

单甲脒降解菌的分离筛选

刘志培 贾省芬 杨惠芳

(中国科学院微生物所,北京 100080)

摘要 从土壤、水体和受单甲脒长期污染的样品中通过富集培养,从中分离筛选到一株单甲脒耐性较高的 DR-8 菌株。该菌株在牛肉汁培养基中对单甲脒的耐性可达 1250mg/L,而在无机盐培养基中的耐性则为 500mg/L。该菌株可以利用单甲脒作为唯一氮源,但是不能以单甲脒作为碳源和能源而生长。降解单甲脒的最适温度为 37℃,最适 pH 为 7.0,其完整细胞悬液对 550mg/L 左右单甲脒的降解率最高可达 64.82%。经鉴定该菌株为门多萨假单胞菌(*Pseudomonas mendocina* DR-8)。

关键词 门多萨假单胞菌,单甲脒,生物降解

自 60 年代中期以来,农药的大量生产和广泛使用,虽然给农业生产带来了丰收,但是也给环境带来了日益严重的污染问题,主要是因为农药是人工合成的生物外源性有毒的化合物,在环境中不断积累而又难以被降解或者仅是部分地降解。然而即使是这种不完全的分解,绝大部分也是由微生物完成的,因此微生物降解农药的研究早已备受人们关注,早在 1982 年 Mahaffy W R^[1] 报道了几株纯菌种的分离及其对农药开蓬的降解的研究,Parsons J R^[2](1988) 报道了几种含氯农药的纯菌种降解, Schmiolt E M^[3] 在 1983 年报道了以混合细菌降解多种氯代酚型农药的研究; Kimbara K^[4] 报道了几种多氯代农药的混合菌代谢的研究; 1990 年, Haugland R A^[5] 报道了氯代除草剂的微生物降解代谢的研究,以上所有报道,对农药的降解都是不完全的代谢降解,只形成中间产物。Baker P B^[6] 在 1977 年报道了杀螨农药双甲脒的微生物降解研究,认为混合菌比单一纯菌种对双甲脒的降解要好,降解产物主要为 2,4-二甲苯胺,也是一种不完全降解。

单甲脒是我国生产的一种新型高效低毒有机氮杀虫、杀螨农药,其化学名称为 N-(2,4-二甲苯基)-N'-甲基甲脒(N-2,4-dimethylphenyl-N'-methyl for mamidine,简称 DMA),该化合物对微生物的效应及其降解均未见报道。本

文报道了单甲脒降解菌的分离、鉴定及其一般性质。

1 材料与方法

1.1 培养基

1.1.1 合成培养基 (g/L): 葡萄糖 3.0, (NH₄)₂SO₄ 0.5, MgSO₄ · 7H₂O 0.5, KH₂PO₄ 0.5, Na₂HPO₄ · 12H₂O 1.0, pH 7.0, 该培养基用于微生物的富集与分离培养。

1.1.2 无碳培养基(g/L): MgCl₂ 0.2, NH₄Cl 2.0, FeCl₃ 0.012, 酵母膏 0.02, CaCl₂ 0.08, EDTA 0.1, KH₂PO₄ 4.0, Na₂HPO₄ 6.0, 微量元素*1ml, 维生素**1ml。

1.1.3 无氮培养基: 同培养基 2, 加 3.0g 葡萄糖, 以 DMA 代替 NH₄Cl。

1.1.4 普通牛肉汁培养基: 作为收集细胞用。

以上培养基在灭菌后加入一定量的单甲脒即为含单甲脒培养基。

1.2 单甲脒

实验中所用的单甲脒为一种市售农药,即

国家自然科学基金资助项目

1994-11-28 收稿

*: 微量元素组成 (mg): CoCl₂ · 2H₂O 250, NiSO₄ · 7H₂O 10, CuSO₄ · 5H₂O 10, MnCl₂ · 4H₂O 70, ZnCl₂ 100, H₂BO₃ 50, FeSO₄ · 7H₂O 100, H₂O 1000ml

** : 维生素组成 (mg): 生物素 115, VB₁ 100, 尼克酸 100, 对氨基苯甲酸 100, H₂O 100ml

含 25% 的单甲脒盐酸盐溶液。

1.3 降解菌的分离与筛选

多种样品通过含 DMA 的培养基 I 富集培养后,以稀释或划线培养获得单菌落,这些菌株在含有不同 DMA 浓度的培养基 I 中接种振荡培养,测定其不同时间的生长情况,以 460nm 处的浊度表示,先获得 DMA 耐性菌,以这些耐性菌在含有 DMA 的无碳和无氮培养基中接种培养,不同时间取样测定 460nm 处的浊度表示菌的生长,同时测定菌对单甲脒的降解情况。由此挑选生长好同时降解 DMA 好的菌株作为 DMA 降解菌。

1.4 单甲脒的测定

培养液经离心去除细胞,稀盐酸酸化调 pH 3.0 左右,0.45 μ m 微孔滤膜过滤后,采用日本岛津 LC-3A 型高效液相色谱仪,20R-BAS 氨基不锈钢柱进行单甲脒的测定。

1.5 完整细胞的制备

菌种接种于牛肉汁培养基中,30 $^{\circ}$ C 摇床培养 18—20h,5000g 离心 30min 收集细胞以 1/15mol/L 的磷酸缓冲液洗涤细胞两次,悬浮于相同的缓冲液中,即为完整细胞悬液。

1.6 细菌的鉴定

细菌鉴定采用美国 Biolog 公司出产的细菌自动鉴定系统仪(Biolog Microstation System)测定。

2 结果与讨论

2.1 单甲脒耐性菌的分离和筛选

从土壤、水体和受单甲脒长期污染的沟泥样品中用富集培养技术共分离到 112 株对单甲脒具有耐性的细菌,分别在含有不同浓度单甲脒的牛肉汁培养基中进行培养,测定该菌生长情况。结果表明,对单甲脒耐性浓度在 800mg/L 以上者有 27 株,其中 12 株的耐性浓度高达 1250mg/L(表 1);为了造成与环境中相近的营养条件,改用培养基 I 进行细菌对单甲脒的耐性水平测定,表 2 的结果表明,在合成培养基上所分离细菌生长较差,因此对单甲脒的耐性水平比在牛肉汁培养液中为低,多数只有 200—

表 1 细菌在牛肉汁培养液中对单甲脒的耐性水平

菌株	DMA 浓度 (mg/L)				
	500	800	1000	1250	1300
DR-8	0.460	0.455	0.335	0.12	0.031
93-6	0.45	0.45	0.26	0.085	0.00
93-5	0.448	0.443	0.304	0.063	0.00
93-9	0.455	0.45	0.313	0.056	0.00
93-12	0.435	0.435	0.288	0.043	0.00
93-19	0.406	0.413	0.265	0.075	0.00
93-20	0.453	0.45	0.30	0.066	0.00
DB-12	0.413	0.406	0.258	0.060	0.00
DB-14	0.454	0.450	0.291	0.051	0.00
DB-19	0.408	0.40	0.338	0.045	0.00
DB-21	0.40	0.388	0.258	0.038	0.00
DB-22	0.425	0.412	0.253	0.036	0.00
CK (未接种)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

* 生长后稀释 8 倍测定

300mg/L,少数可达 400—500mg/L。从表 1 和表 2 中可以看出,细菌对单甲脒的耐性有赖于不同的营养条件,在营养丰富的牛肉汁培养液中细菌对单甲脒的耐性水平比在无机培养基中为高。此外还可以看出,DR-8 菌是对单甲脒耐性水平最高的一株。

表 2 细菌在合成培养基中对单甲脒的耐性水平

菌株	DMA 浓度 (mg/L)		
	200	300	400
DR-8	0.37	0.16	0.08
93-6	0.325	0.115	0.00
93-5	0.315	0.075	0.00
93-9	0.368	0.110	0.00
93-12	0.313	0.063	0.00
93-19	0.32	0.090	0.00
93-20	0.33	0.085	0.00
DB-12	0.34	0.070	0.00
DB-14	0.307	0.068	0.00
DB-19	0.325	0.095	0.00
DB-21	0.290	0.050	0.00
DB-22	0.285	0.048	0.00
CK (无菌)	0.00	0.00	0.00

* 生长后稀释 4 倍测定

2.2 单甲脒降解菌的筛选

选用对单甲脒耐性水平高的菌株,分别在

含有单甲脒的无碳或无氮培养基中接种培养,测定分离菌利用单甲脒作为碳源或氮源时的生长情况,表3的结果表明,分离的纯化菌株在以单甲脒作为碳源的培养基中均不能生长,单甲脒没有被去除,由此说明纯菌株不能利用单甲脒作为唯一碳源和能源,亦即不能有效地降解单甲脒。此外,表3的结果还表明,所分离的纯菌中绝大部分菌不能利用单甲脒作为氮源而生长,只有DR-8菌株可以利用单甲脒作为氮源生长,可使培养液中单甲脒的含量明显降低,单甲脒去除率可达51.7%。用不同浓度单甲脒作为氮源对DR-8菌株生长的影响,表4结果表明,DR-8菌株以单甲脒作为氮源时,利用单甲脒有一定的浓度限制,300—500mg/L时对

菌的生长没有影响,单甲脒的去除率保持在50%左右,当单甲脒的浓度高于700mg/L时,由于它的毒性,DR-8菌株的生长就受到了抑制。

根据以上结果,DR-8菌株是一株降解单甲脒的细菌。

2.3 DR-8 菌株的鉴定

DR-8菌株经过 Biolog Microstation Identification System 自动化系统鉴定属于门多萨假单胞菌 (*Pseudomonas mendocina* DR-8),该菌株与标准菌株的相似性系数为0.743。

2.4 DR-8 菌株降解单甲脒的温度和 pH 条件

为了试验门多萨假单胞菌 DR-8 菌株降解单甲脒的温度和 pH 条件,收集细胞制成悬

表3 纯菌株利用单甲脒作为碳源或氮源时的生长情况*

菌株	DMA (碳源)		DMA (氮源)	
	OD _{600nm}	DMA 去除率(%)	OD _{600nm}	DMA 去除率(%)
DR-8	0.080	1.00	0.290	51.70
93-5	0.085	0.00	0.085	0.00
93-6	0.080	0.00	0.080	0.00
93-9	0.085	0.40	0.090	0.70
93-12	0.075	0.00	0.073	0.00
93-19	0.080	0.00	0.077	0.00
93-20	0.075	0.00	0.085	0.00
DB-14	0.083	0.00	0.087	0.50
DB-19	0.070	0.00	0.087	0.00
DB-21	0.087	0.00	0.085	0.00
DB-22	0.086	0.60	0.080	0.30
CK (无 DMA)	0.070	0.00	0.070	0.00
CK (不接种)	0.00	0.00	0.00	0.00

*: 30℃ 培养 6d, 单甲脒 (DMA) 浓度为 300mg/L

表4 DMA 作为氮源时对 DR-8 菌株生长的影响*

DMA 浓度 (mg/L)	OD _{600nm}		DMA 去除率(%)	
	接种	CK	接种	CK
0.00	0.05	0.00	/	/
300	0.288	0.00	51.70	0.00
500	0.298	0.00	47.60	0.00
700	0.243	0.00	22.80	0.00
1000	0.155	0.00	0.75	0.00

*: 30℃ 培养 6d

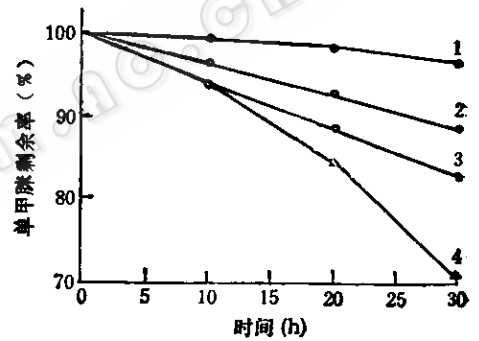


图1 温度对单甲脒降解的影响

1, 12℃, 2, 20℃, 3, 30℃, 4, 37℃

反应条件: pH6.0, [DMA] = 662mg/L, [Cell] = 50mg[湿]/ml

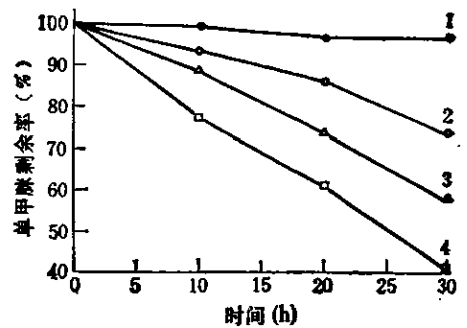


图2 pH 对单甲脒降解的影响

1, pH4.0, 2, pH5.0, 3, pH6.0, 4, pH7.0

反应条件: 37℃, [DMA] = 649mg/L, [Cell] = 50mg[湿]/ml

液,在不同温度和 pH 值条件下与单甲脒溶液进行反应,不同时间取样测定反应液中单甲脒的残留量(图 1、2)。如图 1 所示,在 37℃ 单甲脒的降解最快,温度越低降解越慢,在 12℃ 时反应 30h,降解率仅为 2.6%。图 2 结果表明,在 pH4.0—7.0 范围内,单甲脒的降解随着 pH 值的升高而加快, pH7.0 反应 30h,其降解率达到 58.4%,由于单甲脒在碱性条件下不稳定,因此本试验未做 pH 值高于中性的条件。

2.5 DR-8 菌株对单甲脒的降解活性

为了试验 DR-8 菌株对单甲脒的降解活性,以该菌株的细胞悬液与单甲脒溶液混合,在

37℃ 水浴中保温反应,定时取样测定反应液中单甲脒的剩余量。结果如图 3 所示,DR-8 菌株对单甲脒的降解随着反应时间的延长而降解率不断提高,反应 18h 后,降解率为 52.58%,但大约反应 30h 后,降解趋于一种缓慢状态,到 42h 后,降解率仅提高到 64.82%。

本文报道了单甲脒降解菌 DR-8 菌株的分离和筛选以及初步的降解条件。有关单甲脒降解菌的降解活性动力学和降解产物等方面正在实验中,将另文报道。

致谢 单甲脒的测定得到了生态中心叶常明教授、雷志芳同志的大力支持和协助,特此致谢。

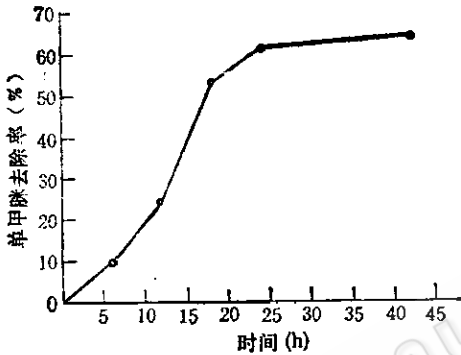


图 3 DR-8 菌株对单甲脒的降解

反应条件: pH7.0, 37℃, [DMA] = 523mg/L
[Cell] = 50mg[wet]/ml

参 考 文 献

- [1] Mahaffy W R, Pritchard P H, Bourquin A W. *Appl Environ Microbiol*, 1982, **43**(6): 1419—1424.
- [2] Parsons J R, Dthm Sijm, A van Laar, et al. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1988, **29**:81—84.
- [3] Schmidt E M, Knackmuss H J. *Appl Environ Microbiol*. 1983, **46**:1038—1044.
- [4] Kimbara K, Haspimoto T, Fukada M, et al. *Agic Biol Chem*, 1988, **52**:2885—2891.
- [5] Haugland R A, Schlamm D J, Lyons I R P, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56**:1357—1362.
- [6] Baker P B, Woods D R. *Journal of Appl Bacteriol*, 1977, **42**:187—196.

ISOLATION AND SELECTION OF N-2,4-DIMETHYL-PHENYL-N'-METHYLFORMAMIDINE (DMA)-DEGRADING BACTERIA

Liu Zhipei Jia Shengfen Yang Huifang

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract A strain of bacter DR-8, capable of tolerance to DMA, was isolated and selected from samples contaminated by DMA. The tolerance concentration of this strain to DMA were 1250mg/l during growth in beef extract medium and only 500mg/l in inorganic medium. Furthermore, this strain can utilize DMA as sole nitrogen source, but can not utilize DMA as carbon and energy source. The optimum temperature and pH for degradation of DMA by strain DR-8 were 37℃ and 7.0, respectively. The biodegradation rate of DMA at the concentration about 550mg/l by intact cells was 64.82%. Strain DR-8 was identified as *Pseudomonas mendocina* by the Biolog Microstation Identification System.

Key words *Pseudomonas mendocina* DR-8, Biodegradation, N-2,4-dimethyl-phenyl-N'-methylformamidine (DMA)