

# 真菌的有机磷农药降解酶产酶条件和一般性质

刘玉焕 钟英长

(中山大学生命科学学院 广州 510275)

**摘要:** 从受有机磷农药长期污染的土壤中通过富集培养, 分离筛选到一株降解乐果活性较高的曲霉 *Z<sub>ss</sub>* 菌株, 研究了该菌株的最适产酶条件: 培养温度 30℃, 培养起始 pH7.0, 培养时间 96h; 酶反应的最适温度和 pH 分别为 45℃ 和 7.2, 在 40℃ 以下及 6.0~9.0 范围内稳定, 主要作用底物为有机磷农药。

**关键词:** 曲霉, 有机磷农药降解酶, 产酶条件和性质

**中图分类号:** Q93    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0253-2654(2000)03-0162-04

## PRODUCTION AND SOME PROPERTIES OF ORGANOPHOSPHORUS PESTICIDES-DEGRADING ENZYME BY FUNGUS

LIU Yu-Huan    ZHONG Ying-Chang

(School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

**Abstract:** *Aspergillus* sp. *Z<sub>ss</sub>*, which was isolated from samples contaminated by organophosphorus pesticides, produced dimethoate-degrading enzymes. The optimal temperature, initial pH and culture time for enzyme production were 30℃, 7.0 and 96 hours, respectively. The optimal pH and temperature for enzyme activity was 7.2 and 45℃, respectively. The enzymes were stable among the range of pH 6.0~9.0 and below 40℃. It showed strong activity towards organophosphorus pesticides which were tested.

**Key words:** *Aspergillus* sp., Organophosphorus pesticides-degrading enzyme, Enzyme formation and properties

近几十年来,有机磷农药一直作为国内外生产和使用非常广泛的杀虫剂。大量研究表明微生物在土壤和水环境中对农药的降解起到重要作用,现在人们开始注重有机磷农药酶促降解的研究,以期获得净化农药污染的新方法<sup>[1~3]</sup>。有

机磷农药酶促降解首先从荧光假单胞菌为主的混合菌中分离纯化对硫磷降解酶开始。并研究它的降解特性,表明该酶比产生酶的微生物菌体

收稿日期: 1999-02-22, 修回日期: 1999-05-04

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

更能忍受异常环境条件,不但降解效果远胜于微生物本身,且不为农药及农药制剂中的溶剂所抑制<sup>[4-7]</sup>,显示良好的应用前景。但是有关真菌对有机磷农药的酶促降解未见报道<sup>[6]</sup>,本文研究了从被有机磷农药长期污染的土壤中筛选到具有产有机磷农药降解酶的霉菌产酶条件和酶的一般性质。

# 1 材料与方法

## 1.1 菌种

菌株来源于农药长期污染土壤中分离所得。

## 1.2 乐果无机盐培养基

乐果 2.0mL, NaNO<sub>3</sub> 2.0g, KCl 0.5g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5g, MnSO<sub>4</sub> 0.02g, CaCl<sub>2</sub> 0.04g, 蒸馏水 1000mL, pH7.0, 1 × 10<sup>5</sup> Pa 灭菌 15min, 需要时加入 2% 的琼脂配成固体培养基,有机磷农药待灭菌冷却后加入。

## 1.3 乐果降解菌的富集、筛选和纯化

将土壤样品配制成 20% 的悬浮液,然后以 5% 接种量接到乐果无机盐培养基中,以乐果为唯一碳源和磷源,并加适量的玻璃珠适温培养一段时间,待菌长出,取 1mL 菌液于同样培养基中培养,但是乐果的浓度应逐级提高,直到 0.4% 为止,然后采用平板稀释法进行分离纯化,接种斜面编号保存供实验使用。

## 1.4 粗酶液的制备

将培养好的菌体进行离心 (8000r/min) 30min, 去除上清培养基,得菌丝球。将菌体用 20 倍菌体体积的 0.05mol/L pH7.2 Tris-HCl 缓冲液洗涤 3 次,然后再离心 (8000r/min) 30min 收集菌体,把菌体中的水份挤干后放冰箱中冷冻,用微型电动搅拌机破碎菌体后离心 (21000 × g),得上清液,即为粗酶液。

## 1.5 酶活力的测定

取 0.1mL 2% 乐果溶液、0.8mL 0.05mol/L pH7.2 Tris-HCl 缓冲液、0.1mL 酶液, 30℃ 条件下反应 20min 后,用二氯醋酸终止反应,测定底物乐果浓度的减少量。一个酶活单位 (U) 定义为每分钟降解 1μg 乐果所需的酶量。

## 1.6 有机磷农药的测定

见文献 [7]。

## 1.7 菌体的干重

将培养好的菌体用 8000r/min 离心 30min, 所得沉淀物在 105℃ 烘箱里烘干至恒重。

# 2 结果与讨论

## 2.1 菌株的筛选

将采集到的土壤样品通过富集、分离,共筛选到菌株 56 株,通过摇瓶发酵,收集菌体,制备其粗酶液分别测定各菌株的乐果降解酶活,结果表明, Z<sub>58</sub> 号菌株的酶活最高,经初步鉴定该菌株属于曲霉菌属 *Aspergillus* sp. Z<sub>58</sub>, 因此选择曲霉 Z<sub>58</sub> 作为进一步研究真菌产有机磷农药降解酶条件的菌株。

## 2.2 曲霉 Z<sub>58</sub> 产酶条件的研究

2.2.1 不同碳源对生长和产酶的影响: 改变培养基中碳源的种类和浓度,于温度为 30℃ 培养 120h 后分别测定不同条件的菌体生长量和酶活力,然后得出各自的比活力。试验结果见表 1,产酶较适宜的碳源为有机磷农药化合物,其中以 0.2% 甲胺磷最佳,农药浓度太高对菌体生长有明显的抑制作用。菌株 Z<sub>58</sub> 虽然能利用葡萄糖等常规碳源快速生长,但菌体不产降解酶,说明该菌株有机磷农药降解酶为诱导酶。

表1 碳源对曲霉Z<sub>58</sub>生长和酶合成的影响

碳源 种类	浓度/%	生长量 (mg/mL)	酶比活 (U/mg)
葡萄糖	0.2	0.61	0
蔗糖	0.2	0.58	0
果糖	0.2	0.53	0.2
乐果	0.2	0.21	1.76
甲胺磷	0.1	0.15	1.23
甲胺磷	0.2	0.24	1.85
甲胺磷	0.3	0.11	1.16
氧化乐果	0.2	0.18	1.39

2.2.2 不同氮源对菌体生长和产酶的影响: 改变培养基中氮源的种类,分别用牛肉膏、酵母粉、尿素、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 代替 NaNO<sub>3</sub>。结果 (表 2) 表明,无机氮源对菌体的生长和酶活

影响不大;而有机氮源对菌体的生长有明显促进作用,但菌体不产酶活,说明有机氮中存在的易利用碳源抑制了菌体产酶。

表2 氮源对菌株生长和产酶的影响

氮源的种类	生长量 (mg/mL)	酶比活力 (U/mg)
牛肉膏	0.27	0.18
酵母膏	0.30	0.16
尿素	0.2	1.7
硫酸铵	0.205	1.63
氯化铵	0.19	1.66
硝酸铵	0.21	1.67
硝酸钠	0.22	1.78

2.2.3 培养温度对产酶的影响:取活化的菌种接种,分别在 15℃、20℃、25℃、30℃、35℃、40℃、45℃ 培养 120h,测定其酶活。图 1 表明,产酶的最适温度为 30℃。

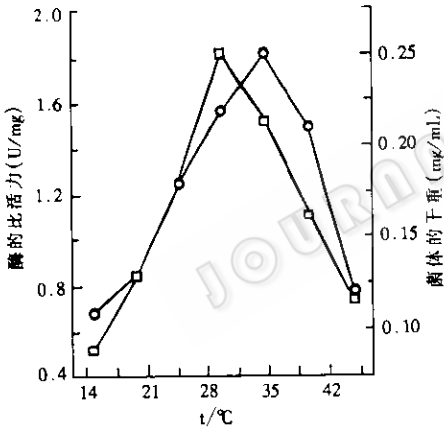


图1 温度对产酶的影响

—○— 菌体的干重, —□— 酶的比活力

2.2.4 培养过程对产酶的影响:取活化的菌株接种于培养基中,30℃ 培养 24h、48h、72h、96h、120h、144h,测定其酶活,实验结果表明(图 2),培养过程对产酶效果有较大的影响,产酶的适宜培养时间为 84~108h,最佳时间为 96h。

2.2.5 培养的起始 pH 值对产酶的影响:用 HCl 和 NaOH 溶液调节培养基的 pH 值,接种于 30℃ 培养 96h。图 3 表明,培养基的起始 pH 值的适宜范围为 6.0~8.0,其中以 pH7.0 的酶活力最大。

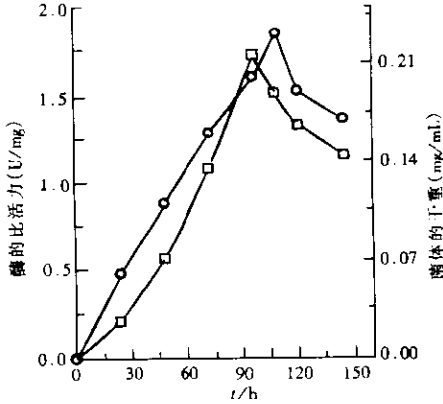


图2 培养时间对产酶的影响

—□— 菌体的干重, —○— 酶的比活力

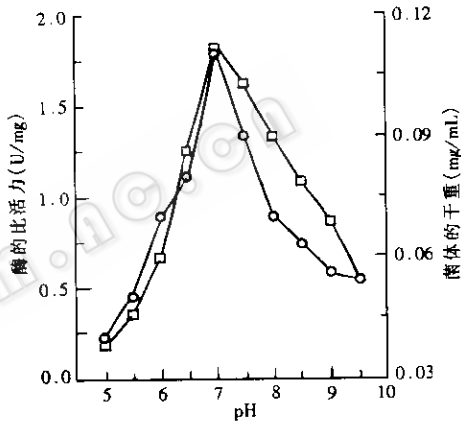


图3 pH对菌体产酶的影响

—○— 菌体的干重, —□— 酶的比活力

2.3 酶的一般性质

2.3.1 pH 对酶活的影响:将酶液与底物乐果在不同 pH 的缓冲液中反应,通过测定不同 pH 条件下的酶活力,获得酶的最适 pH 为 7.2。

2.3.2 温度对酶活的影响:分别在不同温度条件下将酶液与底物乐果进行反应,按上述方法测定酶活力,得表观最适温度为 45℃。

2.3.3 酶的 pH 稳定性:将酶作用于不同 pH 的缓冲液中,40℃ 保温 1h,测定剩余酶活,酶在 pH6.0~9.0 之间稳定,能保持最高酶活的 75% 以上。

2.3.4 酶的热稳定性:将酶于 pH7.2 的缓冲液中,在 30℃、40℃、50℃、60℃、70℃ 保温 1h 后测定剩余酶活,40℃ 以下该酶稳定性良好,60℃ 保温 1h,剩余酶活 46%。

**2.3.5 酶的底物特异性:**取适量的酶液于 pH 7.2、30℃ 的条件下分别作用乐果、甲胺磷、氧化乐果、马拉硫磷有机磷农药,测定各自的降解率,分别为 87%、85%、83%、76%。结果表明该酶对上述有机磷农药都有较好的降解效果,主要原因是有机磷农药都有类似的结构,只是其取代基不同而已。当以乐果为底物时,其米氏常数  $K_m$  为 0.59%。

综上所述,曲霉  $Z_{58}$  的最佳产酶条件为:培养温度 30℃,培养的起始 pH7.0,培养时间为 96h,该菌的有机磷农药降解酶为诱导产生。

## 参 考 文 献

[1] Nannipieri P, Bollag J M. Use of enzyme to detoxify pesticides-contaminated soils and waters J.

Environ. Qual., 1991, 20:510~517.

[2] Nannipieri P, Ceccanti B, Coni C *et al.* Hydrolase extracted from soil, their properties and activities. Soil. Biol. Biochem., 1982, 14:257~263.

[3] Munnecke D M. Enzymatic detoxification of waste organophosphate pesticides. J. Agric. Food Chem., 1980, 28:105~111.

[4] Munnecke D M. Enzymatic hydrolysis of organophosphate pesticides, a possible pesticides disposal method. Appl. Environ. Microbiol., 1976, 32:7~13.

[5] Munnecke D M. Hydrolysis of organophosphate pesticides by an immobilized enzyme system Biotechnol. Bioeng., 1979, 22:2247~2261.

[6] 冯化成译. 土壤细菌和农药分解(农药译丛), 1994, 16(4):47~50.

[7] 杭世平主编. 空气中有害物质的测定方法. 北京:人民卫生出版社, 500~524.