L的基础盐培养基中, 以3%的接种量接入用MSM缓冲液洗涤2次的在LB培养基中培养的K4-W种子液 ($A_{600\text{ nm}} \approx 1.00$), 于30℃、180 r/min摇床培养, 每隔6 h取样, 测定MG、LMG浓度和菌体的生长量. 从图1中可见, 在48 h内K4-W可以将MG降解82.5%, 在孔雀石绿被降解的同时, 没有伴随无色孔雀石绿的生成, 这不同于已报道的孔雀石绿降解途径, 但是该菌是否具有新的降解途径, 还需要进一步研究. 菌体数量在降解过程中呈正相关增加.

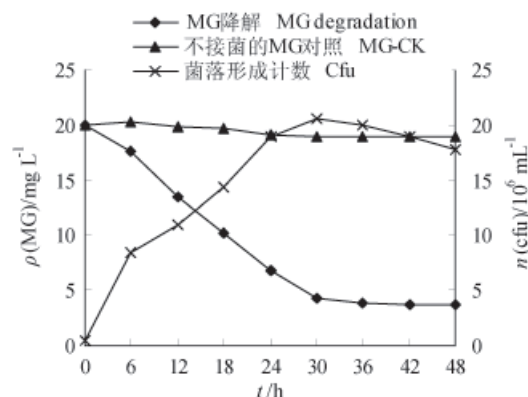


图1 菌株K4-W对MG的降解情况
Fig.1 Degradation of MG by strain K4-W

2.4 MG起始浓度对K4-W降解MG的影响

在MSM中加入MG, 使起始浓度分别为5、10、20、30、50 mg/L, 以3%的接种量接入用MSM洗过的K4-W种子液 ($A_{600\text{ nm}} \approx 1.00$), 于30℃、180 r/min的摇床培养, 每隔一段时间取样, 测定MG的浓度. 从图2-A中可以看出, K4-W对较低浓度的MG有较好的降解效率, 对5 mg/L的降解率达85%; 当MG浓度超过20 mg/L后, 降解效率明显降低, 不到50%, 这可能与高浓度MG对菌体生长产生抑制有关.

2.5 接种量对菌株K4-W降解MG的影响

在MG浓度为20 mg/L的MSM中, 分别按1%、3%、5%、10%、15%接入用MSM洗过的种子液 ($A_{600\text{ nm}} \approx 1.00$), 于30℃、180 r/min的摇床培养, 每隔一段时间取样, 测定MG的浓度. 实验结果表明, 接种量越大, 降解速率越快, 接种量与降解效率和速率成正相关 (图2-B).

2.6 温度对K4-W降解MG的影响

在MG浓度为20 mg/L的MSM中, 以3%的接种量分别接入用MSM洗过的K4-W种子液 ($A_{600\text{ nm}} \approx 1.00$), 在不同的温度下以180 r/min摇床培养, 48 h后取样测定MG浓度, 结果如图2-C显示, 菌株K4-W在较高温度下对MG的降解效果差, 30℃时的降解效果最好.

2.7 金属离子对K4-W降解MG的影响

基础盐培养基中分别加入 $Al_2(SO_4)_3$ 、 $FeSO_4$ 、 Li_2SO_4 、 $MnSO_4$ 、 $PbSO_4$ 、 $ZnSO_4$, 使金属离子初始浓度为0.5 mmol/L, 设立不加金属离子的作为阴性对照 (CK). 按3%接种量接种用MSM洗过的K4-W的种子液 ($A_{600\text{ nm}} \approx 1.00$) 于各瓶中, 摇床培养48 h后取样测定MG浓度. 结果如图2-D, 0.5 mmol/L的多数金属离子对MG的降解均有抑制影响, Mn^{2+} 抑制最强, 唯

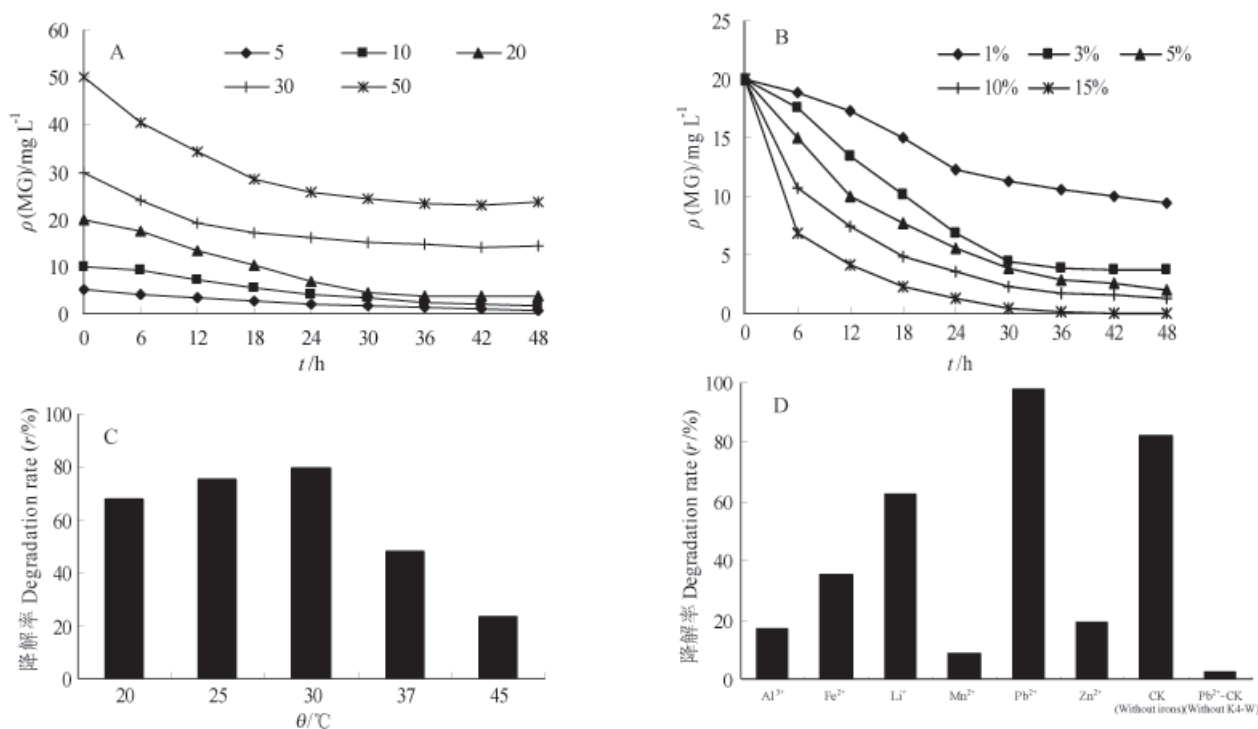


图2 不同条件对K4-W降解孔雀石绿的影响

Fig. 2 Effect of different conditions on MG degradation by strain K4-W

A: MG初始浓度; B: 接种量; C: 温度; D: 金属离子 A: Initial concentration of MG; B: Inoculum; C: Temperature; D: Different metal ions

有Pb²⁺对K4-W降解MG有促进作用。因此,再设置含Pb²⁺但不接菌的降解样作对照,证明单独Pb²⁺不能促进MG的降解。

2.8 不同碳、氮源对K4-W降解MG的影响

在MSM中分别加入葡萄糖、乳糖、淀粉、蛋白胨、酵母膏、硝酸铵和硫酸铵,含量均为1%。以3%的接种量接入用MSM洗过的菌液($A_{600\text{ nm}} \approx 1.00$),摇床培养48 h,定时取样测定K4-W的生长和MG的降解情况。如图3所示,蛋白胨与酵母膏能提供比较丰富的碳氮源,因此生长量高,降解效率也很好。碳源中淀粉利用率相对较弱,有机氮源利用明显好于无机氮源。总的来看,碳源能有效促进生长并提高降解速率,

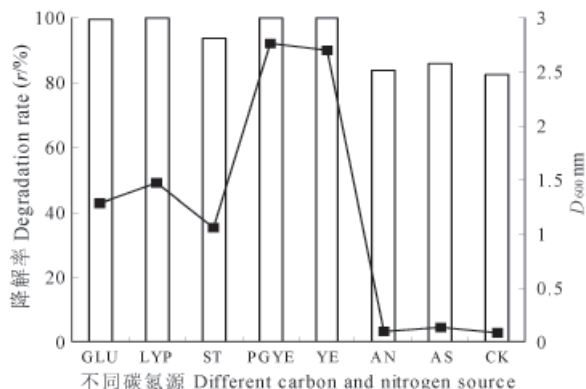


图3 不同碳氮源对K4-W生长和降解孔雀石绿的影响

Fig. 3 Effect of different carbon and nitrogen sources on MG degradation by strain K4-W

GLU: 葡萄糖; LYP: 乳糖; ST: 淀粉; PGYE: 蛋白胨; YE: 酵母膏; AN: 硝酸铵; AS: 硫酸铵; CK: 不添加碳氮源

GLU: Glucose; LYP: Lactose; ST: Starch; PGYE: Peptone; YE: Yeast extract; AN: NH₄NO₃; AS: (NH₄)₂SO₄; CK: Without carbon and nitrogen sources

3 结论

长期以来,孔雀石绿作为染料及杀菌剂被广泛使用,其代谢产物的致癌致突变性已引起各方关注,但由此造成的环境污染一直未能解决,寻求微生物降解是最为安全有效的途径^[22]。目前已从*Kurthia* sp.、*Citrobacter* sp.和*Pseudomonas* sp.等中分离到一些孔雀石绿降解菌^[15-18]。本实验分离得到一株降解菌K4-W,经16S rRNA基因序列相似性分析并结合生理生化分析将其初步鉴定为*Raoultella* sp.,这是首次从*Raoultella* sp.发现孔雀石绿降解菌。它在48 h内对20 mg/L的MG降解率为82.5%,外源碳源和外加Pb²⁺能够有效地提高其降解能力。有研究报道*Citrobacter* sp.和*Pseudomonas* sp.在降解MG过程中是先将MG转化为LMG,再继续降解^[23-24],菌株K4-W在降解MG的过程中并没有LMG的生成,因此该菌株中可能存在新的降解途径,但还需进一步研究。

References

- Culp SJ, Beland FA. Malachite green: A toxicological review. *Am Coll Med Toxicol*, 1996, **15**: 219-238
- Alderman DJ. Malachite green: Review. *Fish Dis*, 1985, **8**: 289-298
- Srivastava S, Sinha R, Roy D. Toxicological effects of malachite green. *Aquat Toxicol*, 2004, **66** (5): 319-329
- Meyer FP, Jorgensen TA. Teratological and other effects of malachite green on the development of rainbow trout and rabbits. *Trans Am Fish Soc*, 1983, **112** (6): 818-824
- Fernandes C, Lalitha VS, Rao KVK. Enhancing effects of malachite green on development of hepatic preneoplastic lesions induced by

- N-nitrosodiethylamine in rats. *Carcinogenesis*, 1991, **12**: 839~845
- 6 Rao KVK. Inhibition of DNA synthesis in primary rat hepatocyte cultures by malachite green: a new liver tumor promoter. *Toxicol Lett*, 1995, **81** (2~3): 107~113
- 7 Gouranchat C. Malachite green in fish culture (state of the art and perspectives). Nantes France: Bibliographic studies. Veterinaire ENVT Ecole Natl, 2000. 142
- 8 Schnick RA. The impetus to register new therapeutic agents for aquaculture. *Progr Fish Cult*, 1988, **50**: 190~196
- 9 The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF). Annual Report 2005. Luxembourg: Official Publications of the European Communities, 2006. 25~34
- 10 Sudova E, Machova J, Svobodova Z. Negative effects of malachite green and possibilities of its replacement in the treatment of fish eggs and fish: A review. *Veter Med*, 2007, **52**: 527~539
- 11 Annual Report on Surveillance for Veterinary Residues in 1995. UK: PB Ministry of Agriculture, Fisheries and Food., 1996. 2756
- 12 Bergwerff AA, Scherpenisse P. Determination of residues of malachite green in aquatic animals. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2003, **788**: 351~359
- 13 Lin H (林洪), Fu XT (付晓婷), Qiu XJ (邱绪建), Jiang J (江洁), Li ZX (李振兴). Determination of residues of malachite green, gentian violet and their metabolites in fish tissues by high performance liquid chromatography. *Period Ocean Univ China* (中国海洋大学学报), 2006, **36**: 919~922
- 14 Chen RB (陈若冰). Research on treatment of concentrated malachite green dye wastewater by microwave radiation: [Master Degree Dissertation]. Chengdu, China: Sichuan Normal University (成都: 四川师范大学), 2007
- 15 Rajesh KS, Uttam CB. Decolorization of triphenylmethane dyes and textile and dye-stuff effluent by *Kurthia* sp. *Enzym & Microb Technol*, 1999, **24**: 433~437
- 16 Sun YA, Sang-KM, In-HC. Decolorization of triphenylmethane and azo dyes by *Citrobacter* sp. *Biotechnol Lett*, 2002, **24**: 1037~1040
- 17 Lin SF (林少芳), Yu P (余萍), Lin YM (林玉满). Study on decolorization of malachite green by a *Pseudomonas aeruginosa*. *J Fujian Norm Univ* (福建师范大学学报), 2004, **20** (4): 72~75
- 18 Li Y (李怡), He S (何珊), Cao HP (曹海鹏), Yang XL (杨先乐). Isolation, identification and growth characteristics of *Pseudomonas putida* strain M6 with malachite green decolorization. *Microbiology* (微生物学通报), 2009, **36** (1): 57~63
- 19 Dong XZ (东秀珠), Cai MY (蔡妙英). 常见细菌系统鉴定手册. Beijing, China: Science Press (北京: 科学出版社), 2001. 370~410
- 20 Ausubel F, Brent R, Kingston RE. Short Protocols in Molecular Biology. (颜子颖.) Beijing, China (北京: 科学出版社), 1999. 39~40
- 21 Cheng W (成文), Zeng BQ (曾宝强). Microbial decolorization of malachite green. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2009, **15** (4): 370~373
- 22 Li N (李妮), Li Z (李张), Li MX (李明雄), Yang K (杨昆), Ma H (马寒), Yang ZR (杨志荣). Decolorization and degradation of malachite green by a strain of *Achromobacter* sp. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2009, **15** (4): 529~533
- 23 Jang MS, Lee YM, Kim CH. Triphenylmethane reductase from *Citrobacter* sp. strain KCTC 18061P: Purification, characterization, gene cloning, and over expression of a functional protein in *Escherichia coli*. *Appl & Environ Microbiol*, 2005, **12**: 7955~7960
- 24 Li LT, Hong Q, Yan X, Fang GH, Shinawar Waseem Ali, Li SP. Isolation of a malachite green-degrading *Pseudomonas* sp. MDB-1 strain and cloning of the *tmr2* gene. *Biodegradation*, 2009, **20**: 769~776