

广谱降解有机磷农药的真菌酶解研究^{*}

刘 阳, 刘玉焕, 李 方, 陈志仕, 廉 婕, 罗维佳, 黄 晓, 钟英长

(中山大学生命科学学院 // 生物防治国家重点实验室, 广东 广州 510275)

摘 要: 从农药污染土壤中分离出一株真菌具有广谱降解有机磷农药的能力。菌体培养物经硫酸铵分级沉淀、Sephadex G-100 凝胶过滤、DEAE Sepharose CL₆B 柱层析纯化广谱有机磷农药水解酶。研究结果表明该酶为胞内酶, 主要定位在细胞膜上。酶的最适反应温度为 45℃, 最适 pH 7.5, 在 50℃ 以下以及在 pH 6~9.5 范围内活性稳定。Hg²⁺、Fe³⁺、对氯高汞苯甲酸、碘乙酸和 N-乙基马来酰亚胺对该酶有强烈的抑制作用, 而 Cu²⁺、巯基乙醇、二硫苏糖醇、二硫赤藓糖醇、谷光甘肽和去污剂对酶有不同程度的激活作用。该酶不仅可以作用于含 P—O 键的有机磷农药; 而且也能水解含 P—S 键的有机磷农药。以甲基对硫磷和内吸磷为底物的 K_m 值分别为 63 $\mu\text{mol/L}$, 256 $\mu\text{mol/L}$; $V_{\max}$ 分别为 306 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$, 189 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$; K_{cat} 分别为 1 102 s⁻¹, 610 s⁻¹。

关键词: 广谱有机磷农药水解酶; 真菌; 降解; 基本性质

中图分类号: Q939.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2004) 02-0076-05

有机磷农药是目前在我国大量生产与使用的高毒农药, 广泛用于农业生产与害虫防治。有机磷农药不仅对人类赖以生存的地表和地下水资源造成污染, 而且导致大量农产品的农药残留超标, 因此迫切需要建立一种有效方法消除或减少这种污染。研究表明使环境中污染物质转化和降解的生物主要是微生物, 目前从受有机磷农药污染的环境中已经分离到数种降解有机磷农药的微生物^[1-8], 但它们主要通过裂解 P—O 键或 P—S 键专一性降解一类有机磷农药, 降解范围具有局限性, 有必要筛选底物作用范围广谱的有机磷农药降解菌。微生物生长速率或生长量低是生物修复化学污染过程中急需解决的问题, 由于真菌的生物量大, 遗传性状稳定, 而且产孢子真菌在自然条件下具有较强的生存能力, 筛选具有广谱降解有机磷农药特性的真菌是处理大面积、低浓度的有机磷农药污染的有效途径。

1 材料和方法

1.1 菌 种

菌株 F1 由中山大学环境微生物学研究室从长期受多种农药污染的环境中筛选所得。

1.2 选择培养基

培养基的组成 (w / %): NaNO₃ 0.2、KCl 0.05、MgSO₄ · 7H₂O 0.05、BaCl₂ 0.02、MnSO₄ 0.01、CaCl₂

0.005, pH 6.8, 121℃ 灭菌 15 min, 需要时加入 w = 2% 的琼脂配成固体培养基, 待培养基冷却后加入所需农药至终质量分数为 0.25%。

1.3 菌体培养、粗酶液的提取和酶活力的测定

1.3.1 菌体培养、粗酶液的提取 在固体培养基斜面于 30℃ 培养 4 d 的新鲜孢子接种到液体培养基中, 30℃ 摇床 200 r/min 培养 5 d, 4 000 r/min 离心 20 min 收集菌丝体, 然后用蒸馏水洗涤 2 次, 菌体用来提取酶, 将收集的菌体进行冷却, 然后加少量的 0.05 mol/L, pH 6.8 磷酸缓冲液, 采用电动匀浆器将菌丝体充分磨碎, 在 0~4℃ 的条件下浸泡 24 h, 12 000 r/min 离心 20 min 得上清液, 即为粗酶液。

1.3.2 酶活力的测定方法 甲基对硫磷、对硫磷和对氧磷的水解作用通过分光光度法在 405 nm 测定对硝基苯酚的含量^[1]; 蝇毒磷的水解作用通过测定荧光产物形成; 内吸磷、亚胺硫磷和马拉硫磷的水解作用通过使用 Ellman 试剂定量巯基化合物的形成^[9]。取 0.1 mL 的 0.05 mol/L 甲基对硫磷溶液、0.8 mL 的 0.05 mol/L (pH 6.8) 磷酸缓冲液和 0.1 mL 粗酶液于比色管中, 25℃ 条件下反应 30 min 后用 0.5 mol/L 三氯醋酸终止反应, 在 405 nm 波长处测定 A_{405} 值的变化, 在上述条件下, 1 个酶活力单位定义为每分钟催化产生 1 μmol 对硝基苯酚所需

^{*} 收稿日期: 2003-04-18

基金项目: 广东省科技计划资助项目 (C32402); 广东省自然科学基金资助项目 (031618); 中山大学生物防治国家重点实验室开放资助项目 (0203)

作者简介: 刘阳 (1975 年生), 女, 博士生; 通讯联系人: 刘玉焕, E-mail: ls112@zsu.edu.cn

要的酶量。

1.4 有机磷农药水解酶的初步纯化

1.4.1 (NH₄)₂SO₄ 沉淀 将上述提取的粗酶液经 50%~90% 的硫酸铵分级沉淀, 20 000 r/min 离心 30 min 得到的沉淀物用尽可能少的 0.05 mol/L (pH 6.8) 磷酸缓冲液溶解, 用 1 000 倍相同缓冲液透析 24 h 后, 经超滤浓缩后进行下一步操作。

1.4.2 Sephadex G 100 柱层析 浓缩液通过上述缓冲液预平衡的 Sephadex G 100 凝胶过滤 (1.8 × 100 cm), 用相同缓冲液洗脱, 流速为 24 mL/h, 每管 5 mL, 收集有活性的部分, 浓缩后供进一步纯化。

1.4.3 DEAE Sephrose CL₆B 柱层析 将上述浓缩的酶液施于经 0.05 mol/L (pH 6.8) 磷酸缓冲液平衡的 DEAE Sephrose CL₆B (30 × 2.5 cm) 离子交换柱层析, 先采用同样的缓冲液洗脱至 A₂₈₀ 值到最低点, 以除去未被吸附的杂蛋白。然后再用相同的缓冲液配制的 0~1 mol/L 氯化钠溶液以流速为 20 mL/h 的速率进行线性梯度洗脱。测定收集管的酶活力和蛋白含量, 合并有活性的部分, 4℃透析除盐后浓缩。

1.5 蛋白质含量的测定

按 Lowry 法定^[10], 以牛血清白蛋白为标准。

1.6 酶的最适反应 pH 及 pH 稳定性

将纯化得到的酶液分别加入到 pH 5.0~11.0 缓冲液中, 按标准方法测定酶活力, 以酶活最高者定为 100%; 将酶液分别用 pH 5.0~11.0 缓冲液稀释, 25℃条件反应 2 h 后, 测定残余酶活力, 以未处理酶液的酶活定为 100%。

1.7 酶的最适反应温度及热稳定性

取 0.1 mL 的 0.05 mol/L 甲基对硫磷溶液、0.8 mL 的 0.05 mol/L (pH 6.8) 磷酸缓冲液于比色管中, 在不同温度下按照标准测定酶活, 以酶活最高者定为 100%; 酶液分别在 20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70℃以下条件保温 2 h 后, 按照标准方法测定残余酶活力, 以未处理的酶液的酶活定为 100%。

1.8 底物专一性测定

取各种不同的 φ=1% 有机磷农药溶液 0.5 mL 于比色管中, 内含 1 mL 0.05 mol/L (pH 6.8) 磷酸缓冲液, 然后加入 0.5 mL 酶溶液, 25℃保温 30 min 后, 测定各自的降解率。

1.9 酶的动力学常数测定

分别采用不同的有机磷农药为底物, 在不同底物浓度的反应体系中, 25℃条件反应 5 min, 测定各底物的水解数量, 计算酶反应的初速度, 作双倒数图求得动力学常数。

1.10 各种不同的化学物质对酶活力的影响

采用 0.05 mol/L (pH 6.8) 磷酸缓冲液配制不同的化学物质溶液, 与一定量的酶液 25℃保温 30 min 后, 按照标准方法测定酶活力, 以不处理的反应液为对照。

2 结 果

2.1 高效广谱降解菌株的分离和筛选

将土样稀释后涂布于内含氯霉素的选择性培养基平板上进行分离, 总共分离出 13 株真菌, 将各菌株分别接种于液体选择性培养基中 30℃培养 120 h 后, 分别测定含 P—O 键的代表性底物甲基对硫磷和含 P—S 键的代表性底物内吸磷的降解率, 结果见表 1, F1、F2、F3 和 F4 菌株对上述两种底物都有不同程度的水解作用, 其中以 F1 对两种底物的降解率最高。另外一些菌株只能对两种底物中的一种有降解作用, 因此, 我们选择 F1 菌株作为进一步研究的对象。

表 1 分离的各菌株对甲基对硫磷和
内吸磷的降解率

Tah 1 Degradation rate of methyl-parathion and
demeton-S by various isolated fungi

菌株	甲基对硫磷 降解率/%	内吸磷 降解率/%	菌株	甲基对硫磷 降解率/%	内吸磷 降解率/%
F1	92	87	F8	65	0
F2	82	83	F9	51	0
F3	71	55	F10	46	0
F4	65	73	F11	0	88
F5	93	0	F12	0	74
F6	82	0	F13	0	62
F7	74	0			

2.2 菌种的鉴定

将菌株 F1 点种于查氏培养基平板上, 在 30℃培养 3~15 d 观察该菌株的生长情况, 菌落质地丝绒状, 中央现絮状, 颜色初为浅黄绿色至黄绿色, 在显微镜下观察, 分生孢子梗生自气生菌丝, 壁粗糙, 顶囊近球形, 产孢结构单层, 分生孢子头球形, 后呈辐射状, 分生孢子球形、壁光滑。根据菌株的培养特征及显微特征, 菌株 F1 初步鉴定为米曲霉 *Aspergillus oryzae*。

2.3 高效广谱水解酶的形成

将菌株 F1 接种液体选择性培养基和查氏培养基中于 30℃培养 120 h, 即在诱导和非诱导条件下生长, 之后离心收集菌体与甲基对硫磷和内吸磷分别反应, 测定不同培养条件下酶对底物的水解作

用, 结果表明: 菌体经诱导和非诱导处理后, 两者的降解效果无明显差异, 说明编码该有机磷农药水解酶的基因是组成型表达的。菌株经丰富培养基连续传代或冻存后再次接种, 其降解效果始终不变, 无需诱导。鉴于组成酶通常被认为是胞内的固有酶类, 其活性形成较少受外界条件影响, 所以, 该水解酶为组成酶。

2.4 高效广谱水解酶的定位

高效广谱水解酶组分的定位是通过完整细胞、培养液的上清液, 菌体碎片、破碎细胞上清液分别与甲基对硫磷溶液反应, 测定 A_{405} 值。结果见表 2, 培养液的上清液无水解酶活性检出, 说明该菌株的水解酶不是胞外酶。将菌丝体用电动搅拌机破碎菌体后静置一段时间, 离心获得菌体碎片和破碎细胞上清液与甲基对硫磷溶液反应, 测定 A_{405} 值, 此时两者都有酶活; 进一步用 Triton X-100 处理破碎菌体, 离心获得菌体碎片和破碎细胞上清液与甲基对硫磷溶液反应, 测定 A_{405} 值, 破碎细胞上清液中酶活明显增加, 菌体碎片的酶活明显减少, 表明经过 Triton X-100 处理, 存在于细胞膜上的酶释放到溶液中, 再次证实该酶为胞内酶。

表 2 有机磷农药水解酶的胞内分布

Tah 2 Distribution of organophosphorus pesticide hydrolase

组分	A_{405}
培养液的上清液	0
破碎细胞上清液	0.38
完整细胞	0.83
Triton X-100 处理破碎菌体	0.13
菌体碎片	0.32
Triton X-100 处理破碎菌体上清液	0.78

2.5 高效广谱水解酶的纯化

菌株 F1 在内含甲基对硫磷的基本培养基中 30℃条件下好氧培养, 在迟对数期检测到酶活性, 培养 5 d 后达到酶活的最高水平。培养的菌丝体经硫酸铵分级沉淀、Sephadex G-100 凝胶过滤、DEAE-Sephose CL6B 获得了具有广谱特性的有机磷农药水解酶。

2.6 酶的最适反应 pH 及 pH 稳定性

结果表明, 该酶的最适反应 pH 为 7.5; 酶在 pH6.0~9.5 范围内, 25℃条件反应 2 h 后, 仍保持酶活力达 80% 以上。

2.7 酶的最适反应温度及热稳定性

酶的最适反应温度为 45℃, 并且在 50℃以下保温 2 h, 维持酶活力达 80%, 在 55℃保温 2 h,

维持酶活力达 42%, 在 70℃时酶活完全丧失。

2.8 动力学常数测定

以甲基对硫磷和内吸磷为底物的 K_m 值分别为 63, 256 $\mu\text{mol/L}$; V_{max} 分别为 306, 189 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$; K_{cat} 分别为 1 102, 610 s^{-1} 。

2.9 各种不同的化学物质对酶活的影响

结果 (表 3) 表明, Cu^{2+} 对酶活有明显激活作用; Hg^{2+} 、 Fe^{3+} 、对氯高汞苯甲 (PCMB)、碘乙酸 (IAA) 和 N-乙基马来酰亚胺 (NEM) 对该酶有强烈的抑制作用; 巯基乙醇、二硫苏糖醇、二硫赤藓糖醇、谷光甘肽和去污剂对酶活有少许促进作用; EDTA、其它金属离子对酶活无影响。E

2.10 底物专一性

实验结果表明该酶不仅可以作用于含 P—O 键的有机磷农药如对硫磷、甲基对硫磷、对氧磷、蝇毒磷; 而且也能水解含 P—S 键的有机磷农药如内吸磷, 亚胺硫磷和马拉硫磷, 表明来源于菌株 F1 的有机磷农药水解酶具有广谱性。

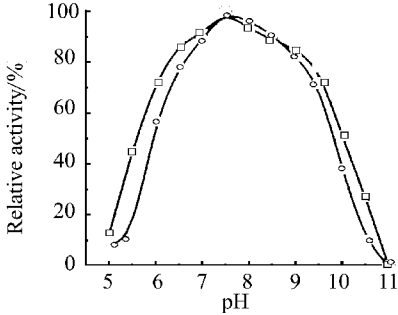


图 2 pH 对有机磷农药水解酶的活性和稳定性的影响

Fig. 2 Effect of pH on activity (○) and stability (□) of organophosphorus pesticide hydrolase

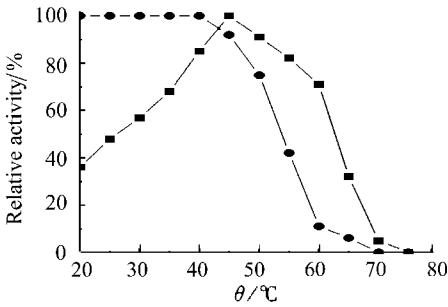


图 3 温度对有机磷农药水解酶的活性和稳定性的影响

Fig. 3 Effect of temperature on activity (■) and stability (●) of organophosphorus pesticide hydrolase

3 讨论

目前有机磷农药微生物降解的报道主要集中在细菌, 真菌方面只有刘玉焕等报道过华丽曲霉和黑

曲霉能产生底物专一性较强的有机磷农药水解酶^[7,8]。为了全面了解微生物在有机磷农药降解过程中所起的作用，有必要进行相关真菌的代谢机理研究。我们从长期受有机磷农药污染的环境中分离到一株高效、广谱降解有机磷农药的真菌菌株 F1，

研究了该菌株水解酶的形成和定位，初步研究了酶的分离纯化条件以及酶促反应的最适条件，该菌株水解酶具有对多种金属离子的抗性以及具有广谱的 pH 和温度作用范围因素，菌株 F1 有希望应用于生物修复大面积、低浓度有机磷农药污染环境。

表 3 各种化学物质对酶活力的影响
Tab 3 Effects of various compounds on organophosphorus hydrolase

化学试剂	c (mmol·L ⁻¹)	相对 活力 /%	化学试剂	c (mmol·L ⁻¹)	相对 活力 /%	化学试剂	c (mmol·L ⁻¹)	相对 活力 /%
None		100	HgCl ₂	1	6	Triton X-100	0.5	113
MgCl ₂	1	91	EDTA	1	95	mercaptoethanol	1	110
CuCl ₂	1	132	PCMB	0.1	0	Dithiothreitol	1	116
ZnCl ₂	1	91	IAA	0.1	8	Dithioerythritol	1	114
MnCl ₂	1	90	2NEM	0.1	0	Phenanthroline	1	93
FeCl ₃	1	10	SDS	0.5	115	Glutathione	1	106

表 4 各种有机磷农药水解的动力学常数
Tab 4 Apparent kinetic constants for hydrolysis of organophosphorus pesticides

有机磷农药	$V_{\max}$ ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$)	相对活力 %	K_m ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	K_{cat} s^{-1}	K_{cat}/K_m ($\mu\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
对氧磷	348	100	41	1281	31.2
甲基对硫磷	306	93	63	1102	17.5
对硫磷	296	91	69	998	14.5
蝇毒磷	249	85	81	859	11
内吸磷	189	73	256	610	2.4
亚胺硫磷	202	81	198	701	3.5
马拉硫磷	41	18	373	146	0.4

参考文献:

[1] DUMAS D P, CALDWELL S R, RAUSHEL F M. Purification and properties of the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*[J] . J Biol Chem, 1989, 33: 19659—19665.

[2] MULBRY W W, KARNS J S, KEARNEY P C, et al. Identification of a plasmid-borne parathion hydrolase gene from *Flavobacterium* sp. By southern hybridization with opd from *Pseudomonas diminuta*[J] . Appl Environ Microbiol, 1986, 51: 926—930.

[3] CHENG T C, HARVEY S P, STROUP A N. Purification and properties of a highly active organophosphorus acid anhydrolase from *Alteromonas undina*[J] . Appl Environ Microbiol, 1993, 59: 3138—3140.

[4] MASAHITO H, HIRANO M, TOKUDA S. Involvement of two plasmids in fenitrothion degradation by *Burkholderia* sp. strain NF100[J] . Appl Environ Microbiol, 2000, 66: 1737—1740.

[5] OHSHIRE K, HOSHINO T, UCHIYAMA T. Characterization of isofenphos hydrolases from *Arthrobacter* sp. strain B5[J] . J Fement Bioeng, 1997, 83: 238—245.

[6] LAURENCE G, DIDIER H, SEBASTIEN K, et al. Reductive cleavage of Demeton S-methyl by *Corynebacterium glutamicum* in cometabolism on more readily metabolizable substrates[J] . Appl Environ Microbiol, 2000, 66: 1202—1204.

[7] 刘玉焕, 钟英长. 华丽曲霉 Z58 有机磷农药水解酶的纯化和性质[J] . 微生物学报, 2000, 40: 430—433.

[8] LIU Y H, CHUNG Y C, XIONG Y. Purification and characterization of a dimethoate-degrading enzyme of *Aspergillus niger* ZHY256 isolated from sewage[J] . Appl Environ Microbiol, 2001, 67: 3746—3749.

[9] LAI K H, STOLOWICH N J, WILD J R. Characterization of P—S bond hydrolysis in organophosphorothioate pesticides by organophosphorus hydrolase[J] . Arch Biochem Biophys, 1995, 318: 59—64.

[10] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR N L, RANDALL R J. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J] . J Biol Chem, 1951, 193: 265—275.

A Broad Spectrum Organophosphorus Hydrolase from Fungus

LIU Yang, LIU Yu huan, LI Fang, CHEN Zhi shi, LIAN Jie,
LUO Wei jia, HUANG Xiao, ZHONG Ying chang

(The State Key Laboratory for Biocontrol //School of Life Sciences, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: A fungus strain F1 isolated from the polluted soil was capable of degrading various organophosphorus pesticides effectively. A broad spectrum organophosphorus hydrolase from mycelia of strain F1 was purified by ammonium sulfate precipitation, Sephadex G-100, DEAE Sepharose CL6B chromatography. The results showed that the optimal temperature and pH of the enzyme activity were 45 °C and pH 7.5 respectively. The enzyme was stable over the range of pH 6.0 ~ 9.5 and below 50 °C. The activities were strongly inhibited by Hg²⁺, Fe³⁺, p-chloromercuribenzoate, iodoacetic acid and N-ethylmaleimide, while Cu²⁺, β-mercaptoethanol, dithiothreitol, dithioerythritol, glutathione and detergents activated the enzyme slightly. The enzyme can not only split organophosphorus pesticides possessing P—O linkage such as methyl parathion, but also operate on organophosphorus pesticide containing P—S bond including demeton S. The K_m, V_{max}, and K_{cat} was 52 μmol/L, 317 μmol ° min⁻¹, 1 152 s⁻¹ when methylparathion was as substrate, and the parameters were 236 μmol/L, 179 μmol ° min⁻¹, 650 s⁻¹ respectively, when demeton S as substrate.

Key words: a broad spectrum organophosphorus hydrolase; fungus; degradation; properties

(上接第 75 页)

Subcellular Distribution and
Chemical Forms of Cu in *Commelina communis*

LIAO Bin, DENG Dong mei, YANG Bing, SHU Wen sheng, LAN Chong yu

(State Key Laboratory for Bio-Control //School of Life Sciences, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The differential centrifugation technique and sequential chemical extraction method were used to study the subcellular distribution and the chemical forms of Cu in the roots, leaves and stems of *Commelina communis*. The results showed that most of Cu was bound to the cell wall of roots under different Cu concentration in solution. For the leaves, however, Cu was mainly distributed in the soluble fraction. In the stems, increasing Cu supply reduced the percentage of Cu in the cell wall fraction, and increased the mount of Cu in the soluble fraction. Little Cu was found in the cell organelle fraction. For the chemical forms, water extractable Cu predominated in roots, whereas ethanol extractable Cu and water extractable Cu were the main forms in leaves and stems. Other forms such as acetic acid HCl and NaCl extractable Cu were low in roots but high in leaves and stems. The subcellular location of Cu and the chemical forms of Cu has tight relationship with resistance and accumulation in plant.

Key words: *Commelina communis*; Cu; subcellular distribution; chemical forms