

鲁氏酵母菌 WY-3 降解甲胺磷的性能

刘斌斌¹, 赵永芳², 钞亚鹏¹, 谢裕敏¹, 王银善^{1*} (1. 中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071;
2. 武汉大学生命科学学院, 武汉 430072)

摘要:从污水中分离出一株酵母菌, 编号 WY-3. 该菌能利用甲胺磷 (MAP) 作唯一氮、磷源生长, 也能利用甲胺、乙胺和硫酸铵 (硝酸盐和羟胺除外) 作氮源生长, 它还能适应高浓度 (60%) 葡萄糖的培养条件, 初步鉴定为鲁氏酵母菌 (*Saccharomyces rouxii*). 从 WY-3 菌无细胞抽提液中检测到一种高活力酸性磷酸酶, 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳活性染色法呈现一条白色谱带. 氟化钠试剂可抑制该酶催化 MAP 释放无机磷, 但是不影响该菌代谢 MAP 脱氨基的性能. MAP 经 WY-3 菌作用后毒性会大大降低, 分析其残留物时发现有无机磷和甲醇物质. 此外, 文中还对酵母菌一类共代谢菌降解 MAP 的途径进行了探讨.

关键词:鲁氏酵母菌; 甲胺磷; 酸性磷酸酶

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301 (2001) 04-05-0037

Degradation of Methamidophos by *Saccharomyces rouxii* WY-3

Liu Binbin¹, Zhao Yongfang², Chao Yapeng¹, Xie Yumin¹, Wang Yinshan¹ (1. Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China; 2. College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: A strain of Yeast WY-3 was isolated from wastewater sample. It is capable of utilizing methamidophos as sole nitrogen and phosphorus sources, and also capable of utilizing methylamine, ethylamine and ammonium sulfate as nitrogen sources except nitrate and hydroxylamine. The yeast could grow in medium containing 60% glucose and was identified as *Saccharomyces rouxii* WY-3. The strain contains a high active acid phosphatase. The crude enzyme was applied to a plate of polyacrylamide gel for electrophoresis, then activity was detected as white single band. Inhibiting test showed that sodium fluoride could seriously inhibit the activity of acid phosphatase to release phosphorus from methamidophos, whereas it make no effect on deamination of the strain WY-3 from methamidophos. After methamidophos was degraded by strain WY-3, toxicity of the pesticide reduced obviously, and its portion intermediate, methanol and inorganic phosphorus, were detected.

Key words: methamidophos; acid phosphatase; *Saccharomyces rouxii* WY-3

甲胺磷 (methamidophos, MAP) 是一种重要的广谱、剧毒有机磷杀虫剂. 近年来 MAP 的产量和用量均居国内诸农药之首, 引发的环境污染危害也确实令人担忧^[1,2]. 关于 MAP 在自然生态系统中残留、转化及解毒的研究已有报道^[3-5], 但迄今为止鲜见以真核微生物酵母菌为材料, 研究 MAP 降解过程、主要酶系及中间产物的文献. 本文将报道这方面的试验结果.

1 材料与方法

(1) 供试菌 WY-3 由本室从污水中分离^[7] 苯基磷酸钠 (上海化学试剂厂)、甲胺磷纯品

和乳油 (由湖北沙隆达农药股份有限公司提供), 对硫磷 (parathion, 系进口产品), 其它试剂均为国产分析纯.

(2) 培养基 1[#] 培养基: K₂HPO₄ 1.6g, KH₂PO₄ 0.4g, NaCl 3.0g, MgSO₄ 0.06g, 葡萄糖 5.0g, FeSO₄ 3mg, CaCl₂ 1mg, CuSO₄ 0.05mg, ZnSO₄ 0.05mg, HBO₃ 3mg, 蒸馏水

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39670010)
作者简介: 刘斌斌 (1973 ~), 男, 博士研究生, 主要从事生物化学与分子生物学方面的研究.
收稿日期: 2000-10-23
* 通讯联系人

1000 ml,调 pH 至 7.2,8 磅灭菌后加入适量的纯化甲胺磷^[3](作唯一氮源);2[#]培养基:1[#]培养基中的磷酸盐用 KCl(2g)取代,其余成分不变,甲胺磷作唯一氮、磷源;LB 培养基。

(3) 菌体生长量测定 用测定菌液 A_{600nm} 消光值表示。

(4) 菌种鉴定 按文献[8]进行。

(5) 甲胺磷的检测 用薄层层法进行,薄层硅胶板按文献[9]制备。将已培养好的细胞配成悬浮液与一定量的甲胺磷反应(30℃),尔后间隔适当时间各取 0.5 ml 反应液,离心收集上清液,加等体积丙酮,在活化的硅胶薄层析上点样,展层、显色,以定性分析甲胺磷残留量的变化。

(6) 粗酸性磷酸酶的制备 将 WY-3 菌接种到 2[#]培养基中,摇瓶培养(30℃)20h,离心收集菌体,用 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH7.0)洗涤 2 次,菌体悬浮于同一缓冲液中,其比例为 1:4,置冰浴用超声波仪破细胞,离心(10 000r/min)除去细胞碎片,上清液即为粗酶液。

(7) 酸性磷酸酶活力测定 参照文献[6]并稍作修改。反应总体积 4 ml:0.1 mol/L 乙酸缓冲液(pH5.0)1 ml;0.5%底物(苯基磷酸钠)溶液 0.8 ml;酶溶液 0.2 ml;于 37℃保温 15 min,加含 1%4-氨基安替比林的 2.0%NaHCO₃ 溶液 1 ml 中止反应,接着加 3%铁氰化钾溶液 1 ml,摇匀后测定 A_{510nm} 的消光值。一个酶活力单位规定为在上述条件下,每分钟分解 1 μg 底物所需的酶量。

(8) 蛋白质含量测定 参照文献[10]进行。

(9) 聚丙烯酰胺凝胶电泳 参照文献[11]进行。

(10) 气相色谱分析 参考文献[3]进行。

(11) 磷酸根的检测 删除去 7%磷酸外,其余操作均按文献[12]进行。

(12) 毒性测定 选成熟小白鼠,随机分成 3 组,每组 5 只,每天灌胃 0.2 ml,连续 7 d,记录小鼠的死亡数及体重变化。

2 结果

2.1 WY-3 菌的生物学特性

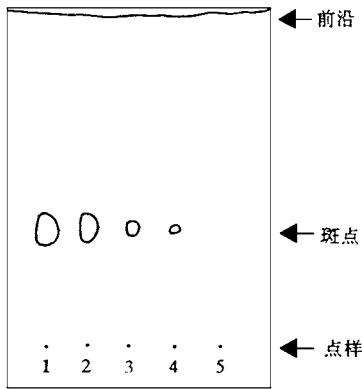
WY-3 菌能在 2[#]培养基(MAP 浓度 3000 mg/L)中迅速生长(若此培养基中除去 MAP 时,WY-3 菌不生长),摇床培养(30℃)20h 左右可达对数中期。从此时开始,WY-3 菌培养液 pH 值开始下降,最低可降至 3.5。将该菌转接到 LB 平板上培养时,长出的菌落为圆形,菌苔较厚,液体培养物可产生蹼膜,显微镜观察细胞呈现瓶状,一端芽殖,无假菌丝。WY-3 菌能发酵蔗糖和麦芽糖,但不能发酵半乳糖和棉子糖。它除能利用 MAP 作氮源生长外,还能利用硫酸铵、甲胺和乙胺(不利用硝酸盐和羟胺)作氮源生长。另外,该菌还能在含高浓度(60%)葡萄糖的酵母汁基质上生长。但是,WY-3 菌不能利用 MAP 的甲氧基和甲硫基作碳源生长(在 1[#]、2[#]培养基中除去葡萄糖时,该菌不生长)。据此将 WY-3 菌初步鉴定为鲁氏酵母菌(*Saccharomyces rouxii*)^[8]。

2.2 WY-3 菌对 MAP 的降解

将 WY-3 菌接种于 400 ml 1[#]培养基中,摇床培养(30℃)至对数中期,离心收集菌体,用 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH7.0)洗涤 2 次,悬于相同缓冲液中,与 MAP(终浓度为 600 mg/L)作用(30℃),然后不同时间取样作薄层分析,结果 9h 的样品,MAP 尚存量低于对照约 1/3,12h 的样品则未检出 MAP(见图 1)。由此看出,WY-3 菌降解 MAP 的能力较强。

2.3 WY-3 菌利用 MAP 作磷源的性能

将 WY-3 菌分别接种到含不同浓度氯化钠的 1[#]、2[#]培养基(见材料与方法)中,摇床培养(30℃)20h,测得其生长情况如表 1 所示。从表 1 看出,WY-3 菌在同样浓度氯化钠的 1[#]培养基中,生长性能基本不受影响,而在同样浓度氯化钠的 2[#]培养基中则生长受到严重抑制,而且抑制程度是随着氯化钠浓度的增加而增加(见表 1)。同时用另一种酸性磷酸酶的专性抑制剂对硫磷^[6]取代氯化钠重复上述试验时也得到了类似的结果(见表 1)。这些数据初步表明,WY-3 菌利用 MAP 作磷源的性能可被氯化钠和对硫磷抑制的根本原因是,该菌代谢 MAP 释放无机磷的酸性磷酸酶受到了抑制。



1. 标准甲胺磷 2. 对照 3. 试样(作用 6h)
4. 试样(作用 9h) 5. 试样(作用 12h)
展层剂: 乙醚预展层后用醋酸乙酯:
丙酮: 正庚烷 = 5: 1: 1 ($R_f = 0.37$)

图 1 WY-3 菌降解 MAP 的薄层层析图谱
Fig.1 TLC chromatography for degradation
of MAP by strain WY-3

表 1 氟化钠和对硫磷抑制 WY-3 菌利用 MAP 作磷源的试验¹⁾

Table 1 Inhibition of sodium fluoride and parathion on MAP degradation by strain WY-3

三角瓶号	1	2	3	4	5	6	7	8
氟化钠浓度/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	0	0.1	1.0	1.5				
对硫磷浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$					0	0.1	0.2	0.4
1 [#] 培养基菌生长量	2.47	2.45	2.39	2.42	2.51	2.46	2.42	2.41
2 [#] 培养基菌生长量	1.84	0.24	0.15	0.11	1.82	0.17	0.15	0.14

1) 1[#] 培养基含无机磷, 2[#] 培养基不含无机磷; 菌生长量是指摇床培养(30℃)20h 的 A600nm 消光值.

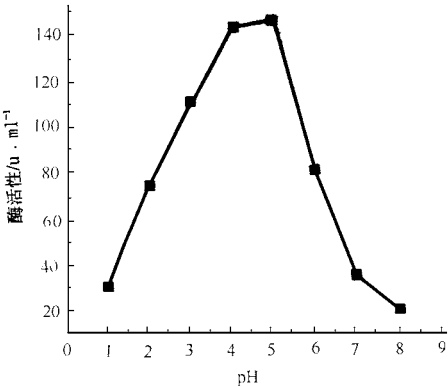


图 2 pH 值对酶活的影响

Fig.1 Effect of pH on enzyme activity

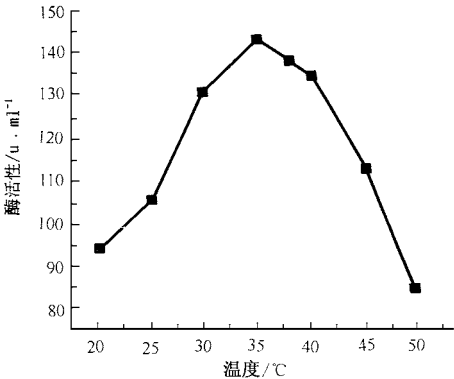


图 3 温度对酶活的影响

Fig.3 Effect of temperatures on enzyme activity

2.5 WY-3 菌降解 MAP 的中间产物分析

收集培养 18h 的 WY-3 菌细胞(来自 400 ml 1[#] 培养基),用 0.05 mol/L Tris-HCl 缓

2.4 WY-3 菌酸性磷酸酶的鉴定及其在不同基质中的生成

测定 WY-3 菌酸性磷酸酶活力的数据显示,当该酶置 $\text{pH} < 7.0$ 反应系统时,活力较高;而当其置 $\text{pH} > 7.0$ 反应系统时,活力较低或丧失.此酶反应的适宜 pH 为 4.5~5.0,适宜温度为 35℃(见图 2,3).将粗酶液经板状不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳(约 3h)后,按文献[11]进行酸性磷酸酶活性染色时,在胶板上会呈现一条清晰的白色谱带,其谱带的宽度是随酶量增加而增加的(见图 4).这些试验进一步证明,从 WY-3 菌体内分离的酶为酸性磷酸酶.另外,从表 2 不同基质对酸性磷酸酶生成的影响可以看出,当 WY-3 菌生长在 2[#] 培养基时,酶活力最高,生长在 LB 培养基次之,生长在以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 PO_4^{3-} 为氮、磷源培养基则最低.这可能与 2[#] 培养基缺无机磷有关^[13].

冲液($\text{pH}7.0$)洗涤 2 次,悬于 15 ml 相同缓冲液,混匀后分为 3 份:①加入 MAP(终浓度 200 mg/L)称试验 1 号;②置沸水灭活后加入



1 2 3 孔加酶量分别为 10、20、40 μ l，
4 孔为对照加灭活酶液 40 μ l(酶蛋白含量 14.37 mg/ml)

图 4 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测
WY-3 菌酸性磷酸酶图谱

Fig.4 Polyacrylamide gel electrophoresis of
acid phosphatase from strain WY-3

表 2 WY-3 菌在不同氮、磷源基质上
产生酸性磷酸酶的比较

Table 2 Comparison of producing acid phosphatase
of strain WY-3 in mediums with different
nitrogen and phosphorus sources

培养基 ¹⁾	2 [#]	2 [#] [(NH ₄) ₂ SO ₄ /PO ₄ ³⁻ 代替 MAP]	LB
酶活/u·ml ⁻¹	141	97	129

1) 培养基中的碳源均为 5%葡萄糖。

MAP(终浓度同上)称试验 2 号;③加入洗涤缓冲液替代 MAP 称试验 3 号,30℃摇床培养 16h,分别取样 0.5 ml,离心弃沉淀,精确取上清液 1 μ l 进行气相色谱分析,以甲醇为标样,结果见图 5。从图 5 看出,试验 1 号出现 1 个与甲醇标样保留时间(约 0.663 min)相同的色谱峰,而试验 2、3 号均未出现此峰。这表明,甲醇是 WY-3 菌降解 MAP 的中间产物之一。

与此同时,用接种与不接种 WY-3 菌的 2[#]培养基(培养后离心除去菌体)作试验材料,分别检测无机磷生成与否时发现,前者(接种的)培养液能与钼酸铵测磷试剂反应呈现蓝颜色,而后者却无此反应。这表明,WY-3 菌在降解 MPA 过程中会释放出无机磷物质(详细数据未列)。

2.6 WY-3 菌利用 MAP 作氮源后残留物的毒性

将 15 只小白鼠(雌性)分成 3 组(每组 5 只):第 1 组用接种 WY-3 菌培养 20h 的 1[#]培养液(MAP 作唯一氮源,初浓度 3000 mg/L)0.2 ml 灌胃;第 2 组用未接菌的 1[#]培养基(MAP 浓度同上)0.2 ml 灌胃;第 3 组用生理盐水(0.9%NaCl)0.2 ml 灌胃,结果第 1 组小白鼠

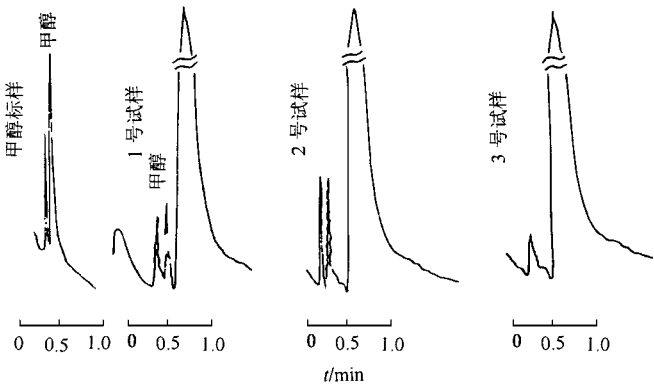


图 5 WY-3 菌降解 MAP 后中间产物的气相色谱分析

Fig.5 GC analysis of MAP degradation by strain WY-3

存活率 100%,平均体重由 25.0g 增长到 30.5g 第 5 天死 1 只],体重增长不明显.第 3 组存活(增 22%).第 2 组存活率仅 20%,且行为异常率亦为 100%,平均体重由 23.6g 增至 33.8g [其中试验第 1 天死去 3 只(6h 2 只,10h 1 只), (增 42.6%).由此看出,剧毒 MAP 的氨基被代

谢后,其毒性会大大降低或消除.

3 讨论

(1) 鲁氏酵母菌 WY-3 可用 MAP 作唯一氮、磷源生长,并可将其有效降解. WY-3 菌降解 MAP 是通过共代谢完成的.自然界存在很多像 WY-3 菌一样降解 MAP 的微生物^[7],它们所需的碳源在一般土壤是不缺乏的.而残留于土壤(或自然界)的甲基类化合物,通常又可被环境中存在的甲基营养菌转化^[16].因此推测,土壤等环境中有 MAP 农药撒落时,是不会长期残留的.

(2) 从 WY-3 菌能利用硫酸铵、甲胺、乙胺,而不能利用硝酸盐、羟胺作氮源,以及该菌利用 MAP 作磷源的性能可被氟化钠抑制来看, WY-3 菌降解 MAP 的酶至少有 2 类:一类是首先切断 MAP 的 P—N 键释放出氨态氮(可被微生物迅速利用,在培养液中检测不到)的酶,当 P—N 键被打开后,其分子结构的稳定性可能受到了一定影响;另一类是切断 P—O 键释放出无机磷和甲醇物质的酸性磷酸酶,该酶可催化 MAP 进一步降解使其甲氧基转化为甲醇.这也表明,酸性磷酸酶在 MAP 降解过程中(尤其是在缺无机磷的环境中)起很重要的作用.

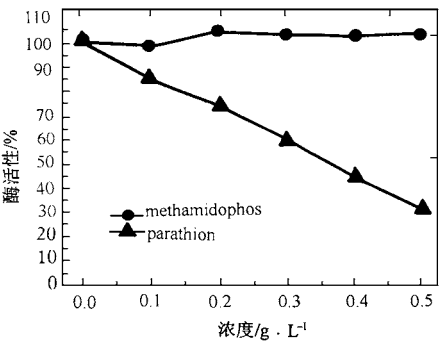


图 6 对硫磷抑制酸性磷酸酶活性曲线

Fig.6 Curve of inhibiting activity of acid phosphatase by parathion

(3) 目前, MAP 的毒性作用机理,一般认为与其它有机磷农药相似,主要是对靶细胞胆碱酯酶的抑制^[14].资料表明,有机磷农药对许多

酯酶都有抑制作用^[15].但笔者的试验显示,尽管 MAP 和对硫磷同属有机磷农药,但是它们对 WY-3 菌酸性磷酸酶活力影响却差别很大:在所试浓度范围内,前者(MAP)对酸性磷酸酶活力无任何抑制作用,而后者则有明显抑制效果(见图 6).这不仅为研究有机磷农药对酯酶的作用机制提供了一个新视角,而且对进一步认识 MAP 的毒性、毒理学也很有益处.

参考文献:

- 1 华小梅,单正军.我国农药生产及应用概况.环境科学进展,1996,4(2):33~45.
- 2 王恒祥.化学农药的现状、发展趋势和对策.农牧情报研究,1988,10:9~10.
- 3 肖华胜,王银善.假单胞菌 WS-5 的分离及降解甲胺磷某些性质的研究.中国环境科学,1995,15(6):464~469.
- 4 钞亚鹏,赵永芳,王银善等.非水溶性甲胺磷降解酶的检测.中国生物化学与分子生物学报,1999,15(1):145~147.
- 5 Myeong YC, Joseph F P, Fromr M R. Stereospecific enzymatic hydrolysis of phosphorus-sulfur bond in chiral organophosphate trimesters. Bioorg. & Med. Chem. Lett. 215, 1994, 4(2): 1472~1478.
- 6 吉尔鲍特(美),缪辉南,陈石根译.酶法分析手册.上海:上海科技出版社,1983.397.
- 7 曹志方,王银善.甲胺磷的微生物降解.环境科学进展,1996,6(4):31~35.
- 8 张纪忠.微生物分类学(第一版).上海:复旦大学出版社,1990.215~228.
- 9 王成维,山永清,际其晨.改良薄层层析法测定甲胺磷残留量.农药,1984,(6):37.
- 10 鲁子贤等.蛋白质和酶学研究方法.北京:科学出版社,1989.2.
- 11 Nimmo H G, Nimmo G A. A general method for the localization of enzymes that produce phosphate pyrophosphate of CO₂ after polyacrylamide gel electrophoresis. Anal. Biochem., 1982, 12(1): 17~22.
- 12 袁玉孙,朱婉华等.生物化学实验.北京:人民教育出版社,1982.51.
- 13 李玉京,李滨,李振声等.低磷营养胁迫条件下,小麦 RNA 酶与酸性磷酸酶活性的变化.西北植物学报,1997,17(4):417~425.
- 14 宋春艳,张宝真.甲胺磷毒理学研究进展.卫生毒理学杂志,1994,8(2):123~125.
- 15 武内志男,小川和朗.新酶组织化学.北京:人民卫生出版社,1983.181~182.
- 16 赵永芳,王银善编著.酯酶原理导论.武汉:武汉大学出版社,1998.17~23.