

拟除虫菊酯类杀虫剂的酶促降解^{*}

虞云龙 陈鹤鑫 樊德方
(浙江农业大学植保系, 杭州 310029)

盛国英 傅家谟

(中国科学院广州地球化学研究所有机地球化学国家重点实验室及广东省环境资源利用与保护重点实验室, 广州 510640)

摘要 测定了降解菌 *Alcaligenes* sp. YF 11 粗酶液对拟除虫菊酯类杀虫剂的降解性能. 粗酶液降解杀灭菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯、溴氰菊酯、氯菊酯、三氟氯氰菊酯的最适 pH 分别为 8.0、8.5、8.0、8.0、9.0、7.5; 米氏常数分别为 41.4、136.8、65.4、222.8、5.2、8.67 nmol/ml; 最适温度为 32.5℃. 该粗酶液在 pH 5.0—10.5 均具有降解活性.

关键词 拟除虫菊酯类杀虫剂, 微生物, 酶促降解.

Enzymatic Degradation of Synthetic Pyrethroid Insecticides

Yu Yunlong Chen Hexin Fan Defang

(Department of Plant Protection, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029)

Sheng Guoyin Fu Jiamo

(State Key Lab. of Organic Geochemistry & Guangdong Key Lab. of Environ. Protection and Resources Utilization, Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640)

Abstract Degradative characteristics of synthetic pyrethroid insecticides was determined by the crude enzyme extracted from the isolated strain YF11 of *Alcaligenes* sp.. The crude enzyme activities have optimum pH of 8.0, 8.5, 8.0, 8.0, 9.0, 7.5 for enzymatic degradation of fenvalerate, fenpropathrin, cypermethrin, deltamethrin, permethrin, cyhalothrin, and has optimum temperature of 32.5℃. The Michaelis-Menten constants are 41.4, 136.8, 64.36, 222.8, 5.2, 8.67, respectively. The crude enzyme is effective at pH values range of 5.0—10.5.

Keywords synthetic pyrethroid insecticide, microorganism, enzymatic degradation.

用微生物产生的酶降解环境中包括农药在内的有机污染物是环境污染治理的重要途径之一, 并已显示出良好的应用前景^[1-9]. 拟除虫菊酯类杀虫剂的酶促降解的研究仅仅是拟除虫菊酯转化菌 *Bacillus cereus* 中提取的氯菊酯酶 (permethrinase)^[10]. 笔者在前期工作中从污泥中分离到能同时降解有机磷酸酯和拟除虫菊酯类杀虫剂的广谱性降解菌 *Alcaligenes* sp. YF 11^[11], 从其培养物提取的酶液对杀灭菊酯具有较好的降解效果^[12]. 本文考察该酶降解拟除虫菊酯类杀虫剂的降解性能, 为该类药物污染的酶学控制提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 菌种

Alcaligenes sp. YF 11^[11].

1.2 降解酶的提取

Alcaligenes sp. YF 11 接种于肉汁胨培养基 (蛋白胨, 10g; 牛肉膏, 5g; 蒸馏水, 1L; pH 7.2) 中, 30℃ 培养过夜, 新鲜菌液接种于培

^{*} 国家自然科学基金资助项目 (Project Supported by National Natural Science Foundation of China): 29477275, 49632060

虞云龙: 男, 33 岁, 博士, 副研究员

收稿日期: 1997-10-27

培养基(蛋白胨, 2g; 牛肉膏, 1g; 杀灭菊酯, 0. 2g; 蒸馏水, 1L; pH7. 2)中, 30℃摇床培养1周。 *Alcaligenes* sp. YF11 培养液离心(7500 × g)收集菌体, 菌体用 20ml pH7. 0 的 0. 05mol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄缓冲液洗涤 2 次。将菌体悬浮于同一缓冲液中, 比例为 1g 湿菌体: 3. 0ml 缓冲液, 置冰水浴中用 ARTEK · Sonic Dismenbrator(Model300) 超声波破碎器处理 6 次, 每次 1min, 离心(7500 × g) 除去细胞碎片, 得无细胞抽提液即粗酶液。收集菌体后的培养滤液, 边搅拌边加硫酸铵至饱和度为 100%。 4 盐析过夜, 离心收集蛋白沉淀, 用 pH7. 0 的 0. 05mol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液溶解并用同一缓冲液透析(MWCO = 5000) 至无硫酸根, 得胞外酶粗提液。

1. 3 蛋白质含量的测定

胞内和胞外酶粗提液的蛋白含量按 Bradford^[13] 方法进行, 以牛血清白蛋白为标准蛋白。

1. 4 农药降解试验

预热的一定 pH 的含已知浓度杀虫剂缓冲液中, 加适量预热粗酶液, 使其总体积为 3. 0ml, 一定温度水浴中反应一定时间后加 0. 2ml1. 0mol/L 的盐酸终止酶反应, 杀虫剂用 4ml 石油醚提取 2 次浓缩后用气相色谱测定。每一试验重复 3 次, 同时设不加酶液对照处理。

2 结果与讨论

2. 1 pH 对农药酶促降解的影响

在 pH6. 5、7. 0、7. 5、8. 0、8. 5、9. 0、9. 5 的 1/ 15mol/L Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲液中粗提酶降解 20mg/L 的杀灭菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯、溴氰菊酯、氯菊酯、三氟氯氰菊酯的活性如表 1 所示(以最大活力的百分率表示)。粗酶液降解各农药的最适 pH 分别为: 杀灭菊酯, 8. 0; 甲氰菊酯, 8. 5; 氯氰菊酯, 8. 0; 溴氰菊酯, 8. 0; 氯菊酯, 9. 0; 三氟氯氰菊酯, 7. 5。因农药结构不同, 最适 pH 有所差异。粗酶液在 pH6. 5、9. 5 均保持较好的降解活性, 说明降解酶对 pH 的忍受范围比 *Alcaligenes* sp. YF11 本身宽^[11]。

胞外粗提酶在各 pH 均未显示降解活性。

表 1 不同 pH 农药酶促降解的相对活性¹⁾ / %

pH	6. 5	7. 0	7. 5	8. 0	8. 5	9. 0	9. 5
杀灭菊酯	50. 9	54. 4	67. 6	100	78. 5	70. 1	70. 8
甲氰菊酯	41. 3	47. 2	68. 7	86. 5	100	96. 8	91. 1
氯氰菊酯	56. 2	60. 5	87. 4	100	90. 1	88. 6	83. 1
溴氰菊酯	51. 3	63. 4	77. 5	100	84. 1	76. 2	71. 6
氯菊酯	58. 6	64. 0	73. 6	83. 5	90. 2	100	98. 0
三氟氯菊酯	60. 3	68. 4	100	81. 4	58. 2	57. 3	54. 5

1) 试验条件: 温度 30℃, 反应时间 3min, 杀虫剂浓度 20mg/L

2. 2 粗酶液的 pH 稳定性

粗酶液在 25℃的 pH5. 0、5. 5、6. 0、6. 5、7. 0、7. 5、8. 5、9. 0、9. 5、10. 0 的 1/ 15mol/L 的 Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲液中保温 30min, 后以 20mg/L 的杀灭菊酯为底物在同样温度下测定经保温后粗酶液的降解活性。不同 pH 保温 30min 后, 粗酶液降解活力的变化如图 1 所示。

由图 1 可以看出, 粗酶液在 pH7. 5—8. 5 较稳定, 在 pH5. 0 和 pH10. 5 粗酶液易于变性失活。从粗酶液活力的变化情况看, 粗酶液对 pH 的适应性超过产生该酶的 *Alcaligenes* sp. YF11 本身。

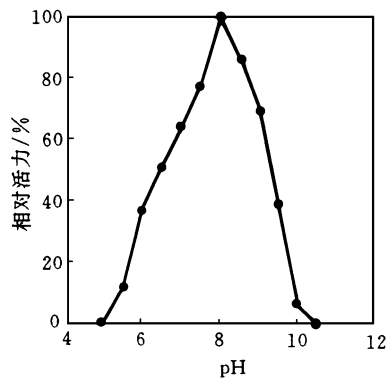


图 1 粗酶液的 pH 稳定性

2. 3 温度对农药酶促降解的影响

在 pH8. 0 的 1/ 15mol/L Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲液中温度对粗酶液降解杀灭菊酯的影响如图 2 所示(以最大活力的百分率表示)。由图 2 可以看出, 粗提酶在试验温度范围内能保持较好的降解活性, 粗酶液降解杀灭菊酯的最适温度均为 32. 5℃, 接近于 *Alcaligenes*

sp. YF11 的最适生长温度^[11].

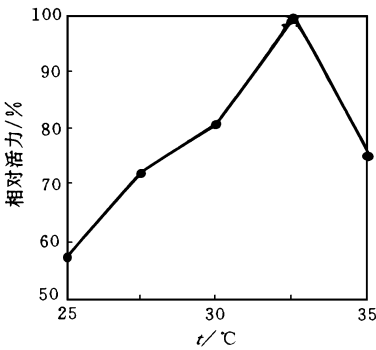


图2 温度对杀灭菊酯酶促降解的影响
(pH, 8.0; 浓度, 20mg/L; 反应时间, 3min)

2.4 粗酶液的热稳定性

将粗酶液分别在 25、40、50 保温一定时间后, 测定粗酶液降解杀灭菊酯活力的变化, 其结果如图 3. 粗酶液在 25 时较为稳定, 保温 30h, 其活力损失不大, 保持初活力的 99%; 40 时粗酶液的稳定性略差, 保温 30h 后, 活力损失 10%; 50 时粗酶液的活力无法维持长期稳定, 保温 30h, 其活力损失达 83.6%, 仅保持初活力的 16.4%.

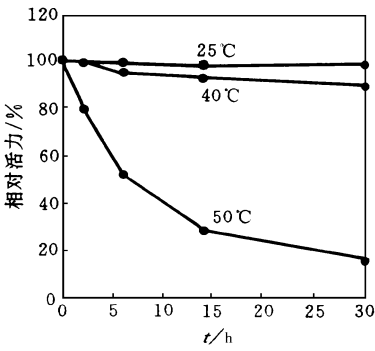


图3 粗酶液的热稳定性

表2 各杀虫剂的试验浓度及 v_{max} 和 K_m

杀 虫 剂	浓度/ $\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1}$								v_{max}		K_{m}	系 数
									$/\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1}$			
杀 灭 菊 酯	7.62	6.67	5.71	4.76	3.81	2.85	1.90	0.95	19.0		41.4	0.9830
甲 氰 菊 酯	9.15	8.01	6.86	5.71	4.57	3.43	2.29	1.14	29.3		136.8	0.9557
氯 氰 菊 酯	7.68	6.72	5.76	4.80	3.84	2.88	1.92	0.96	13.4		65.36	0.9494
溴 氰 菊 酯	6.33	5.53	4.75	3.95	3.17	2.38	1.59	0.79	76.5		222.8	0.9949
氯 菊 酯	8.17	7.15	6.13	5.11	4.08	3.06	2.04	1.02	1.87		5.2	0.9898
三 氟 氯 氰 菊 酯	7.11	6.22	5.33	4.44	3.56	2.66	1.77	0.88	2.63		8.67	0.9348

拟除虫菊酯酶促降解的研究不多, 主要是氯菊酯酶(permethrinase)^[10]. 氯菊酯酶可以降解氯菊酯、杀灭菊酯、溴氰菊酯等 12 种拟除虫菊酯类杀虫剂. 氯菊酯酶 37、8h 后对 2ml 的 26 $\mu\text{mol/L}$ 的氯菊酯的降解率为 65%, 20 $\mu\text{mol/L}$ 的溴氰菊酯的降解率为 30%, 24 $\mu\text{mol/L}$ 的杀灭菊酯的降解率为 55%, 22 $\mu\text{mol/L}$ 的三氟氯氰菊酯的降解率为 36%. 即氯菊酯酶对氯菊酯、溴氰菊酯、杀灭菊酯、三氟氯氰菊酯的降解速率分别为 0.23—0.35、0.08—0.125、18.3—27.5、0.11—0.165nmol/(min·mg) 蛋白(表 3). 由此, *Alcaligenes* sp. YF11 粗酶液对氯菊

2.5 粗提酶对各杀虫剂的米氏常数 K_m 和最大反应速率 v_{max}

含已知浓度杀虫剂(表 2)的 pH8.0 的 1/15mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{--K}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液和粗提酶分别在 32.5 水浴中预热 5min, 后将 300 μl 酶液加入缓冲液中(总体积为 3.0ml)同一水浴反应 3min, 测定杀虫剂浓度对反应速率的影响. 据杀虫剂浓度和测得的反应速率作 Lineweaver-Burk 图, 求得粗提酶对各杀虫剂的米氏常数 K_m 和最大反应速率 v_{max} 如表 2.

酯、溴氰菊酯、杀灭菊酯和三氟氯氰菊酯的降解速率明显高于氯菊酯酶(表 3).

表3 拟除虫菊酯杀虫剂不同酶促降解的比较
(以蛋白计)/ $\text{nmol} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg})^{-1}$

杀虫剂	氯菊酯酶	<i>Alcaligenes</i> sp. YF11
		粗酶液
杀灭菊酯	18.3—27.5(24) ¹	40(7.6)
甲氰菊酯		32(9.2)
氯氰菊酯		28(7.7)
溴氰菊酯	0.08—0.125(20)	29(6.3)
氯菊酯	0.23—0.35(26)	14(8.2)
三氟氯氰菊酯	0.11—0.165(22)	18(7.1)

1) 括号内数据为试验浓度($\mu\text{mol/L}$)

以上结果显示, 广谱性降解菌 *A. caligenes* sp. YF11 所产生的胞内酶对拟除虫菊酯类杀虫剂具有较好的降解效果, 并且拟除虫菊酯类杀虫剂是我国目前使用的主要农药品种之一, *A. caligenes* sp. YF11 及其产生的降解酶作深入研究, 对农药污染的控制与净化无疑具有积极的意义.

参 考 文 献

1 Munnecke D M. Enzymatic detoxification of waste organophosphate pesticides. J. Agric. Food Chem., 1980, 28: 105—111

2 Nannipieri P, Bollag J M. Use of enzyme to detoxify pesticide-contaminated soils and waters. J. Environ. Qual., 1991, 20: 510

3 Mulbry W, Kearney P C. Degradation of pesticides by micro-organisms and the potential for genetic manipulation. Crop Protection, 1991, 10: 334—346

4 Smith J M, Payne G F, Lumpkin J A. Enzyme-based strategy for toxic waste treatment and waste minimization. Biotech. Bioeng., 1992, 39: 741—752

5 Lee S G, Hong S P, Sung M H. Removal and bioconversion of phenol in wastewater by a thermostable β tyrosinase. Enzyme Microb. Technol., 1996, 19: 374—377

6 Male K B, Brown R S, Luong J H T. Enzymatic oxidation of water-soluble cyclodextrin-polynuclear aromatic hydrocarbon inclusion complexes using lignin peroxidase. Enzyme Microb. Technol., 1995, 17: 607—614

7 Courteix A, Bergel A. Horseradish peroxidase-catalyzed hydroxylation of phen I. Thermodynamic analysis. Enzyme Microb. Technol., 1995, 17: 1087—1093

8 Courteix A, Bergel A. Horseradish peroxidase-catalyzed hydroxylation of phen II. Kinetic model. Enzyme Microb. Technol., 1995, 17: 1094—1100

9 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

10 Maloney S E, Mauleand A, Smith A R W. Purification and preliminary characterization of permethrinase from a pyrethroid-transforming strain of *Bacillus cereus*. Appl. Environ. Microbiol., 1993, 59: 2007—2013

11 虞云龙, 宋凤鸣, 郑重等. 一株广谱性农药降解菌(*A. caligenes* sp.) 的分离与鉴定. 浙江农业大学学报, 1997, 23(2): 111

12 虞云龙, 盛国英, 傅家谟等. 杀灭菊酯的微生物降解及酶促降解. 环境科学, 1997, 18(2): 5—8

13 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

亚硝酸胺的环境卫生学

空气、水、土壤和食品等介质中都含有亚硝酸胺, 尤其食品中的亚硝酸胺倍受人们关注. 对鱼和肉的腌制和烘烤加工处理, 尤其是油煎烹调时, 分解出一些胺类化合物. 腐烂变质的鱼和肉, 也分解出胺类, 这些胺类与亚硝化试剂作用生成亚硝酸胺, 鱼和肉产品中的亚硝酸胺主要是吡咯烷亚硝酸胺和二甲基亚硝酸胺. 油煎咸肉中二甲基亚硝酸胺的含量约为痕量—15 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 吡咯烷亚硝酸胺的含量约为痕量—30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 而油煎肉产品时逸出的烟气中含有更高水平的亚硝酸胺. 在各类香肠和罐头鱼以及熏鱼和熏肉中, 二甲基亚硝酸胺的含量约为1—50 $\mu\text{g}/\text{kg}$. 在发霉变质的奶酪产品中也含有微量的亚硝酸胺. 如果人们从环境中摄入亚硝酸盐和胺类, 也能在胃内合成亚硝酸胺. 应当注意的是香烟的烟气中含有多种烟草特有的亚硝酸胺. 实验证明, 亚硝酸胺对40多种不同的动物显示出致癌作用, 包括猿、猴等哺乳类动物, 以及鱼和两栖类动物. 亚硝酸胺几乎对动物所有的脏器和组织都可以诱发出肿瘤. 但是致癌的主要器官是肝脏、

食管、肺和胃等. 由于亚硝酸胺易于通过环境介质的多种途径而进入人体, 从而危害人体健康, 可能诱发肿瘤. 关于亚硝酸胺的致癌机理, 最近的动物实验证明, 亚硝酸胺这类烷化剂, 在动物体内经活化代谢和细胞色素P450同工酶作用, 形成不稳定中间体并立即分解为烷化亲电试剂, 然后与脱氧核糖核酸(DNA)的氮或氧的中心部位反应, 形成DNA加合物, 导致DNA遗传密码的损伤, 引起致畸或致癌作用. 实验还证明, 给予实验动物二甲基亚硝酸胺, 在动物的尿中检出相应水平的3-甲基腺嘌呤和7-甲基鸟嘌呤, 这就是二甲基亚硝酸胺在体内的DNA加合物, 即甲基化核酸碱基.

预防亚硝酸胺对人体健康危害最有效的措施是清除环境中亚硝酸胺的存在, 阻断亚硝酸胺对人体的各种接触; 其次是服用一定量的维生素C和A, 破坏亚硝酸胺在体内的反应和作用.