

孔雀石绿脱色菌恶臭假单胞菌菌株 M6 的 分离、鉴定及其生长特性研究

李 怡 何 珊 曹海鹏* 杨先乐

(上海海洋大学 农业部渔业动植物病原库 上海 200090)

摘 要: 从养殖池污泥中分离了 6 株对孔雀石绿具有脱色能力的菌株, 经过进一步在孔雀石绿营养肉汤中富集培养及其脱色率的比较, 筛选出对孔雀石绿具有较强脱色能力的优良菌株 M6。菌株 M6 在 30℃、150 r/min 条件下对孔雀石绿的脱色率为 97.14%, 通过革兰氏染色、电镜对其形态进行了观察, 用 ATB 细菌鉴定仪对其进行了生理生化鉴定; 通过对其 16S rDNA 序列进行 PCR 扩增和测序, 与 NCBI 中收录的与其同源性较高的菌株进行了聚类分析并构建了系统发育树。此外, 对其生长特性也进行了研究。实验结果表明, 菌株 M6 革兰氏染色阴性, 杆形, 端生一根鞭毛, 大小约为 0.45 μm ×0.84 μm , 在孔雀石绿营养琼脂平板上形成的菌落特征为圆形、浅蓝色、粘稠、不易挑取; 菌株 M6 的 16S rDNA 序列与 GenBank 基因库中假单胞菌属的细菌菌株的 16S rDNA 序列有 98%~99% 的高度同源性, 菌株 M6 与恶臭假单胞菌 OW-16(登录号: DQ112328.1)的亲缘关系最近。结合传统的形态与生理生化特性鉴定以及 16S rDNA 序列分析鉴定的结果, 判定菌株 M6 为恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)(登录号: EU348741.1)。此外, 菌株 M6 在 30℃、150 r/min 条件下摇床振荡培养的生长曲线为: 0 h~4 h 为生长延迟期, 4 h~64 h 为对数生长期, 64 h~80 h 为稳定期, 80 h 以后为衰亡期; 其最适生长 pH 值为 7, 最适生长温度为 30℃, 在转速为 50 r/min~250 r/min 条件下, 其浓度随转速的增加而增大。

关键词: 孔雀石绿, 恶臭假单胞菌, 鉴定, 生长特性

Isolation, Identification and Growth Characteristics of *Pseudomonas putida* Strain M6 with Malachite Green Decolorization

LI Yi HE Shan CAO Hai-Peng* YANG Xian-Le

(Aquatic Pathogen Collection Center of Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Six bacterial strains with malachite green decolorization ability were isolated from a sediment of aquaculture pond, and strain M6 was selected by further enrichment culture in nutrition broth with malachite green and decolorization rate comparison. The decolorization rate of strain M6 to malachite green was 97.14% in the conditon of 30℃ and 150 r/min, and its morphology was observed by gram stain and electron

基金项目: 上海市优秀青年教师科研专项基金(No. B-8101-08-0017); 上海水产大学青年科研基金(No. A-0212-07-0251)

* 通讯作者: Tel: 86-21-65710870; E: hpcao@shou.edu.cn

收稿日期: 2008-05-03; 接受日期: 2008-08-07

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

microscopy, its physiological and biochemical characteristic was studied by ATB bacteria identification instrument for identification of bacteria, and its 16S rDNA sequence was determined following PCR amplification, the sequence was aligned and the phylogenetic tree was constructed with those bacterial strains of high identity with strain M6. In addition, its growth characteristics was also studied. The experimental results showed that strain M6 was gram negative and bacilliform with a flagellum at one end. Its size was $0.45\ \mu\text{m} \times 0.84\ \mu\text{m}$. Its colony produced on common agar plate appeared as round, light blue, dense, hard to choose; 16S rDNA sequence of strain M6 had high identity of 98%~99% with *Pseudomonas* sp. located in GenBank and strain M6 had the most close relative relation to *Pseudomonas putida* OW-16 (Locus number: DQ112328.1). Combined the results of the traditional morphological, physiological, biochemical characteristics and 16S rDNA sequence analysis, strain M6 was identified as *Pseudomonas putida* (Locus number: EU348741.1). Additionally, its growth curve in the condition of 30°C and 150 r/min was as follows: lag phase was 0~4 h, log phase was 4 h~64 h, stationary phase was 64 h~80 h, decline phase was after 80 h. Its best growth conditions were pH 7 and 30°C , and in the rotational speed of 50 r/min to 250 r/min. Its concentration increased with the increase in rotational speed.

Keywords: Malachite green, *Pseudomonas putida*, Identification, Growth characteristics

孔雀石绿(Malachite green, MG) 是一种合成的三苯甲烷类工业染料, 曾被广泛用于真丝、羊毛、皮革、麻制品、陶瓷制品、棉布等的染色剂、食品颜色剂、细胞化学染色剂等^[1]。近年来, 制陶业、纺织业、皮革业、印染业以及渔业等的迅速发展导致了大量孔雀石绿染料废水的产生。因此, 对孔雀石绿染料废水颜色的去除一直是工程上的难题与研究热点^[2]。目前去除孔雀石绿等染料废水颜色的方法主要有化学脱色法和生物脱色法。化学脱色虽然使用方便, 见效快, 但其成本太高, 使用一直受到制约; 而生物脱色虽然初期投入较大, 但具有适应性强, 成本低, 效率高等特点, 越来越受到青睐^[2]。目前分离筛选高效脱色菌, 并将其投加到生物处理系统中, 是解决孔雀石绿等染料废水处理中脱色问题的一条切实可行的途径^[2], 许多研究表明, 假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)、芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)、酵母菌(*Pseudozyma rugulosa*)等对具有多种偶氮、三苯甲烷、蒽醌等结构类型的染料有脱色作用^[3]。本实验从养殖池污泥中分离筛选了一株对孔雀石绿具有脱色能力的优良菌株, 并对其进行了生理生化鉴定和 16S rDNA 系统发育分析, 还研究了其生长特性, 以进一步丰富孔雀石绿染料废水脱色处理的微生物资源, 对孔雀石绿染料废水中脱色问题的解决提供理论资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

污泥, 取自上海奉贤区五四农场; 孔雀石绿, 购

于 Sigma 公司; 孔雀石绿营养琼脂平板, 为无菌普通营养琼脂中加终浓度为 50 mg/L 无菌孔雀石绿, 用于孔雀石绿脱色菌株的分离; 孔雀石绿营养肉汤, 为普通无菌营养肉汤中加终浓度为 50 mg/L 无菌孔雀石绿, 用于孔雀石绿脱色菌株脱色能力的测定; 无菌生理盐水; DNA 快速提取试剂盒和 PCR 扩增试剂盒, 购于上海生工生物工程有限公司。

1.2 孔雀石绿脱色菌株的分离

将少许污泥溶于无菌生理盐水中, 与此同时加入终浓度为 50 mg/L 孔雀石绿, 于 30°C 条件下温育过夜, 然后采用稀释涂布平板法^[4]涂布孔雀石绿营养琼脂平板, 于 30°C 恒温培养。待菌落长出后, 取单菌落于孔雀石绿营养琼脂平板上划线进行多次纯化。测定各纯化菌株对孔雀石绿的脱色能力, 并将对孔雀石绿脱色能力强的优良脱色菌株进行鉴定。

细菌对孔雀石绿的脱色能力测定采用比色法^[5]。即将纯化后的脱色菌株(终浓度为 1.5×10^6 CFU/mL)接种于 50 mg/L 孔雀石绿营养肉汤中, 于 30°C 、150 r/min 条件下摇床振荡培养 24 h 后于无菌条件下将反应液于 4°C 、4000 r/min 条件下离心 20 min 后去除菌体, 取上清液在孔雀石绿最大吸收波长($\lambda = 617\ \text{nm}$ ^[5])处分别比色测定上清液的浓度 A_1 , 以不加菌的孔雀石绿营养肉汤在该波长下的浓度 (A_0)作为对照。根据公式: 脱色率 = $(A_0 - A_1) / A_0 \times 100\%$ ^[5]进行脱色能力测定。

1.3 孔雀石绿脱色菌株的鉴定

1.3.1 孔雀石绿脱色菌株的形态与生理生化鉴定: 将

原纯化后的孔雀石绿脱色菌株接种于普通营养琼脂平板, 30°C 培养 18 h~24 h 后挑取单菌落混于生理盐水中, 用 API/ATB 光电比浊仪测量并配成相当于 0.5 mol/L cFarland 的菌悬液后, 用 ATB 细菌鉴定仪对其生理生化特性进行测定。

1.3.2 孔雀石绿脱色菌株 16S rDNA 序列系统发育分析: 将脱色率高的孔雀石绿脱色菌株接种于无菌营养肉汤中扩大培养, 然后用 DNA 快速提取试剂盒提取基因组 DNA, 以基因组 DNA 为模板采用 PCR 扩增试剂盒扩增 16S rDNA。其中正向引物为 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 反向引物为 1492R: 5'-GGTTACC - TTGTTACGACTT-3'; PCR 扩增条件如下: 95°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 60°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 共 30 个循环。PCR 产物的纯化与测序由上海生工生物工程有限公司完成。将测得序列用 DNAMAN 软件编辑后, 在 NCBI 中利用 Blastn 软件与 GenBank + EMBL + DDBJ + PDB 基因库中已知的 16S rDNA 序列进行同源性比较, 选取同源性较高的序列并利用软件 BioEdit 7.0 和 Mega 4.0 进行多重比较后通过最大简约法构建系统发育树。

1.4 孔雀石绿脱色菌株生长特性的测定

1.4.1 孔雀石绿脱色菌株生长曲线的测定: 将孔雀石绿脱色菌株菌悬液 1 mL 接种到 100 mL 无菌营养肉汤中, 在 30°C、150 r/min 条件下振荡培养, 分别在 0 h、0.5 h、1.5 h、4 h、8 h、12 h、16 h、20 h、24 h、28 h、32 h、36 h、40 h、44 h、48 h 分别取样测定菌株的 OD_{600} 值^[6]。以培养时间为横坐标、 OD_{600} 值为纵坐标绘制菌株的生长曲线。

1.4.2 pH 对孔雀石绿脱色菌株生长的影响: 将等量孔雀石绿脱色菌株菌悬液接种于 pH 值分别为 3、5、7、9、11 的 100 mL 无菌营养肉汤中, 然后于 30°C、150 r/min 条件下摇床振荡培养 24 h 后测定各 pH 值下孔雀石绿脱色菌株的 OD_{600} 值^[6]。以初始 pH 为横坐标、 OD_{600} 值为纵坐标绘制曲线。

1.4.3 温度对孔雀石绿脱色菌株生长的影响: 将等量孔雀石绿脱色菌株菌悬液接种于 1.4.2 确定的最适 pH 的 100 mL 无菌营养肉汤中, 然后分别于 15°C、20°C、25°C、30°C、35°C 和 150 r/min 条件下摇床振荡培养 24 h 后测定各温度下孔雀石绿脱色菌株的 OD_{600} 值^[6]。以培养温度为横坐标、 OD_{600} 值为纵坐标绘制曲线。

1.4.4 转速对孔雀石绿脱色菌株生长的影响: 将等量孔雀石绿脱色菌株菌悬液接种于 1.4.2 确定的最适 pH 的 100 mL 无菌营养肉汤中, 然后分别于 50 r/min、100 r/min、150 r/min、200 r/min、250 r/min 和 1.4.3 确定的最适温度条件下摇床振荡培养 24 h 后测定各摇床转速下孔雀石绿脱色菌株的 OD_{600} 值^[6]。以摇床转速为横坐标、 OD_{600} 值为纵坐标绘制曲线。

2 结果

2.1 孔雀石绿脱色菌株 M6 的分离、筛选及其形态特性

从污泥中分离了 6 株对孔雀石绿具有脱色能力的菌株, 分别命名为 M1、M2、M3、M4、M5、M6, 通过进一步在孔雀石绿营养肉汤中富集培养, 测定各分离菌株对孔雀石绿脱色率分别为 40.5%、24.8%、49.4%、62.4%、80.3%、97.14%, 从而筛选出对孔雀石绿具有较强脱色能力的优良菌株 M6。菌株 M6 在孔雀石绿平板上生长 5 天形成的菌落特征为圆形、浅蓝色、粘稠、不易挑取(图 1)。此外, 菌株 M6 革兰氏染色为阴性, 杆形, 端生一根鞭毛, 大小约为 $0.45 \mu\text{m} \times 0.84 \mu\text{m}$ (图 2)。

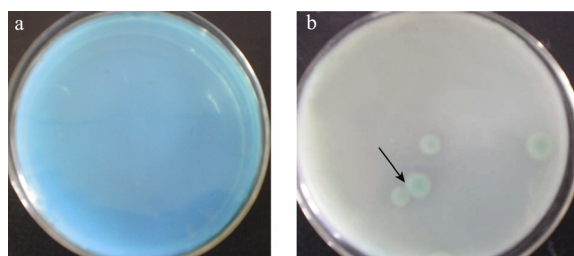


图 1 菌株 M6 的菌落

Fig. 1 Colony of strain M6

注: a: 空白孔雀石绿营养琼脂平板; b: 菌株 M6 在孔雀石绿营养琼脂平板上生长 5 天后脱色的孔雀石绿营养琼脂平板。

Note: a: Blank nutrition agar plate with malachite green; b: Nutrition agar plate after decolorization by strain M6, cultured for 5 days.

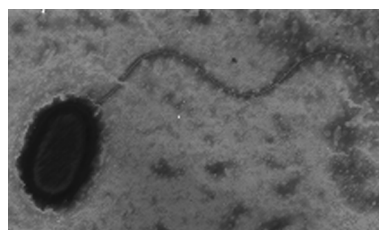


图 2 菌株 M6 的形态($\times 19000$)

Fig. 2 Morphology of strain M6($\times 19000$)

2.2 孔雀石绿脱色菌株 M6 的生理生化鉴定与系统发育分析

ATB 细菌鉴定仪对菌株 M6 的生理生化鉴定结果表明(表 1), 菌株 M6 为恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*), 鉴定结果的可信度为 99.5%。此外, 通过对菌株 M6 的 16S rDNA 进行 PCR 扩增, 获得 1443 bp

大小的片段, 此序列在 GenBank 上的登录号为: EU348741.1。通过 NCBI 网站对菌株 M6 的 16S rDNA 序列与数据库中各种菌的 16S rDNA 序列进行同源性比较结果(表 2)表明, 菌株 M6 的 16S rDNA 序列与 GenBank 基因库中假单胞菌属的细菌菌株的 16S rDNA 序列有 98%~99% 的高度同源性。此外,

表 1 ATB 细菌鉴定仪鉴定的菌株 M6 的生理生化特征
Table 1 Physiological and biological characteristics of strain M6 by ATB bacteria identification instrument

鉴定项目 Identification item	结 果 Result	鉴定项目 Identification item	结 果 Result	鉴定项目 Identification item	结 果 Result
氧化酶(OX)	+	L-丙氨酸(ALA)	+	3-羟基-苯甲酸(mOBE)	-
N-乙酰葡萄糖胺 (NAG)	-	甘露醇(MAN)	-	D-山梨糖(SOR)	-
D-核糖(RIB)	-	D-葡萄糖(GLU)	+	L-阿拉伯糖(ARA)	-
肌醇(INO)	-	水杨素(SAL)	-	丙酸盐(PROP)	+
蔗糖(SAC)	-	D-蜜二糖(MEL)	-	萘酸盐(CAP)	+
麦芽糖(MAL)	-	2-酮葡萄糖酸盐(2KG)	+	戊酸盐(VALT)	+
衣康糖(ITA)	-	3-羟基-丁酸盐(30BU)	+	柠檬酸盐(CIT)	+
新二酸盐(SUB)	-	4-羟基-苯甲酸盐(pOBE)	+	组氨酸(HIS)	+
丙二酸盐(MNT)	-	L-丝氨酸(SER)	+	5-酮基-葡萄糖酸盐(5KG)	-
乙酸盐(ACE)	+	L-脯氨酸(PRO)	+	糖原(GLYG)	-
DL-乳酸盐(LAT)	+	L-岩藻糖(FUC)	-		

注: +: 阳性; -: 阴性。

Note: +: Positivity; -: Negativity.

表 2 菌株 M6 的 16S rDNA 序列通过 NCBI 网站中的 Blastn 软件与基因库中已知细菌菌株 16S rDNA 序列同源性的比较
Table 2 Homology comparison of 16S rDNA sequence of strain M6 with that of other strains located in GenBank by Blastn software in NCBI website

菌种名 Species	菌株编号 Strain number	登陆号 Locus number	分值 Score	同源性 Homology (%)
<i>Pseudomonas putida</i>	A5.5	DQ886481.1	2571	99
<i>Pseudomonas putida</i>	OW-27	AY952325.1	2571	99
<i>Pseudomonas putida</i>	ATCC17453	AF094746.1	2571	99
<i>Pseudomonas putida</i>	ATCC17514	AF094741.1	2571	99
<i>Pseudomonas fulva</i>	OS-10	DQ141541.1	2571	99
<i>Pseudomonas putida</i>	WAB1869	AM184211.1	2569	99
<i>Pseudomonas putida</i>	L-1	EU170475.1	2566	99
<i>Pseudomonas putida</i>	DTB	EF123070.1	2566	99
<i>Pseudomonas putida</i>	AK5	DQ449024.1	2566	99
<i>Pseudomonas putida</i>	S16	AY741156.1	2560	99
<i>Pseudomonas monteilii</i>	-	AF064458.1	2560	99
<i>Pseudomonas putida</i>	S18	AY741157.1	2555	99
<i>Pseudomonas putida</i>	BM2	DQ989291.1	2555	99
<i>Pseudomonas putida</i>	OW-16	DQ112328.1	2555	99
<i>Pseudomonas putida</i>	ISSDS-590	EF620456.1	2549	99
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	S14	DQ095902.1	2549	99
<i>Pseudomonas taiwanensis</i>	BCRC17751	EU103629.1	2547	99
<i>Pseudomonas monteilii</i>	-	AF064458.1	2560	99
<i>Pseudomonas monteilii</i>	CIP104883T	AB021409.1	2531	98

注: -: 无。

Note: -: Non-exist.

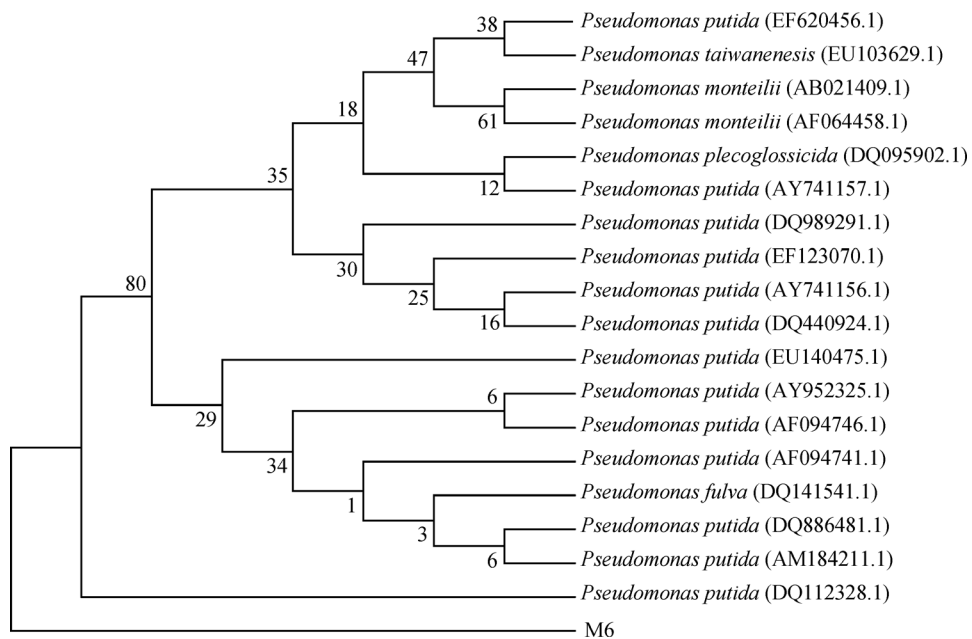


图 3 通过最大简约法构建的基于菌株 M6 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of strain M6, constructed by Maximum Parsimony method

注：枝上数字为自举置信水平^[7]。

Note: The numbers indicated above the branch are values of bootstrap confidence level^[7].

通过最大简约法构建的基于菌株 M6 16S rDNA 序列的系统发育树结果(图 3)可以看出，菌株 M6 与恶臭假单胞菌 OW-16(登录号：DQ112328.1)的亲缘关系最近。结合传统的生理生化特性鉴定以及 16S rDNA 序列分析的结果，判定菌株 M6 为恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*)。

2.3 孔雀石绿脱色菌株 M6 生长曲线的测定

结果见图 4。实验结果表明，0 h~4 h 为生长延迟期，4 h~64 h 为对数生长期，64 h~80 h 为稳定期，80 h 以后为衰亡期。

2.4 pH 对孔雀石绿脱色菌株 M6 生长的影响

结果见图 5。实验结果表明，菌株 M6 的最适生长 pH 为 7，而 pH 在 3 和 11 时基本不生长。在培养基初始 pH 范围为 5~7 时，菌株 M6 培养液的 OD_{600} 值随着 pH 的升高而急剧增加，当培养基初始 pH 为 7 时菌株 M6 培养液的 OD_{600} 值达到最大值 1.58；当培养基初始 pH 大于 7 时，菌株 M6 培养液的 OD_{600} 值逐渐降低，在培养基初始 pH 为 11 时达到最低。

2.5 温度对孔雀石绿脱色菌株 M6 生长的影响

结果见图 6。实验结果表明，菌株 M6 浓度在温度范围 15℃~35℃内均能生长，其中菌株 M6 的最适生长温度为 30℃。在 15℃~30℃范围内，随着培养温度的升高，菌株 M6 培养液的 OD_{600} 值逐渐增大，在 30℃时达到最大值；当培养温度大于 30℃时，菌株 M6 培养液的 OD_{600} 值逐渐降低，培养温度为 35℃时，

菌株 M6 培养液的 OD_{600} 值最低，仅为 30℃时的 69.23%。

2.6 转速对孔雀石绿脱色菌株 M6 生长的影响

结果见图 7。实验结果表明，在转速为 50 r/min~250 r/min 条件下，菌株 M6 培养液的 OD_{600} 值随着转速的加大而逐渐增加，其中转速为 250 r/min 时菌株 M6 培养液的 OD_{600} 值相当于转速为 50 r/min 时 M6 培养液的 OD_{600} 值的 2.01 倍。

3 讨论

近年来，孔雀石绿染料废水中的颜色去除问题早就引起了许多学者的日益关注，利用微生物法脱色或降解孔雀石绿染料废水越来越受到国内外学者

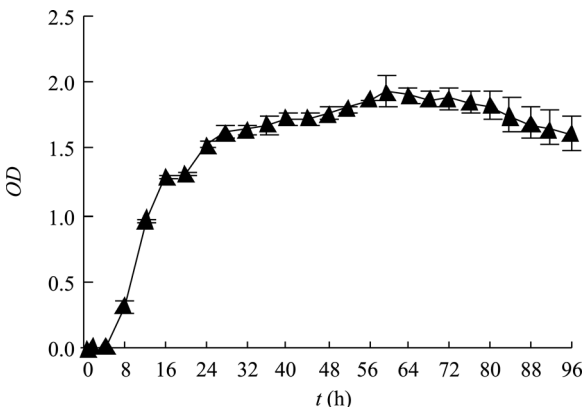


图 4 菌株 M6 生长的生长曲线

Fig. 4 The growth cure of strain M6

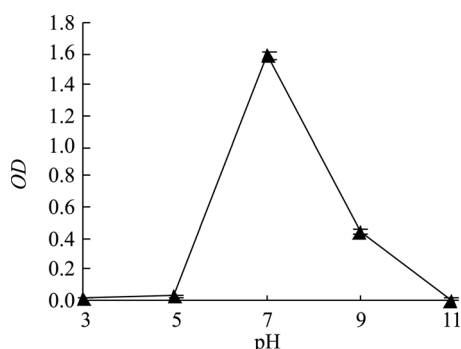


图5 pH对菌株M6生长的影响

Fig. 5 Effect of pH on the growth of strain M6

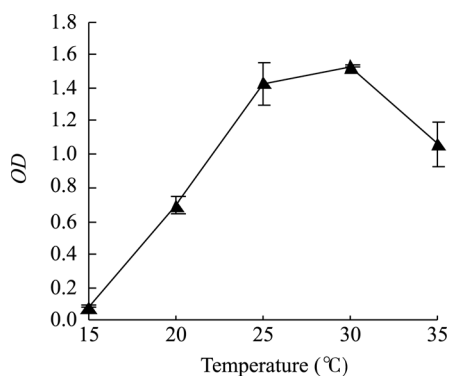


图6 温度对菌株M6生长的影响

Fig. 6 Effect of temperature on the growth of strain M6

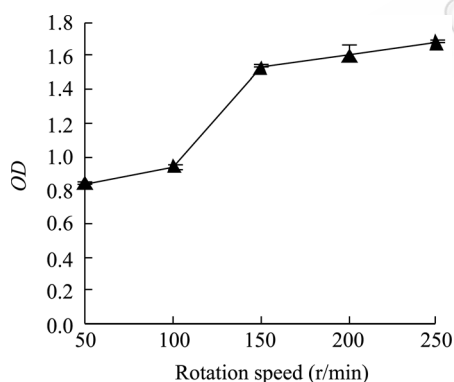


图7 摇床转速对菌株M6生长的影响

Fig. 7 Effect of rotation speed on the growth of strain M6

的青睐。目前业已证明, 青霉菌(*Penicillium* sp.)、泛菌(*Pantoea* sp.)、人苍白杆菌(*Ochrobactrum anthropi*)、绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)对孔雀石绿均具有良好的脱色效果^[5,8-10]。如任倩等从鱼塘底泥中分离的泛菌M3对2.0 mg/L孔雀石绿5 d的脱色率达100%^[9]; 又如林少芳等从废水处理厂曝气池的活性污泥中分离的一株绿脓假单胞菌对50 mg/L孔雀石绿28 h的脱色率达98.28%^[10]。本实验从养殖池污泥中分离的恶臭假单胞菌M6对

mg/L孔雀石绿24 h的脱色率达97.14%, 与林少芳等^[10]报道的绿脓假单胞菌菌株对孔雀石绿的脱色效果相当, 进一步丰富了孔雀石绿染料废水中脱色处理的微生物资源。然而, 关于微生物对孔雀石绿脱色机理的研究却较为匮乏。一般来说, 微生物对染料的脱色一般有吸附脱色和降解除色两种机理^[5], 其中吸附脱色机理主要是: 构成菌体表面的脂肪、蛋白质、糖类物质的一些基团通过化学键、离子键或氢键与染料作用, 形成染料与大分子构成的复合物, 这些物质通过分子间作用力进一步与其他染料分子进行作用, 导致菌体对染料有较好的吸附^[11]; 而降解除色机理主要是: 染料在菌体各种酶的作用下降解, 主要是偶氮还原酶的还原脱色过程^[5,12]。迄今为止, 在国内报道的对孔雀石绿有脱色能力的菌株中, 仅青霉菌X5和泛菌M3被初步证明对孔雀石绿的脱色机理分别为吸附脱色和降解除色^[8,9], 而其他菌株对孔雀石绿的脱色机理研究均未见报道。本实验分离的恶臭假单胞菌M6在固体和液体两种培养条件下对孔雀石绿均有较强的脱色能力, 其对孔雀石绿这种较强的脱色能力是与菌株M6能够产生大量对孔雀石绿具有脱色作用的酶有关? 还是与菌株M6具有较强的吸附脱色能力有关? 这还有待于进一步研究证实。

目前在细菌分类鉴定方法上, 16S rDNA序列分析方法和API系统鉴定均是目前细菌鉴定和分类的有效参照系统, 已被国际微生物学家以及多个国际权威机构FDA、NASA、TIGR、NIAID的认可, 但这两种方法尚存在不足。16S rDNA序列分析方法虽然可以揭示样本与标准株之间的同源性程度^[13], 但该方法也仅在属的水平上效果是比较好的^[14]; 而API系统虽然使传统的细菌生理生化鉴定程序简易化、微量化、快速化, 但数据库中模式菌种数量有限, 部分细菌只能鉴定到属, 对革兰氏阳性菌和厌氧菌的鉴定效果较差, 也不能揭示样本与标准株之间的同源性程度^[13]。因此, 细菌分类鉴定必须将16S rDNA序列分析和生理生化鉴定两种方法相结合, 以使鉴定方法更科学, 鉴定结果更可靠、更准确。故本实验在菌株M6的分类鉴定时, 结合了菌株M6的生理生化鉴定结果以及16S rDNA序列分析结果, 最终确定菌株M6为恶臭假单胞菌。

恶臭假单胞菌一般以多鞭毛运动^[15]。樊海平研究表明, 从患烂鳃病的欧洲鳗鲡体内分离的恶臭假单胞菌菌株MS0329具有多根鞭毛^[16], 孙丹等实验

也发现从土壤中分离的L-半胱氨酸产生菌恶臭假单胞菌菌株TS1138 具有多根鞭毛^[17]。而本实验分离的菌株M6 却具有单鞭毛, 这可能与鞭毛合成基因的表达有关^[18]。本实验分离到的孔雀石绿脱色菌株M6 与杨润德等^[19]从丹顶鹤体内分离的恶臭假单胞菌菌株在D-核糖、丙二酸盐等方面不同, 与李庆山等^[20]分离的恶臭假单胞菌菌株在丙酸盐、乙酸盐等方面也有所不同, 而且这些菌株与模式菌株也有所不同。出现这些差异, 可能是由于菌株在地区、气候、水质条件及实验室培养条件等方面的不同而产生的。此外, 本实验分离到的菌株M6 与GenBank中的十几株恶臭假单胞菌菌株虽然具有较高的同源性, 但也存在种间的遗传差异, 这可能与巨大的地理差异有关^[21]。

关于恶臭假单胞菌的生长特性, 孙丹等^[17]研究表明, 从土壤分离的L-半胱氨酸产生菌恶臭假单胞菌菌株TS1138 的最适生长温度为 30℃, 最适生长pH为 7.5~8.0; 蔡天明等^[22]研究表明, 从活性污泥中分离的具有聚磷特性的恶臭假单胞菌菌株GM6 的最适生长温度为 27℃, 最适生长pH为 7.0。本实验分离的恶臭假单胞菌菌株M6 的最适生长温度为 30℃, 最适生长pH为 7.0, 与孙丹等^[17]报道的恶臭假单胞菌菌株TS1138 的最适生长温度相同, 而最适生长pH不同; 与蔡天明等^[22]报道恶臭假单胞菌菌株GM6 的最适生长pH相同, 而最适生长温度不同, 这可能与菌株差异及实验室培养条件有关。

参 考 文 献

- [1] Culp SJ, Beland FA. Malachite green: a toxicological review. *J Am Coll Toxicol*, 1996, **15**(3): 219-238.
- [2] 乐毅全, 朱核光, 王士芬. 高效染料脱色菌的分离鉴定及其脱色特性. *上海环境科学*, 2003, **22**(8): 556-558.
- [3] 宋文华, 胡国臣, 颜 慧, 等. 染料降解菌的脱色特性, 降解酶系及基因定位研究进展. *环境科学进展*, 1999, **7**(1): 25-32.
- [4] 沈 萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验. 第三版. 北京: 高等教育出版社. 2004, pp.92-94.
- [5] 成 文, 曾宝强. 孔雀绿染料的微生物脱色研究. *应用与环境生物学报*, 2000, **6**(4): 370-373.
- [6] 徐 莉, 袁 生, 陈 婷, 等. 恶臭假单胞菌 NA-1 菌

体培养转化和静息细胞转化联合工艺生产 6-羟基烟酸研究. *微生物学报*, 2006, **46**(1): 63-67.

- [7] 海 萨, 李家乐, 冯建彬, 等. 基于多变量形态度量学和线粒体 Cyt b 序列的鲈属鱼类分类探讨. *动物学研究*, 2008, **29**(2): 113-120.
- [8] 董新姣, 谢荣敏. 固定化青霉 X5 对孔雀石绿的脱色研究. *环境污染治理技术与设备*, 2006, **7**(1): 45-49.
- [9] 任 倩, 蒋丽娟, 宋 炜, 等. 孔雀石绿降解菌 M3 的分离鉴定及降解特性研究. *生态与农村环境学报*, 2007, **23**(3): 65-69.
- [10] 林少芳, 余 萍, 林玉满. 一株绿脓假单胞菌对碱性孔雀绿脱色的初步研究. *福建师范大学学报(自然科学版)*, 2004, **20**(4): 72-75.
- [11] 颜克亮, 田 媛, 王宏勋, 等. 白腐菌菌体对染料的生物吸附脱色及机理研究. *生物技术*, 2007, **17**(5): 68-71.
- [12] 杨清香, 贾振杰, 杨 敏. 微生物染料脱色研究进展. *微生物学通报*, 2006, **33**(4): 144-148.
- [13] 李 琳, 李瑾年, 余为一. 细菌分类鉴定方法的研究概况. *安徽农业科学*, 2004, **32**(3): 549-551.
- [14] 别小妹, 陆兆新, 房耀维, 等. 利用 16S rDNA 序列分析鉴定一株产抗菌物质的微生物菌株. *食品科学*, 2006, **27**(11): 466-470.
- [15] 布坎南, 吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册. 北京: 科学出版社, 1984, pp.279-280.
- [16] 樊海平. 恶臭假单胞菌引起的欧洲鳗鲡烂鳃病. *水产学报*, 2001, **25**(2): 147-150.
- [17] 孙 丹, 余养盛, 杨文博, 等. L-半胱氨酸产生菌恶臭假单胞菌 TS1138 的鉴定和诱变育种. *天津大学学报*, 2007, **40**(4): 421-426.
- [18] Feldman M, Bryan R, Rajan S, et al. Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 1998, **66**(1): 43-51.
- [19] 杨润德, 王 琳, 范 欢, 等. 丹顶鹤恶臭假单胞菌的分离及生物学特性鉴定. *中国兽医杂志*, 2005, **41**(4): 55-56.
- [20] 李庆山, 邢瑞云, 张芳萍, 等. 首次发现恶臭假单胞菌引起的食物中毒. *中国公共卫生*, 2000, **16**(1): 50-51.
- [21] 周素明, 李安兴, 马 跃, 等. 养殖鱼类链球菌病原的分离鉴定及其 16S rDNA 分析. *中山大学学报(自然科学版)*, 2007, **46**(2): 68-71.
- [22] 蔡天明, 管莉菠, 崔中利, 等. 恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*)GM6 的聚磷特性研究. *土壤学报*, 2006, **43**(1): 117-123.