

一硫代磷酸酯杀虫剂的酶促降解*

虞云龙 陈鹤鑫 樊德方

吕斌

(浙江农业大学植保系, 杭州 310029) (中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 从降解菌 YF11中提取了降解酶并测定了该降解酶对对硫磷、甲基对硫磷和杀螟松的降解特性。对硫磷和甲基对硫磷酶促降解的最适 pH 均为8.0, 杀螟松的最适 pH 为8.5, 最适温度为32.5。该降解酶对对硫磷、甲基对硫磷和杀螟松的米氏常数分别为187.2、205.5和212.4nmol/ml。

关键词 微生物, 酶促降解, 对硫磷, 甲基对硫磷, 杀螟松, 米氏常数。

Enzymatic Degradation of O-phosphothioate Insecticides

Yu Yunlong Chen Hexin Fan Defang

(Dept. of Plant Protection, Zhejiang Agricultural Univ., Hangzhou 310029)

Lu Bin

(Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

Abstract Degradation characteristics of parathion, parathion-methyl and fenitrothion by a enzyme, extracted from the isolated strain YF11, was determined. The optimum pH of enzymatic degradation for parathion and parathion-methyl is 8.0, and that for fenitrothion is 8.5. The optimum temperature of enzymatic degradation for the insecticides is 32.5. Michaelis-Menten's constant (K_m) of the enzyme for parathion, parathion-methyl and fenitrothion are 187.2, 205.5 and 212.4nmol/ml, respectively.

Keywords microorganism, enzymatic degradation, parathion, parathion-methyl, fenitrothion, Michaelis-Menten's constant.

微生物及其降解酶的降解作用是环境中农药分解与转化的重要途径。利用微生物及其产生的降解酶进行土壤和水体中农药的去毒与净化是治理农药污染的有效方法, 并已显示出良好的应用前景^[1-4]。有机磷农药酶促降解的研究集中在从荧光假单胞菌(*Fluorescent pseudomonas*)为主的混合菌中提取的对硫磷水解酶(parathion hydrolase)^[4]。笔者在前期工作中分离到能同时降解一硫代磷酸酯和拟除虫菊酯类杀虫剂的广谱性降解菌 YF11, 对相应的杀虫剂具有较好的降解效果^[5,6]。本文主要考察降解菌 YF11所产生的降解酶对对硫磷、甲基对硫磷和杀螟松的降解性能。

1 材料与方法

(1) 菌种 菌株 YF11, 本实验室自分离。

(2) 降解菌的培养 降解菌 YF11接种于含对硫磷的普通培养基中, 30℃培养过夜, 新鲜菌液接种于15份200ml液体培养基(蛋白冻2g, 牛肉膏1g, NaCl 1g, 对硫磷0.15g, 蒸馏水1000ml, pH7.2)中, 于30℃摇床中培养1周。

(3) 降解酶的提取 降解菌 YF11的培养液离心(7500 × g)收集菌体, 菌体用2 × 20ml

* 国家自然科学基金资助项目(Project Supported by National Natural Science Foundation of China): 29477275
虞云龙: 男, 32岁, 博士后
收稿日期: 1997-06-23

pH 7.0的0.05mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液洗涤,将菌体悬浮于同一缓冲液中,比例为1g湿菌体·3.0ml缓冲液,置于冰浴中用ARTEK·Sonic Dimembrator Model 300中号探头处理6×1min,离心(7500×g)除去细胞碎片,得无细胞粗酶液。

收集菌体后的培养滤液边搅拌边加碾细的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至饱和度为100%,4盐析过夜,离心收集蛋白沉淀,用pH7.0的0.05mol/L的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液溶解后用同一缓冲液透析(MWCO=5000)至无 SO_4^{2-} ,得胞外粗酶液。

(4) 蛋白质含量的测定 按Bradford方法^[7]进行,以牛血清白蛋白为标准蛋白。

(5) 有机磷杀虫剂的酶促降解 预热的一定pH的含已知浓度对硫磷、甲基对硫磷和杀螟松的缓冲液中,加入适量预热的酶液,其总体积为3.0ml,在一定温度水浴中反应预定时间后用0.2ml 0.1mol/L的HCl溶液终止酶反应,用3×3ml CH_2Cl_2 (A.R)提取后转入丙酮中并定容至10ml,用气相色谱测定对硫磷、甲基对硫磷和杀螟松的含量。每1试验重复3次,同时设不加酶液的对照处理。

(6) 气相色谱测定条件 PE Sigma2000型气相色谱仪,检测器为NPD;色谱柱:2mm×1m的5%OV-17/chromosorb W DMCS(60-80目)玻璃柱,进样口温度230,检测器温度250,柱温220,载气(N_2)227.4kPa,空气104.7kPa,氦气137.8kPa

2 结果与分析

2.1 粗提酶中可溶性蛋白含量

按Bradford^[5]的方法,以牛血清白蛋白为标准蛋白测得粗提酶中可溶性蛋白的含量为0.299mg/ml。

2.2 pH 对对硫磷、甲基对硫磷和杀螟松酶促降解的影响

在pH6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5的1/15mol/L的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液中粗酶液对对硫磷、甲基对硫磷、杀螟松的降解活性如

图1(以最大活力的百分率表示)。在pH8.0时,粗酶液对对硫磷和甲基对硫磷的表现出最大的活力,粗酶液降解杀螟松的最大活力出现在pH8.5,说明该降解酶降解对硫磷、甲基对硫磷和杀螟松的最适pH分别为8.0和8.5。同时,由图1可以看出粗酶液在pH6.5—9.5范围内对对硫磷、甲基对硫磷和杀螟松均有较好的降解效果,而分离株YF11本身在pH6.5和pH9.5时生长极其缓慢,说明该降解酶对pH的忍受范围比分离株YF11菌体本身宽。

同时提取的胞外粗酶液在各pH对对硫磷、甲基对硫磷和杀螟松均未显示降解活性。

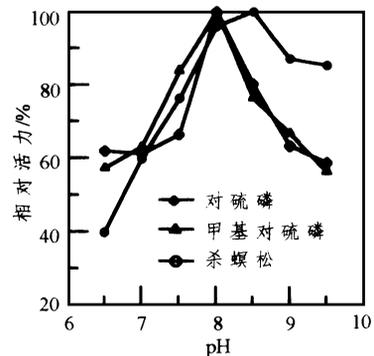


图1 pH对农药酶促降解的影响
(农药浓度20mg/L,温度30,时间3min)

2.3 温度对对硫磷、甲基对硫磷和杀螟松酶促降解的影响

在pH8.0的1/15mol/L的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液中以对硫磷为底物测定了温度对对硫磷酶促降解的影响,其结果见图2(以最大活力的百分率表示)。温度为32.5时,降解酶表现出最强的降解活性,即该降解酶对对硫磷的最适降解温度为32.5,在试验温度范围(25—35)内该降解酶均具有较好的降解活性。由于对不同底物而言,温度对酶活性的影响基本一致,可以预计,该降解酶对甲基对硫磷和杀螟松的最适温度也在32.5左右,在25—35间同样具有较好的降解活性。

2.4 降解酶的米氏常数 K_m 和最大反应速率 V_{max}

含已知浓度对硫磷、甲基对硫磷和杀螟松

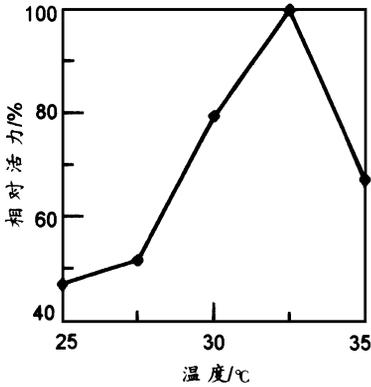


图2 温度对对硫磷酶促降解的影响
(浓度20mg/L, pH8.0, 时间3min)

的 pH8.0 的 1/15 mol/L 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液和粗提酶分别在 32.5 °C 的水浴中预热 5min, 将 0.3ml 酶液加入缓冲液中使其总体积为 3.0ml, 农药终浓度均分别为 25、50、75、100、125、200nmol/L, 同一水浴中反应 3min, 测定农药浓度对酶促降解反应速率的影响. 据对硫磷、甲基对硫磷和杀螟松的浓度和测得的反应速率作 Lineweaver-Burk 图(图3), 求得粗提酶对对硫磷、甲基对硫磷和杀螟松的米氏常数分别为 187.2、205.5、212.4nmol/ml(表1), 最大反应

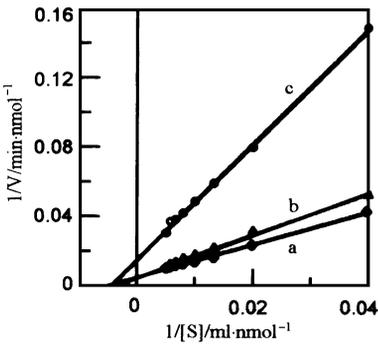


图3 粗酶液的 Lineweaver-Burk 图
a. 对硫磷 b. 甲基对硫磷 c. 杀螟松

表1 粗酶液对各农药的米氏常数

农药	米氏常数	最大反应速率	相关系数
	/nmol·min ⁻¹	/nmol·min ⁻¹	
对硫磷	187.2	194.6	0.9981
甲基对硫磷	205.5	173.7	0.9971
杀螟松	212.4	64.1	0.9992

速率分别为 194.6、173.7 和 64.1nmol/ml 即 2169、1936 和 714nmol/min/mg of protein.

3 讨论

降解菌 YF11 菌体本身对对硫磷的降解首先是磷酸酯键的水解, 产生对硝基苯酚, 然后是对硝基苯酚进一步氧化成 CO_2 (另文发表). 从降解菌 YF11 中提取到的降解酶对对硫磷、甲基对硫磷和杀螟松的降解也是从磷酸酯键的水解开始. 降解酶对对硫磷、甲基对硫磷和杀螟松的降解速率与化学水解 (0.1mol/L NaOH, 40 °C)^[6] 相比要快得多(表2). 说明该降解酶对对硫磷、甲基对硫磷和杀螟松均具有较好的降解能力.

有关有机磷农药的酶促降解的研究已报道的主要是从荧光假单胞菌 (*Fluorescent pseudomonas*) 为主的混合菌中提取的降解酶^[2,8], 此降解酶对对硫磷、甲基对硫磷和杀螟松具有较好的降解性能, 对 45 $\mu\text{mol/L}$ 的对硫磷、150 $\mu\text{mol/L}$ 的甲基对硫磷和 54 $\mu\text{mol/L}$ 的杀螟松的降解速率分别为 416、354 和 139nmol/min·mg⁻¹ (以蛋白计) (表2). 本试验中, 从降解菌 YF11 中提取的降解酶对 50 $\mu\text{mol/L}$ 的对硫磷、150 $\mu\text{mol/L}$ 的甲基对硫磷和 50 $\mu\text{mol/L}$ 的杀螟松的降解速率分别为 476、814 和 217nmol/min·mg⁻¹ (表2). 相对而言, 对硫磷的降解速率二者相仿, 混合菌降解酶对甲基对硫磷的降解速率低于降解菌 YF11 的降解酶, 而对杀螟松的降解速率 YF11 的降解酶要低于混合菌的降解酶, 但此时, YF11 提取的降解酶尚未达到最大反应速率.

鉴于本研究获得的降解酶具有较好的降解能力, 且已有的试验结果还证实该降解酶可以降解部分拟除虫菊酯类杀虫剂, 该酶具有较好的底物广泛性, 该降解酶具有较好的潜在应用价值. 对该降解酶进行稳定性、环境因子对其降解性能的影响情况以及固定化技术和固定化酶的降解特性等方面的研究, 对于农药污染的控制与净化来说, 无疑具有积极的意义.

表2 各农药不同酶促降解及化学水解的比较

农药	酶促降解(以蛋白质计)		化学水解 / nmol·ml ⁻¹ ·min ⁻¹
	/ nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹		
	YF11	混合菌	
对硫磷	416	476	0.17
甲基对硫磷	354	814	2.90
杀螟松	217	139	1.05

参 考 文 献

- 1 虞云龙, 樊德方, 陈鹤鑫. 农药微生物降解的研究现状与发展策略. 环境科学进展, 1996, 4(3): 28—36
- 2 Munnecke D M. Enzymatic detoxification of waste organophosphate pesticides. J. Agric. Food Chem., 1980, 28: 105—111
- 3 Nannipieri P, Ceccanti B, Conti C et al. Hydrolase extracted from soil, their properties and activities. Soil Biol.

- Biochem., 1982, 14: 275—263
- 4 Nannipieri P, Bollag J M. Use of enzyme to detoxify pesticides-contaminated soils and waters. J. Environ. Qual., 1991, 20: 510—517
 - 5 虞云龙, 宋凤鸣, 郑重等. 一株广谱性农药降解菌(*Alicali-genes* sp.) 的分离与鉴定. 浙江农业大学学报, 1997, 23(2): 111—115
 - 6 虞云龙, 盛国英, 傅家谟. 杀灭菊酯的微生物降解及酶促降解. 环境科学, 1997, 18(2): 5—8
 - 7 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem., 1976, 72: 248—254
 - 8 Munnecke D M. Enzymatic hydrolysis of organophosphate insecticides, a possible pesticide disposal method. Appl. Environ. Microbiol., 1976, 32: 7—13

《环境科学》征稿简则

1 《环境科学》由中国科学院环境科学委员会和中国科学院生态环境研究中心主办, 中国环境科学研究院、清华大学环境工程设计研究院和北京市环境保护科学研究院协办, 创刊于1976年, 是我国最早正式出版的关于环境科学的学术期刊. 本刊宗旨是报道我国环境科学领域中的最新科研成果, 促进国内外学术交流, 读者对象为环境科学研究人员、工程技术人员、环境管理干部和大中专院校有关专业的师生等.

2 《环境科学》力求及时报道我国环境科学领域的具有创造性的、高水平的、有重要意义的基础研究和应用研究方面的成果以及阶段性科技成果. 也发表科研成果的专题评述和学科最新进展的综合评述以及反映控制污染、清洁生产和生态环境建设战略思想的专论等.

3 来稿要求和注意事项

(1) 来稿要求论点明确、数据可靠、层次分明、结构完整, 文字图表精练. 研究报告一般不超过5000字(含图、表和文献), 综述不超过6000字, 文首给出中英文文摘和关键词, 以及英译题目、作者姓名汉语拼音和工作单位的英文名, 一式2份打印稿.

(2) 来稿务必做到清稿定稿. 稿中外文缩写在第一次出现时应写明中文名称、外文全称; 外文字母必须分清大、小写; 上、下角的字母、数码和符号, 其位置高低应区别明显; 容易混淆的外文字母、符号, 请在第一次

出现时用铅笔批清. 计量单位一律使用《中华人民共和国法定计量单位》.

(3) 文中插图请绘, 墨色要墨, 线条要匀; 或计算机绘图激光样, 图中文字、符号、数码和纵横坐标量及其单位必须写清, 并与正文一致. 照片要求黑白清晰, 层次分明, 插图切勿过大.

(4) 参考文献择主要的列入, 未公开发表的内部资料可以脚注形式引用. 文献按文中出现先后次序编排并在引证处用右上角方括号标出序号. 所引文献内容包括作者、文题、杂志名、年、卷(期)、页码; 书籍或文集还应有出版地、出版社, 所引文献具英文表达形式的要用英文表达.

(5) 来稿要注明课题性质, 如国家(省、部级)自然科学基金资助课题, 国家(省部级)攻关课题和863课题等.

(6) 给出第一作者的性别, 年龄, 学位和职称, 以便国内外检索系统采用.

(7) 来稿文责自负, 编辑对来稿可作文字上和编辑技术上修改或删除. 切勿一稿两投, 三个月内未见通知者, 作者可另行处理, 对未刊稿件一般不退, 请自留底稿.

(8) 来稿请写明作者详细地址、邮政编码, 电话, 挂号寄至北京2871信箱《环境科学》编辑部.

邮政编码: 100085 电话: 62925511-2138