

真菌 WZ- I 对有机磷杀虫剂毒死蜱的酶促降解

谢慧, 朱鲁生*, 王军, 王秀国, 刘伟, 钱博, 王倩

(山东农业大学资源与环境学院, 泰安 271018)

摘要:从高效降解真菌镰孢霉属 WZ- I (*Fusarium* LK.ex Fx) 中提取了降解酶, 研究了该降解酶的分离条件及对毒死蜱的降解特性, 研究表明, 其胞内酶对毒死蜱的降解率高达 60.8%, 细胞碎片对毒死蜱的降解率为 48%, 但由 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀提取的胞外酶液对毒死蜱的降解率仅为 11.3%, 经 8 次非诱导条件下培养提取粗酶液, 酶活力损失较少, 判断 WZ- I 菌株的毒死蜱降解酶为胞内酶且属于组成酶. 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 $3.36 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 该酶对毒死蜱的酶促降解最适 pH 为 6.8, 在 pH 6.0 ~ 9.0 之间都有较高的活性; 最适温度为 40 °C, 在实验温度范围 (20 ~ 50 °C) 内该降解酶均具有较好的降解活性, 但在 55 °C 时, 酶活迅速降低, 降低到最高酶活力的 41%. 测得粗提酶中其米氏常数 K_m 为 $1.04926 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $v_{\max}$ 为 $0.2535 \mu\text{mol} \cdot (\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$. 研究结果表明该酶具有较好的热稳定性和 pH 稳定性, 对热和 pH 均具有较好的耐受力, 高效降解真菌 WZ- I 所产生的胞内酶对毒死蜱具有较好的降解效果.

关键词:毒死蜱; 酶促降解; 真菌 WZ- I; 米氏常数

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2005)06-0164-05

Enzymatic Degradation of Organophosphorus Insecticide Chlorpyrifos by Fungus WZ- I

XIE Hui, ZHU Lu-sheng, WANG Jun, WANG Xiu-guo, LIU Wei, QIAN Bo, WANG Qian

(College of Resources and Environment, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

Abstract: Degradation characteristics of chlorpyrifos insecticides was determined by the crude enzyme extracted from the isolated strain WZ- I (*Fusarium* LK.ex Fx). The best separating condition and the degrading characteristic of chlorpyrifos were studied. Rate of degradation for chlorpyrifos by its intracellular enzyme, extracellular enzyme and cell fragment was 60.8%, 11.3% and 48%, respectively. The degrading enzyme was extracted after this fungus was incubated for 8 generations in the condition of non-inducement, and its enzymic activity lost less, the results show that this enzyme is an intracellular and connatural enzyme. The solubility protein of the crude enzyme was determined with Albumin (bovine serum) as standard protein and the solubility protein of the crude enzyme was $3.36 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. The pH optimum for crude enzyme was 6.8 for enzymatic degradation of chlorpyrifos, and it had comparatively high activity in the range of pH 6.0 ~ 9.0. The optimum temperature for enzymatic activity was at 40 °C, it still had comparatively high activity in the range of temperature 20 ~ 50 °C, the activity of enzyme rapidly reduced at 55 °C, its activity was 41% of the maximal activity. The crude enzyme showed K_m value for chlorpyrifos of $1.04926 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, and the maximal enzymatic degradation rate was $0.2535 \mu\text{mol} \cdot (\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$. Additional experimental evidence suggests that the enzyme had the stability of endure for temperature and pH, the crude enzyme of fungus WZ- I could effectively degrade chlorpyrifos.

Key words: chlorpyrifos; enzymatic degradation; fungus WZ- I; K_m

有机磷农药的大量使用对环境已经造成了相当程度的污染^[1], 大量研究表明土壤和水中的微生物对有机磷农药降解起到重要作用. 研究表明利用微生物及其产生的降解酶对环境中农药残留的去除与净化是治理农药污染的有效方法, 并已显示了良好的应用前景^[2~4]. 有机磷农药酶促降解首先从荧光假单胞菌为主的混合菌种分离纯化对硫磷降解酶开始, 并研究了它的降解特性, 表明该酶比产生酶的微生物菌体更能忍受异常环境, 并且其降解效果远胜于微生物本身^[4,5].

毒死蜱是一种被广泛应用的有机磷杀虫剂, 在美国被广泛应用于家庭和农业, 在 1995 年大约 4 000 ~ 6 000 t 毒死蜱应用于植物保护, 约 900 ~

1 800 t 在非农业中使用^[6], 毒死蜱的广泛应用对环境造成了严重的污染, 对其环境行为及其污染状况的研究已有许多报道^[7~14], 但是有关真菌对毒死蜱农药的酶促降解报道较少. 真菌 WZ- I 是本实验室从生产毒死蜱的农药厂排放的污泥中筛选出的 1 株高效降解毒死蜱的镰孢霉属菌株, 本文研究了该降解酶的分离条件以及降解酶特性.

收稿日期: 2004-11-19; 修订日期: 2005-04-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (20477022); 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目 (03BS123)

作者简介: 谢慧, 女, 硕士研究生, 主要从事农药残留与环境毒理方面的研究, E-mail: eti@sdau.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: lushzhu@sdau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 菌种和培养基

菌种 WZ-1 从农药厂排污口污泥中分离所得,菌落白色,气生菌丝呈绒状,生长比较旺盛,常产生紫色色素;大型孢子数量多,为 4 个细胞,大小约为 $37.0\mu\text{m} \times 5.0\mu\text{m}$,微弯,镰刀形,无足细胞和厚垣孢子.经鉴定为镰孢霉属(*Fusarium* LK. ex Fx),该菌株在 5d 内对毒死蜱的降解率高达 93%.

PDA 培养基^[15],分为固体培养基和液体培养基,在液体培养基中加入琼脂即为固体培养基.

1.2 菌株 WZ-1 的培养

将在固体培养基斜面于 30℃ 培养 5d 的新鲜孢子接种到液体培养基中,30℃ 摇床(转速 105 r/min)培养 96~120h.

1.3 降解酶的提取

胞内酶的提取:将培养好的菌株以 8 000 r/min 进行离心,去除上清培养基,得菌丝球.将菌体用 30 mL $\times$ 3 pH 7.0 的 $0.05\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液($\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$)洗涤,然后再以 8 000 r/min 离心收集菌体,以 1.5 倍菌体体积加入少量缓冲液置于冰浴中用超声波细胞粉碎机的探头处理 10 次,每次 1 min,以 8 000 r/min 离心,除去细胞碎片,得胞内粗酶液.

胞外酶提取: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 80%(25℃ 时, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶解度为 $561\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),4℃ 盐析过夜,离心收集蛋白沉淀,用 pH 7.0 的 0.05mol/L 的磷酸盐缓冲液溶解后用同一缓冲液透析(分子量为 8 000~14 400)至无 $(\text{NH}_4)^+$ (用纳氏试剂检验),得胞外粗酶液.

1.4 酶蛋白质含量的测定

样品中的实际含量按 Bradford 法^[16]进行测定,以牛血清白蛋白为标准蛋白,在 595nm 进行比色测定.

1.5 毒死蜱残留量的测定

根据毒死蜱在紫外光区 293nm 处有特征吸收峰的性质,用紫外分光光度法测定溶液中毒死蜱的残留量^[17].具体方法为:向培养液中加入 5 mL 石油醚,在混合振荡器上振荡提取后,用紫外分光光度计测定其 293nm 波长的吸光值($A_{293\text{nm}}$),然后由标准曲线换算出毒死蜱的浓度.同时做了用气相色谱与分光光度计测定方法相比较的试验,其测定结果相近,并且该方法快速、简单、可靠.

1.6 判断毒死蜱降解酶的形成

将菌株分别接种于含毒死蜱农药的培养基和不含农药的培养基中于 30℃ 时培养,即在诱导和非诱导条件下生长.将菌体连续在不含毒死蜱农药的 PDA 培养基中转接 8 次后测定菌体的毒死蜱降解活性.

1.7 毒死蜱的酶促降解

向 3 mL 预热的一定 pH 的含已知浓度毒死蜱的缓冲液中,加入 0.2 mL 预热的酶液,在一定温度水浴中反应 10 min 后,用 0.2 mL $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCl 溶液终止酶反应.测定溶液中毒死蜱的残留量,重复 3 次,同时设加入失活的酶液处理作为对照.

1.8 温度对酶活力的影响

取 3 mL pH 7.0 的 $50\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 毒死蜱的缓冲液于试管中,分别置于 20、25、30、35、40、45、50℃ 等不同温度的水浴中预热 10 min,然后加入 0.2 mL 酶液反应 10 min,按照上述的毒死蜱的残留量的测定方法测定溶液中毒死蜱的残留量得到相同的酶液在不同的反应温度下所具有的酶活力单位.以最高酶活力为 100%,其他条件下的酶活力与之相比得各自的相对酶活力,本文中酶活力均用相对酶活力表示.

1.9 pH 对酶活力的影响

首先配制不同 pH 值的 $0.05\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液($\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$),pH 分别设为 6.0、6.5、6.8、7.2、7.5、8.0、8.5、9.0,并分别用 pH 计进行校正.取 3 mL 不同 pH 值的 $50\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 毒死蜱的缓冲液于试管中,在 40℃ 下预热 10 min 后加入 0.2 mL 酶液,混合后在 40℃ 反应 10 min,分别各自测定酶活力.

1.10 WZ-1 胞内粗酶液对毒死蜱降解的动力学常数的测定(米氏常数 K_m 和最大反应速度 $v_{\max}$)

在试管中,加入一定量的用 pH 6.8 的 $0.05\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液配制的不同浓度的毒死蜱溶液,最初底物浓度分别为 1.14×10^{-4} 、 1.43×10^{-4} 、 2.28×10^{-4} 、 2.85×10^{-4} 、 3.42×10^{-4} 、 4.28×10^{-4} 、 $5.71 \times 10^{-4}\text{mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$,在 40℃ 水浴中预热 10 min,然后加入预热的酶液 0.2 mL,反应 10 min,测定毒死蜱浓度对反应速率的影响.

1.11 毒死蜱降解酶的 pH 稳定性及热稳定性

将粗酶液在不同 pH 值的缓冲液中于 40℃ 保温 2h 后,分别测定其在 pH 7.0、40℃ 下的剩余酶活力.将酶液在 $0.05\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 中性磷酸盐缓冲液中,于不同温度下保温 20、30、60、90 和 120 min,按降解酶的

酶活测定法测定剩余酶活力.

1. 12 降解率的计算

计算公式:

$$X = \frac{c_{CK} - c}{c_{CK}} \times 100 \% \tag{1}$$

式(1)中, X:毒死蜱降解酶的降解率; c:接酶液处理缓冲液中毒死蜱的浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$); c_{CK} :对照缓冲液中毒死蜱的浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$).

表 1 不同浓度毒死蜱的吸光值

Table 1 The OD value of different concentration chlorpyrifos												
浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0.2	0.5	1	2	5	10	20	50	100	200	500	1 000
吸光值	0.002	0.007	0.015	0.031	0.081	0.168	0.339	0.863	1.746	3.369	4.039	4.215

从图 1 可以看出,当毒死蜱的浓度小于 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,浓度和吸光值之间成良好的线性关系;可以认为使用紫外分光光度法测定水体中毒死蜱,在毒死蜱浓度小于 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的情况下是可行的.从表 2 可以看出,在毒死蜱的添加浓度分别为 5、10、20、50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 等不同浓度水平时,平均添加回收率为 90.68%~99.93%;测定结果的变异系数均小于 5.0%,完全符合残留检测要求.

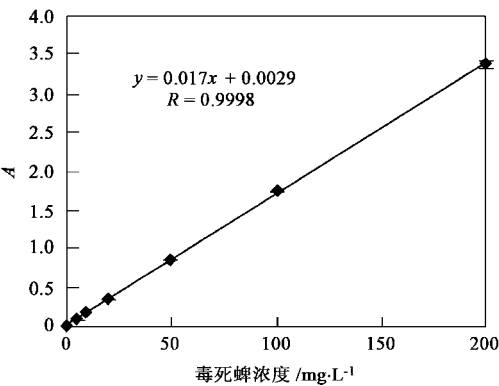


图 1 相关性曲线
Fig.1 The curve of relativity

Table 2 The recovery rate and CV of chlorpyrifos in the buffer		
浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	平均回收率 ¹⁾ / %	变异系数/ %
5	(99.50 ± 0.24)	4.80
10	(95.56 ± 0.17)	1.79
20	(99.93 ± 0.25)	1.23
50	(90.68 ± 0.37)	0.83

1) 每种浓度处理做了 3 次测定

2. 2 毒死蜱降解酶的形成

菌体经用毒死蜱诱导或未经诱导,研究结果表

2 结果与讨论

2. 1 紫外分光光度法的可靠性分析

由表 1 可以看出,当毒死蜱的浓度为 0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,在 293 nm 处测定的吸光值为 0.002;当毒死蜱的浓度低于 0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,在 293 nm 处测定不到吸光值,则该方法的最低检测浓度为 0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

明,其粗酶液降解毒死蜱的效果无显著差异.由此判断,菌体 WZ-I 的毒死蜱降解酶不是诱导酶,而是组成酶.因组成酶通常被认为是细胞内固有的酶类,其活性形成受外界条件影响较少,若为诱导酶,在未经诱导条件下培养几代后,酶活性便迅速的降低,甚至全部消失.

2. 3 毒死蜱降解酶的定位

毒死蜱降解酶活性组分的定位是通过处理破碎细胞.培养液的上清液,分别测定其降解率后予以确定的.由表 3 可见,从培养液的上清液中提取到胞外粗酶液,与毒死蜱反应后测定,其胞外酶降解毒死蜱活性较低,在 10 min 内对 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 毒死蜱的降解率仅为 11.3%.用超声波细胞粉碎机处理破碎菌体一段时间后,离心所得菌体碎片和胞内粗酶液,测定其降解率,胞内酶的酶活明显增强,在 10 min 内对 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 毒死蜱的降解率高达 60.8%.菌体碎片中酶活略微减少,在 10 min 内对 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 毒死蜱的降解率为 47.9%.表明经超声波细胞粉碎机处理后,细胞内的酶大部分释放到溶液中,但细胞碎片中仍有部分酶存在,确证该降解酶主要为胞内酶.

表 3 真菌 WZ-I 不同组分对 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 毒死蜱的降解

Table 3 Biodegradation of chlorpyrifos in the different component of strain WZ-I	
组分	降解率/ %
胞外酶液	11.3
胞内酶液	60.8
超声波处理后细胞碎片	47.9

2. 4 粗酶液中可溶性蛋白质含量

按 Bradford 的方法(考马斯亮蓝染色法),以牛血清白蛋白为标准蛋白测得胞内酶中可溶性蛋白的含量为 3.36 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,胞外酶中可溶性蛋白质含量

为 $1.24 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

2.5 温度对毒死蜱酶促降解的影响

不同温度条件下对毒死蜱酶促降解的影响见图 2,酶活力以最大活力的百分率表示,图 2 表明,温度为 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,降解酶表现出最强的降解活性,即该降解酶对毒死蜱的最适降解温度为 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$,在实验温度范围($20\sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$)内该降解酶均具有较好的降解活性.但在 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,酶活性迅速降低,降低到最高酶活力的 41% .

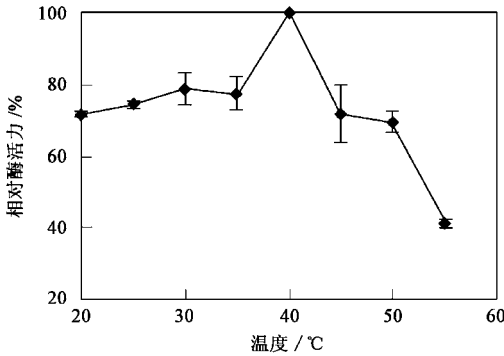


图 2 温度对毒死蜱酶促降解的影响

Fig.2 Effect of temperature on enzymatic degradation of chlorpyrifos

2.6 pH 对毒死蜱酶促降解的影响

在 $\text{pH } 6.0\ 6.5\ 6.8\ 7.2\ 7.5\ 8.0\ 8.5\ 9.0$ 的 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液中毒死蜱降解酶的活性如图 3 所示.图 3 表明 WZ-I 胞内粗酶液降解毒死蜱的最适 pH 为 6.8 ,在 $\text{pH } 6.0\sim 9.0$ 之间都有较高的活性,说明该降解酶对 pH 不敏感,对 pH 耐受力较强.

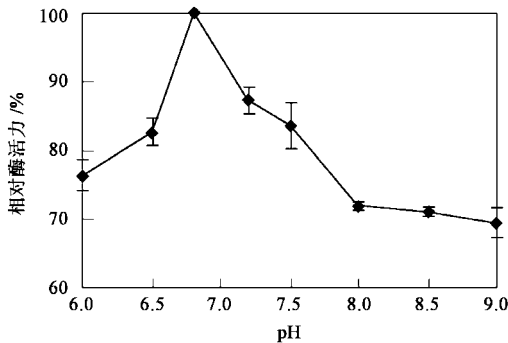


图 3 pH 对毒死蜱酶促降解的影响

Fig.3 Effect of pH on enzymatic degradation of chlorpyrifos

2.7 WZ-I 胞内粗酶液对毒死蜱降解的动力学常数

据毒死蜱浓度和测得的反应速率用双倒数作图法作 Line weaver Burk 图,求得胞内粗酶液对毒死蜱的米氏常数 K_m 和最大反应速率 $v_{\max}$,如图 4.按照 Line weaver Burk 作图法,以毒死蜱为底物,测得毒死蜱降解酶的 K_m 为 $1.049\ 26 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $v_{\max}$ 为 $0.253\ 5 \mu\text{mol} \cdot (\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$.

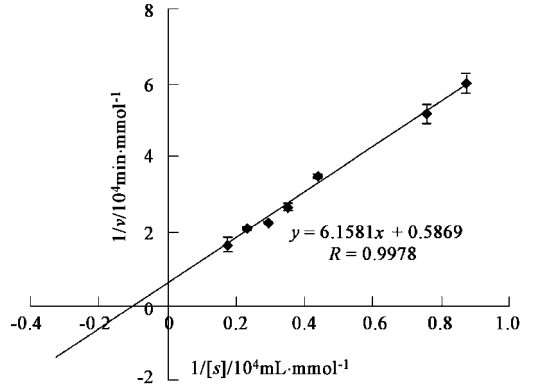


图 4 毒死蜱降解酶的 Line weaver Burk 相关性

Fig.4 Line weaver Burk relation of chlorpyrifos degrading enzyme

2.8 毒死蜱降解酶的 pH 稳定性

酶的 pH 稳定性结果见图 5.图 5 表明在 pH 5.0 的环境中保温 2 h 后,其酶活力损失了近 60% ,而在 pH 8.23 和 9.24 的环境中保温 2 h 后,其酶活力损失分别为 17.7% 和 32.8% ,即在偏酸性的环境中,其酶活力损失更大,略偏碱性的环境对酶活力影响较小.

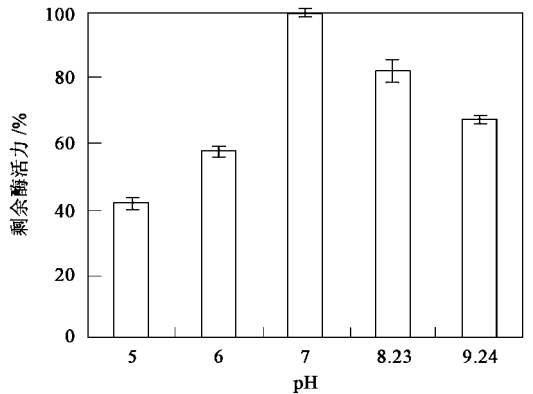


图 5 酶的 pH 稳定性

Fig.5 The pH stability of chlorpyrifos degrading enzyme

2.9 毒死蜱降解酶的热稳定性

酶的热稳定性结果见图 6.图 6 表明该酶有较好的热稳定性,在 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温 2 h ,酶活保存为 80% ,在 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温 2 h ,酶活保存近 60% ,在 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温 2 h ,该降解酶还保持为 50% 的活性,即该酶对热不敏

感,对热具较好的耐受力.

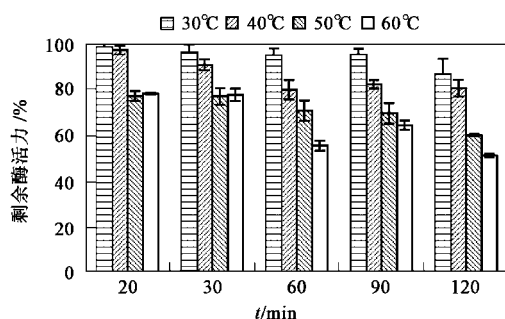


图 6 酶的热稳定性

Fig.6 Heat stability of chlorpyrifos degrading enzyme

3 结论

(1)由高效降解真菌 WZ-I 提取的胞内酶对毒死蜱的降解率为 60.8%,而胞外酶对其降解率仅为 11.3%,判断该真菌降解酶属胞内酶.经连续 8 次在非诱导条件下培养后提取其降解酶并测定其活性,其酶活降低不显著,判定其降解酶为组成酶.

(2)降解酶酶促反应的最适温度为 40℃和最适 pH 6.8,在最适条件下 10 min 内该降解酶对 50 mg·L⁻¹的毒死蜱降解率高达 60.8%.该胞内酶具有较好的热稳定性和 pH 稳定性,在实验温度范围内保温 2h,仍具有较好的酶活力.其蛋白质含量为 3.36 mg·mL⁻¹,并测得其动力学参数 K_m 为 1.049 26 mmol·L⁻¹, v_{max} 为 0.253 5 μmol·(mg·min)⁻¹.

(3)高效降解真菌 WZ-I 所产生的胞内酶蛋白质含量丰富,与底物毒死蜱结合力强,对毒死蜱具有较好的降解效果.

参考文献:

[1] Gruber S J, Munn M D. Organophosphate and carbamate insecticides in agricultural waters and cholinesterase (CHE) inhibition in common Carp (*Cyprians carpio*) [J]. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 1998, **35**:391~396.

[2] Munnecke D M. Enzymatic detoxification of waste organophosphate pesticides [J]. Agric. Food Chem., 1980, **8**:

105~111.

[3] Nannipieri P, Ceccanti B, Conti C. Hydrolase extracted from soil, their properties and activities [J]. Soil. Biol. Biochem., 1982, **14**:275~283.

[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,陈鹤鑫,樊德方,等.一硫代磷酸酯杀虫剂的酶促降解[J].环境科学,1998, **19**(2):58~61.

[6] Arnold L, Aspelin. Pesticide industry sales and usage: 1994 and 1995 Market Estimates[M]. Washington DC:US EPA,1997.19~20.

[7] 石利利,林玉锁,徐亦钢,等.毒死蜱农药环境行为研究[J].土壤与环境,2000, **9**(1):73~74.

[8] Sarah. Beam Pesticides linked with birth weight [J]. Environment, 2004, **46**(5):8.

[9] Racke K D. Environmental fate of chlorpyrifos [J]. Rev. Environ. Contam. Toxicol., 1993, **11**:401~408.

[10] Singh B K, Walker A, Wright D J. Degradation of pesticides in combination and their effect on soil microbial activity [J]. British Crop Protection Council Monograph, 2001, **78**:145~150.

[11] Liu B, McConnell L L, Torents A. Hydrolysis of chlorpyrifos in natural waters of the Chesapeake bay [J]. Chemosphere, 2001, **44**:1315~1323.

[12] Phillips T A, Summerfelt R C, Wu J. Toxicity of chlopyrifos adsorbed on humic colloids to Larval Walleye (*Stizostedion Vitreum*) [J]. Environ. Toxicol., 2003, **45**:258~263.

[13] Kumar Singh B, Walker A, Wright D J. Persistence of chlorpyrifos, fenamiphos, chlorothalorill and pendimethalin in soil and their effects on soil microbial characteristics [J]. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 2002, **69**:181~188.

[14] Lalah J O, Ondieki D, Wandiga S O. Dissipation, distribution, and uptake of ¹⁴C-chlorpyrifos in a model tropical seawater/sediment/fish ecosystem [J]. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 2003, **70**:883~890.

[15] 中国科学院南京土壤研究所微生物室.土壤微生物研究法[M].北京:科学出版社,1985,46~47.

[16] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye biding [J]. Anal. Biochem., 1976, **72**:248~254.

[17] Syed Shahid A, Riaz U H, Mubasshirah K, et al. Use of ultra-violet spectrophotometry for determination of insecticides and aromatic hydrocarbon pollutants [J]. Punjab University Journal of Zoology, 1997, **12**:31~34.