

孔雀石绿降解菌 *Arthrobacter* sp. M6 的 分离及降解特性*

房桂华 李联泰 李荣 朱建春 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 从活性污泥中分离得到一株能以孔雀石绿为唯一碳源和能源生长的细菌M6, 根据其形态、生理生化特性以及16S rRNA基因序列相似性分析结果, 将其初步鉴定为节杆菌属 (*Arthrobacter* sp.). 该菌株在12 h内对20 mg/L的孔雀石绿降解率高于80%; 降解孔雀石绿的最适pH为7.0, 最适温度为30 °C, 降解速率与初始接种量呈正相关. 研究结果对于孔雀石绿的生物降解以及含孔雀石绿废水的处理具有重要意义. 图6 参20

关键词 孔雀石绿; 生物降解; 节杆菌属; 降解特性; 废水处理

CLC X172

Isolation and Characterization of a Malachite Green-degrader *Arthrobacter* sp. M6*

FANG Guihua, LI Liantai, LI Rong, ZHU Jianchun, 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, designated M6, capable of utilizing malachite green as sole carbon source was isolated from the activated sludge sample collected from wastewater-treating system of a dye manufacturer. It was preliminarily identified as *Arthrobacter* sp. according to its morphological, physiological and biochemical characters and similarity analysis of 16S rRNA gene sequences. Strain M6 could degrade more than 80% of 20 mg/L malachite green within 12 h. The optimal pH and temperature for the degradation were 7.0 and 30 °C, respectively. The degrading rate showed a positive correlation to the initial inoculum size. All these results showed some scientific significance to both biodegradation of malachite green and study on the treatment of wastewater containing malachite green. Fig 6, Ref 20

Keywords galachite green; biodegradation; *Arthrobacter* sp.; degradation characteristics; wastewater treatment

CLC X172

孔雀石绿 (Malachite green, MG) 是一种合成的三苯甲烷类工业染料, 广泛用于制陶业、纺织业、皮革业、食品色素剂和细胞化学染色剂等领域^[1], 水产上主要作为驱虫剂、杀菌剂、防腐剂用于预防和治疗各类水产动物的水霉病、鳃霉病和小瓜虫病等, 特别在控制和预防水霉病上具有明显的疗效^[2-3]. 从上世纪90年代开始, 国内外学者陆续研究发现, 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, 它们分子中含有的化学官能团——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, 在我国农业部发布的《食品动物禁用的兽药及其他化合物清单》上, 孔雀石绿属于禁用药物.

以微生物降解为基础的生物修复技术是消除环境中孔雀石绿污染的有效方法. 目前已报道的孔雀石绿降解菌主要有酵母菌 (*Pseudozyma rugulosa*) 和细菌中的假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.)、芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.) 等^[8-16], 但很少见节杆菌属 (*Arthrobacter* sp.) 的细菌降解孔雀石绿的报

道. 本研究从处理印染废水的活性污泥中分离到1株以孔雀石绿为唯一碳源生长的细菌M6, 将其初步鉴定为节杆菌属 (*Arthrobacter* sp.), 并对其降解特性进行了初步研究. 该菌株的获得丰富了孔雀石绿降解菌株的多样性, 并为孔雀石绿污染废水的处理提供了菌株资源.

1 材料与方法

1.1 培养基与试剂

基础盐培养基 (MSM, $\rho/g L^{-1}$): NaCl 1.00, NH_4NO_3 1.00, K_2HPO_4 1.50, KH_2PO_4 0.50, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.10, pH 7.0, 以孔雀石绿作为碳源, 浓度视需要添加. LB培养基 ($\rho/g L^{-1}$): 酵母膏 5.00, 蛋白胨 10.00, NaCl 10.00 (固体加1.5%的琼脂), pH 7.0.

1.2 菌株分离筛选

取某染料厂废水处理池中的活性污泥3.00 g置于100 mL孔雀石绿浓度为50 mg/L的基础盐培养基中, 于30 °C、180 r/min培养3 d, 然后每3 d以3%的接种量转接到相同的培养基中, 转接3次. 然后取0.5 mL富集液梯度稀释, 取 10^{-4} ~ 10^{-7} 稀释度的液体各0.1 mL涂布于加有50 mg/L孔雀石绿的固体基础盐平板上, 30 °C培养3 d后, 挑取单菌落接种于含50 mg/L孔雀石绿的基础盐液体培养基中, 30 °C、180 r/min摇床培养2 d, 检测其降解效果^[15].

收稿日期: 2009-08-03 接受日期: 2009-08-31

*科技部农业微生物菌种资源整理整合及共享项目 (No. 2005DKA21201-2) 和农业部农业生态环境项目 (农财发[2007]52号) 资助 Supported by the Agricultural Microbial Resources Integration and Sharing Project of Ministry of Science and Technology of China (No. 2005DKA21201-2), and the Agro-Ecological Environmental Project of Ministry of Agriculture of China (Agricultural Finance Issued [2007] 52)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: hongqing@njau.edu.cn)

1.3 菌株鉴定

菌株形态及生理生化特性测定参照文献[17]进行. 菌株16S rRNA基因的克隆及序列测定和比较参照文献[18]进行, 提取M6基因组DNA作为模板进行16S rRNA基因的扩增. 正向引物: 5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3', 反向引物: 5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3'; 25 μ L体系为: 模板1 μ L, dNTP (25 mmol/L) 2 μ L, 引物 (1 mmol/L) 各1 μ L, 10 \times *Taq*缓冲液2.5 μ L, Mg^{2+} (25 mmol/L) 1.5 μ L, *Taq*酶 (5 U/ μ L) 0.3 μ L, 超纯水15.7 μ L. 聚合酶链式反应条件: 95 $^{\circ}$ C, 5 min; 94 $^{\circ}$ C, 0.5 min; 52 $^{\circ}$ C, 1 min; 72 $^{\circ}$ C, 1 min; 循环30次, 72 $^{\circ}$ C延伸10 min. 采用PCR产物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克隆并测序, 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 孔雀石绿及其代谢产物提取和检测

样品提取参考文献[19]进行: 取3 mL样品, 加入等体积的二氯甲烷, 高速旋涡混合1 min, 3 000 r/min离心5 min, 弃去上层液, 再加入1/2体积的二氯甲烷, 高速旋涡混合1 min, 再以3 000 r/min离心5 min, 弃去上层, 氮气吹至干, 加入2 mL流动相, 旋涡混合1 min, 经滤膜过滤后进样分析.

液相色谱分析条件^[20]: Waters C18反相柱; 流动相: 乙腈/乙酸铵溶液 (0.125 mol/L, pH 4.5) = 80/20; 流速: 1 mL min^{-1} ; 检测波长: 622 nm; 进样量: 20 μ L.

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^[20]. 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 结果与讨论

2.1 菌株的分离及生理生化特性

筛选并获得了1株能以孔雀石绿为唯一碳源生长的细菌, 将其命名为M6. 菌落边缘整齐, 淡黄色, 较平坦, 有光泽, 较粘稠. 该菌株为革兰氏阳性, 幼龄期呈不规则的杆状, 稳定期近似球状, 无芽孢. 好氧, 氧化酶阴性, 过氧化氢酶阴性, 能还原硝酸盐.

2.2 菌株16S rRNA基因序列分析

以菌株M6的基因组DNA为模板, 利用细菌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上登录, 序列号为EU874451. 根据相似性比较, 菌株M6分别与*Arthrobacter protophormiae* 773 (GenBank登录号为EU430095) 和*Arthrobacter protophormiae* (GenBank登录号为X80745) 相似性均为99%. 目前, 细菌分类学家的共识是认为当某2个细菌的16S rRNA相似性大于95%时, 可将其归为同一属^[17]. 因此, 根据上述相似性比较结果, 再结合生理生化特性将该菌株初步鉴定为节杆菌属 (*Arthrobacter* sp.).

2.3 菌株生长和孔雀石绿降解的关系

在孔雀石绿终浓度为20 mg/L的基础盐培养基中, 以3%的接种量接入用0.1 mol/L的PBS缓冲液洗涤2次的在LB培养

基中培养的M6种子液 ($A_{600\text{nm}} \approx 2.00$), 于30 $^{\circ}$ C、180 r/min摇床培养, 每隔12 h取样, 测定MG浓度和菌体的生长量. 从图1可以看出, M6能以孔雀石绿为唯一碳源进行生长, 在12 h内对孔雀石绿的降解率高于80%, 而且菌体数量在降解过程中呈正相关增加.

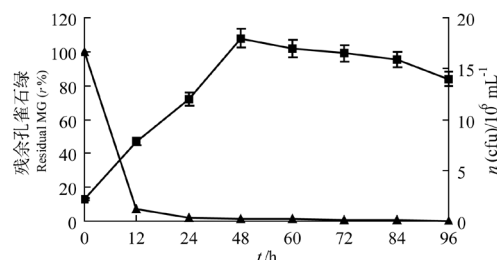


图1 菌株M6以孔雀石绿为唯一碳源的生长情况
Fig. 1 Growth of strain M6 using malachite green as sole carbon source

2.4 初始浓度对M6降解孔雀石绿的影响

在基础盐培养基中加入孔雀石绿使其终浓度分别为10、20、50、100、150、200 mg/L. 以3%的接种量接入用0.1 mol/L的PBS缓冲液洗涤2次的在LB培养基中培养的M6种子液 ($A_{600\text{nm}} \approx 2.00$), 于30 $^{\circ}$ C、180 r/min摇床培养, 每2 h取样1次, 测定孔雀石绿的残留量. 由图2可知, M6对较高和较低浓度的孔雀石绿都有较好的降解效果, 但随着孔雀石绿浓度的降低降解速率减慢.

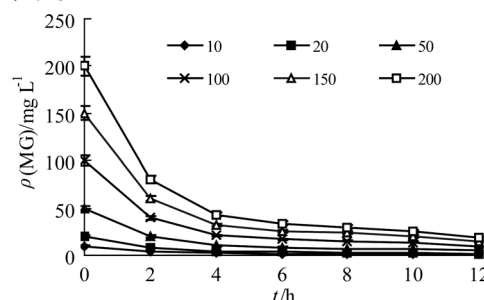


图2 孔雀石绿初始浓度对M6降解孔雀石绿的影响
Fig. 2 Effect of initial concentrations on degradation of malachite green by strain M6

2.5 pH值对M6降解孔雀石绿的影响

在pH为2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0, 孔雀石绿终浓度为20 mg/L的基础盐培养基中, 以3%的接种量接入用0.1 mol/L的PBS缓冲液洗涤2次的在LB培养基中培养的M6种子液 ($A_{600\text{nm}} \approx 2.00$), 于30 $^{\circ}$ C、180 r/min摇床培养, 12 h时取样, 测定孔雀石绿的残留量, 结果见图3. 菌株M6总体在酸性条件下对孔雀石绿的降解效果较好, 碱性条件下较差,

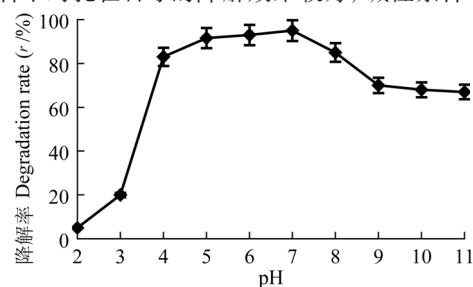


图3 pH值对M6降解孔雀石绿的影响
Fig. 3 Effect of pH on degradation of malachite green by strain M6

在pH 7.0时降解效果最好。

2.6 温度对M6降解孔雀石绿的影响

在孔雀石绿终浓度为20 mg/L的基础盐培养基中,以3%的接种量接入用0.1 mol/L的PBS缓冲液洗涤2次的在LB培养基中培养的M6种子液($A_{600\text{nm}} \approx 2.00$),分别在15、20、25、30、35、40 °C温度下,180 r/min摇床培养,12 h时取样,测定孔雀石绿的残留量,结果见图4。菌株M6在较低或较高温度下对孔雀石绿的降解效果稍差,在30 °C时对孔雀石绿的降解效果最好。

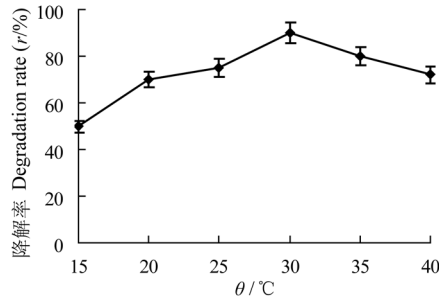


图4 温度对M6降解孔雀石绿的影响

Fig. 4 Effect of temperature on degradation of malachite green by strain M6

2.7 接种量对M6降解孔雀石绿的影响

在孔雀石绿终浓度为20 mg/L的基础盐培养基中,以1%、2%、3%、5%、8%、10%的接种量接入用0.1 mol/L的PBS缓冲液洗涤2次的在LB培养基中培养的M6种子液($A_{600\text{nm}} \approx 2.00$),于30 °C、180 r/min摇床培养,每6 h取1次样,测定孔雀石绿的残留浓度,结果见图5。接种量与孔雀石绿的降解速率成正相关,但当接种量达到3%或以上时,降解速率差别不大。

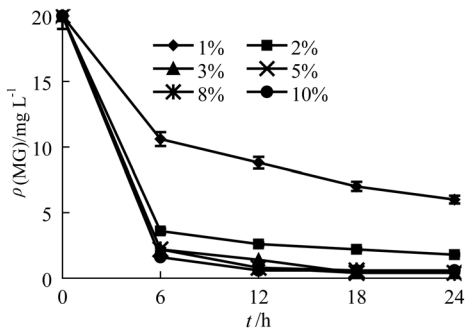


图5 接种量对M6降解孔雀石绿的影响

Fig. 5 Effect of inoculum on degradation of malachite green by strain M6

2.8 金属离子对M6降解孔雀石绿的影响

在孔雀石绿终浓度为20 mg/L基础盐培养基中加入 CuSO_4 、 NiSO_4 、 CdSO_4 、 ZnSO_4 、 $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ 、 FeSO_4 、 MnSO_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。以3%的接种量接入用0.1 mol/L的PBS缓冲液洗涤2次的在LB培养基中培养的M6种子液($A_{600\text{nm}} \approx 2.00$),于30 °C、180 r/min摇床培养,12 h取样。结果(图6)表明,0.5 mmol/L的 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 对孔雀石绿的降解没有显著影响, Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Al^{3+} 对M6降解孔雀石绿有明显抑制作用。

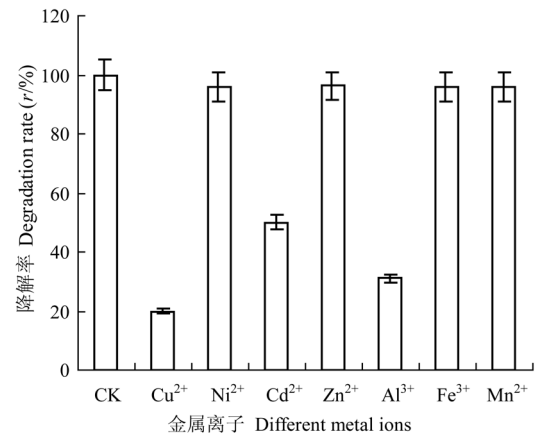


图6 金属离子对M6降解孔雀石绿的影响

Fig. 6 Effect of different metal ions on degradation of malachite green by strain M6

3 结论

本研究首次从节杆菌属(*Arthrobacter* sp.)中分离到1株以孔雀石绿为唯一碳源生长并能将其降解的细菌,命名为M6。根据形态、生理生化特性及16S rRNA序列进行系统发育树分析,确定该菌株属节杆菌属。该菌株能有效降解孔雀石绿,12 h内对20 mg/L孔雀石绿的降解率达80%以上;降解孔雀石绿的最适温度为30 °C,最适pH为7.0。降解速率与菌株的接种量呈正相关,孔雀石绿的初始浓度和金属离子都对其降解有影响。

References

- Culp SJ, Beland FA. Malachite green: A toxicological review. *Am Coll Toxicol*, 1996, **15**: 219-238
- Xie ST (谢世涛), Ou YM (欧阳敏), Xie SH (谢世红), Xu JH (徐节华). Residues of malachite green in aquatic products of Jiangxi. *Jiangxi Fish Sci* (江西水产科技), 2006 (1): 20-23
- Lu MX (卢迈新), Huang ZH (黄樟翰). American eel on the sensitivity of several drugs. *Freshwater Fish* (淡水渔业), 2000, **30** (5): 28-29
- 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 VK. Enhancing effects of malachite green on development of hepatic preneoplastic lesions induced by N-nitrosodiethylamine in rats. *Carcinogenesis*, 1991, **12**: 839-845
- Rao KVK. Inhibition of DNA synthesis in primary rat hepatocyte cultures by malachite green: A new liver tumor promoter. *Toxicol Lett*, 1995, **81** (223): 107-113
- Gouranchat C. Malachite green in fish culture (state of the art and perspectives). Bibliographic Studies. Veterinaire ENVT Nantes France: Ecole Natl, 2000, **1**: 42-44
- Song WH (宋文华), Hu GC (胡国臣), Yan H (颜慧), Zhou S (周爽), Dai SG (戴树桂). Study on the decoloring characterization, degrading enzyme system and gene location for dye degrading atrains. *Adv Environ Sci* (环境科学进展), 1999, **7** (1): 25-32
- Moosvi S, Keharia H, Madamwar D. Decolourization of textile dye Reactive Violet 5 by a newly isolated bacterial consortium RVM 11.1.

- World J Microbiol & Biotechnol*, 2005, **21**: 667~672
- 10 Daneshvar N, Ayazloo M, Khataee AR, Pourhassan M. Biological decolorization of dye solution containing Malachite Green by microalgae *Cosmarium* sp. *Bioresour Technol*, 2007, **98**: 1176~1182
- 11 Parshetti G, Kalme S, Saratale G, Govindwar S. **Biodegradation of Malachite Green by *Kocuria rosea* MTCC 1532.** *Acta Chim Slov*, 2006, **53**: 492~498
- 12 Ren SZ (任随周), Guo J (郭俊), Zeng GQ (曾国驱), Sun GP (孙国萍). Decolorization of triphenylmethane, azo, and anthraquinone dyes by a newly isolated *Aeromonas hydrophila* strain. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2006, **72**: 1316~1321
- 13 Shedbalkar U, Dhanve R, Jadhav J. Biodegradation of triphenylmethane dye cotton blue by *Penicillium ochrochloron* MTCC 517. *J Hazard Mat*, 2008, **65**: 156~160
- 14 McMullan G, Meehan C, Conneely A, Kirby N, Robinson T. Microbial decolourisation and degradation of textile dyes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **56**: 81~87
- 15 Mei H (梅嫒), Hong Q (洪青), Li SP (李顺鹏). **Isolation, identification and characterization of a malachite green-degrading bacterium.** *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2010, **16** (3): 390~393
- 16 Hu Z (胡忠), Wu YR (吴奕瑞), Xu Y (徐燕), Huang TW (黄通旺), Zheng TL (郑天凌). Screening of a marine phenol-degrading yeast *Candida* sp. P5 and its biodegradation characteristics. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2007, **13** (2): 243~247
- 17 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
- 18 Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Kingston RE. Short Protocols in Molecular Biology. Beijing, China (北京: 科学出版社), 1999. 39~40
- 19 Yu PJ (余培建). High Performance Liquid Chromatography malachite green and its metabolites in the sediment. *Chem Anal Measurement* (化学分析计量), 2007, **16** (2): 27~29
- 20 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 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

欢迎订阅2011年《基因组学与应用生物学》

《基因组学与应用生物学》是由广西大学主管和主办,公开发行的双月刊科学期刊。广西大学聘请中国农业大学李宁院士任主编,北京大学教授朱玉贤博士和海南省热带农业资源研究所所长方宣钧博士任执行主编,国内众多的著名学者出任编委。

《基因组学与应用生物学》主要刊登现代生物技术的前沿学科和基础学科如基因组学、分子细胞遗传学、生化与分子生物学、应用生物学等相关的原始研究成果。刊登植物、动物及微生物领域的生物在组织、器官、细胞、染色体、蛋白质、基因、酶、发酵工程等不同水平上的现代生物技术等基础与应用基础研究的成果。本刊按国际标准编排,题目摘要、图表、引用文献等均实行中英文对照,实现网上领先发表模式。

《基因组学与应用生物学》,前身是原《广西农业大学学报》,创刊于1982年。广西农业大学合并入广西大学以后更名为《广西农业生物科学》。《广西农业生物科学》已入编《中文核心期刊要目总览》2008年版(即第五版)之综合性农业科学类的核心期刊,是中国科学引文数据库(CSCD)来源期刊,也是中国科技核心期刊即中国科技论文统计源期刊。2001年入选国家新闻出版总署“中国期刊方阵”,先后被国际知名检索系统——英国国际农业与生物科学研究中心(CABI)、美国《化学文摘》(CA)、美国《剑桥科学文摘:自然科学》(CSA: NS)、英国《动物学记录》(ZR)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)等收录。

承载着《广西农业生物科学》的历史与荣誉,《基因组学与应用生物学》将在新的高度开拓奋进,为现代生命科学和应用生物学的研究与发展提供学术交流的平台,使之成为中国科学家走向世界的桥梁。

《基因组学与应用生物学》《Genomics and Applied Biology》, ISSN1674-568X, CN45-1369/Q, 双月刊, 双月28日出版, 国内定价: 人民币¥40.00/期, 人民币¥240.00/年; 国际定价: 美元\$40.00/期, 美元\$240.00/年。

邮局汇款

地址: 广西南宁市大学东路100号 广西大学西校园榕江路《基因组学与应用生物学》编辑部

收款单位: 《基因组学与应用生物学》编辑部 邮编: 530004

联系电话: 0771-3239102, 0771-3232621 传真: 0771-3232621

E-mail: gab@hibio.org; gab@genoapplbiol.org 网址: www.genoapplbiol.org