

缺陷假单胞菌 M5R14 粗酶液降解拟除虫菊酯类农药特性初探

廖敏^{1,2}, 马爱丽^{1,2}, 谢晓梅^{3*}

(1. 浙江大学环境与资源学院, 资源科学系, 杭州 310058; 2. 浙江省亚热带土壤与植物营养重点研究实验室, 杭州 310058; 3. 浙江大学环境与资源学院, 生态环境研究中心, 杭州 310058)

摘要:以分离于杭州农药厂污水排放污泥的 1 株可降解多种拟除虫菊酯类农药的菌株——缺陷假单胞菌 M5R14 为对象, 采用直接离心分离提取和超声波破碎提取的方法获得菌株 M5R14 的胞外和胞内粗酶, 初步探讨了该菌株粗酶液降解拟除虫菊酯类农药的特性。研究表明该菌株降解拟除虫菊酯类农药的酶为胞内酶, 粗酶液对联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯 3 种拟除虫菊酯类农药降解的最佳 pH 为 6.5, 最适温度为 35℃, 其米氏常数和最大降解速率依拟除虫菊酯类农药品种而不同, 对 3 种拟除虫菊酯类农药的米氏常数分别为 4 162.73、1 092.57 和 1 171.97 $\mu\text{mol/L}$, 最大反应速率 (以蛋白计) 分别为 0.152、0.038 和 0.043 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ 。降解粗酶对 3 种拟除虫菊酯类农药的降解过程满足一级动力学方程模型, 降解半衰期 ($t_{1/2}$) 分别为 119.51、113.63 和 108.30 min。在 pH 5.0~8.0, 温度为 20~50℃ 条件下, 降解粗酶对所用 3 种拟除虫菊酯类农药都能保持较高的降解活性, 表明降解粗酶具有较宽 pH 适应范围和较好的热稳定性, 在控制拟除虫菊酯类农药残留方面具有较好的应用潜力。

关键词:拟除虫菊酯类农药; 缺陷假单胞菌; 降解粗酶

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2011)06-4793-06

Primary Study on the Characteristics of Crude Pyrethroid Pesticide-Degrading Enzyme Extracted from *Pseudomonas diminuta* Strain M5R14

LIAO Min^{1,2}, MA Ai-li^{1,2}, XIE Xiao-mei³

(1. Department of Resources Science, College of Environmental and Resource Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Subtropic Soil and Plant Nutrition, Hangzhou 310058, China; 3. Research Center for Eco-Environmental Sciences, College of Environmental and Resource Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: One *Pseudomonas diminuta* strain M5R14 was selected as object in the present study, which was isolated from the tame sludge in water course of Pesticide Factory of Hangzhou and could degrade a variety of strains of synthetic pyrethroid insecticides. The inner and extra-cell crude enzyme of *Pseudomonas diminuta* strain M5R14 prepared by ultrasonic break up and centrifugal separation methods, and the characteristics of crude pyrethroid pesticide-degrading enzyme were primary studied. The results showed that pyrethroid pesticides degrading enzyme excreted from the strain of was intracellular enzyme, the best pH for bifenthrin, fenpropathrin and cypermethrin degradation was 6.5, as well as the most appropriate temperature was 35℃. Besides, the Michaelis constant and maximum degradation rate varied due to pyrethroid species. The Michaelis constant to such 3 pyrethroid pesticides were 4 162.73, 1 092.57, 1 171.97 $\mu\text{mol/L}$ respectively, and the maximum degradation rate to such 3 pyrethroid pesticides were 0.152, 0.038, 0.043 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ protein. The degradation process of crude degrading enzymes to such 3 pyrethroid pesticides was fitted for first-order kinetic equation and the half life ($t_{1/2}$) were 119.51, 113.63, 108.30 min, respectively. Crude degrading enzymes for the three pyrethroid insecticides could be maintained high degradation activity when the pH ranging from 5.0 to 8.0, and the temperature was 20℃ to 50℃, indicating the degrading enzymes were with large scope of pH stability and thermal stability. Therefore, there's higher potential in controlling the residuals of synthetic pyrethroid insecticides.

Key words: pyrethroid pesticides; *Pseudomonas diminuta*; crude degrading enzyme

微生物在农药等有机污染物环境污染修复中一直扮演着重要的角色, 是有机污染物污染环境修复的一重要手段^[1], 其降解农药等有机污染物质的实质是由其分泌的降解酶来完成的^[2-4]。这些酶往往比产生这类酶的微生物菌体更能忍受异常环境条件, 并且降解酶的降解效果远胜于微生物本身^[5]。因此, 降解酶作为净化农药污染的有效手段而备受

关注, 具有广阔的前景。探明微生物降解酶对农药的降解特性和酶学特性是开发控制农药残留酶制剂的

收稿日期: 2010-06-09; 修订日期: 2010-07-29

基金项目: 浙江省科技计划项目 (2006C33052); 浙江省新苗人才计划项目 (2008R40G2010088); 浙江省大学生创业孵化项目

作者简介: 廖敏 (1970~), 博士, 副教授, 主要研究方向为土壤环境化学、环境微生物与毒理学, E-mail: liaomin@zju.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: xiexiaomei@zju.edu.cn

基础^[9]。

本实验室在以前的工作中从杭州农药厂污水排放的污泥中分离得到 1 株可同时降解联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯这 3 种拟除虫菊酯类农药的高效菌株——缺陷假单胞菌 M5R14^[9]。而拟除虫菊酯类农药是农用及卫生杀虫剂的主要支柱产品之一^[10]，在家庭卫生和农业生产中的应用已有 50 多年，广泛应用所产生的大量残留积累可妨碍生物生长，并直接或间接地危害着人体和动物的健康^[11-14]，寻找有效消除环境中的拟除虫菊酯类农药残留的方法已成为迫切需要解决的问题。因此本研究依据微生物降解农药的实质是由其分泌的降解酶来完成的，对缺陷假单胞菌菌株 M5R14 分泌的拟除虫菊酯类农药降解酶的特性进行了初步探讨，以期为进一步研制控制拟除虫菊酯类农药残留的酶制剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 缺陷假单胞菌 M5R14 的活化

将缺陷假单胞菌分离株 M5R14 接种到含(蛋白胨 10 g, NH_4NO_3 1.00 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, KH_2PO_4 0.5 g, NaCl 0.5 g, K_2HPO_4 1.5 g, H_2O 1 000 mL, pH 7.0) 普通培养基上,于 30℃、180 r/min 振荡培养 3 d,测定 D 值,定量接种于含已知联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯浓度的富集培养基(NaCl 1.0 g, KH_2PO_4 1.0 g, 水 1 000 mL, 葡萄糖 1.0 g) 上,在 30℃、180 r/min 培养过夜。

农药储备液^[11]:将一定量 95.8% 的联苯菊酯原液溶于丙酮,一定量的 20% 甲氰菊酯乳油原液溶于乙醇以及一定量的 94% 的氯氰菊酯原液并加入 1.5 倍(质量比)的 Tween-80 溶于乙醇,分别获得 50 mL 含 50 g/L 联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的 3 份农药储备液,用于摇瓶实验或制农药平板使用。在 1 000 mL 富集或基础培养基中同时加入一定量的联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯储备液,配成相应的含农药的混合培养基,加入 12~15 g 琼脂得到固体培养基。

农药萃取溶剂:石油醚。

灭菌条件:0.1 MPa, 121℃, 30 min 高压蒸汽湿式灭菌。

1.2 粗酶液的制备及粗酶液中可溶性蛋白质含量的测定

将活化过的缺陷假单胞菌 M5R14 菌株接种富集培养基(加联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯各 100

mg/L), 30℃、180 r/min 振荡培养 3 d 后, 7 500 r/min 离心 10 min, 菌体与上清液分开收集。其中上清液经加硫酸铵沉淀(饱和度为 100%) 后 4℃ 盐析过夜, 10 000 r/min 离心 15 min 收集沉淀, 用 pH 7.0 和 0.02 mol/L 的磷酸盐缓冲液溶解后用同一缓冲液透析(MWCO = 5 000) 至无 SO_4^{2-} , 得细胞外粗酶液。收集的菌体则用 pH 7.0 的磷酸缓冲液洗涤 3 次后, 按 3 mL 缓冲液 + 1 g 菌体的比例配成菌悬液, 用 JY92-II 型超声波细胞粉碎机(400 W) 超声波破碎处理 99 次, 每次 5 s, 间隔 5 s, 4℃ 下 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 得无细胞胞内粗酶液。粗酶液中降解酶的浓度采用 Bradford 检测法^[17], 即以牛血清蛋白 BSA(sigma) 作为标准蛋白表示。

1.3 酶活力测定

反应体系统一为: 预热的一定 pH 的含 3 种拟除虫菊酯(联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯) 农药各 100 mg/L 的磷酸盐缓冲液(0.02 mol/L) 18 mL 中, 加预热过的缺陷假单胞菌 M5R14 菌株降解酶的粗酶液 2 mL, 其总体积为 20 mL, 一定温度下于 DKB600B 型电热恒温水槽水浴中反应 2 h, 加 0.5 mL 1.0 mol/L HCl 溶液终止酶反应。每一处理重复 3 次, 以不加酶液的 3 种拟除虫菊酯农药的缓冲液为对照。反应结束后, 吸取 2 mL 反应液, 加入 4、4、2 mL 的石油醚萃取 3 次, 加入无水硫酸钠除水, 并定容至 10 mL, 用气相色谱检测残留农药并计算农药的降解率。

1.4 粗提酶的米氏常数 K_m 和最大反应速率测定及 3 种菊酯农药的降解动力学分析

将含 3 种拟除虫菊酯农药一定浓度(50、75、100、125、150、175、200 mg/L) 的 pH 7.0, 18 mL 磷酸缓冲液和缺陷假单胞菌 M5R14 菌株降解酶的粗酶液分别在 35℃ 的水浴中预热 5 min 后, 将 2 mL 酶液加入对应缓冲液中(总体积 20 mL) 同一水浴中反应 2 h, 测定 3 种拟除虫菊酯农药浓度对反应速率的影响。将拟除虫菊酯农药初始浓度倒数和测得的反应速率倒数作 Lineweaver-Burk 图, 求得缺陷假单胞菌 M5R14 菌株降解酶的粗提酶降解农药的米氏常数 K_m 及最大反应速率 $V_{\max}$ ^[18,19]。

此外在含联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯各 100 mg/L 的缓冲液 18 mL 中, 加预热缺陷假单胞菌降解酶的粗酶液 2 mL, 其总体积为 20 mL, 一定温度下于 DKB600B 型电热恒温水槽水浴中反应 2 h 后, 加 0.5 mL、1.0 mol/L HCl 溶液终止酶反应。每一处理重复 3 次, 以不加酶液的 3 种拟除虫菊酯农药的缓

冲液为对照. 培养结束后, 吸取 2 mL 培养液, 加入 4、4、2 mL 的石油醚萃取 3 次, 加入无水硫酸钠吸水, 并定容至 10 mL, 用气相色谱检测, 采用一级动力学模型对 20、40、60、80、100、120、150 min 农药残留量(c_t) 和时间(t) 进行拟合, 降解动力学方程为 $c_t = c_0 \times e^{-kt}$ (式中, c 为 t 时间农药残留量, c_0 为样品的初始浓度, k 为降解速率常数), 半衰期 $t_{1/2} = \ln 2 / k$, 分析缺陷假单胞菌降解粗酶对联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯降解动力学过程.

1.5 拟除虫菊酯类农药残留量的测定

石油醚萃取的联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯, 经无水硫酸钠除水后定容至 10 mL, 用 Agilent 6890GC (G1530N/G3172A) 气相色谱仪检测 3 种拟除虫菊酯农药残留量. 具体操作方法参考文献 [6].

降解率 (%) = (对照样品残留量 - 粗酶处理样品残留量) / 对照样品残留量 $\times 100\%$ [24].

2 结果与分析

2.1 拟除虫菊酯类农药降解粗酶的定位

表 1 是缺陷假单胞菌 M5R14 菌株的胞内和胞外粗酶液对拟除虫菊酯类农药的降解效果, 由表 1 可知, 与对照 (未加酶) 相比, 胞外粗酶液对联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯的降解率和比活力较小, 几乎没有降解活性; 而胞内粗酶液与对照相比对 3 种拟除虫菊酯农药的降解率和比活力较高. 在本实验条件下, 3 种拟除虫菊酯农药的浓度分别为 100 mg/L 时, 反应时间为 2 h, 胞内粗酶液对 3 种拟除虫菊酯的降解率就分别达到 44.56%、45.45% 和 45.56%; 比活力 (以酶计, 下同) 分别为 533.30、543.95 和 546.4 $\mu\text{g} / (\text{mg} \cdot \text{h})$. 由此可见, 缺陷假单胞菌 M5R14 菌株产生的降解酶属于胞内酶.

表 1 缺陷假单胞菌 M5R14 的胞外和胞内降解粗酶对联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯降解的活性¹⁾

Table 1 Determination of the degradative inner and extra-cell crude enzyme of *Pseudomonas diminuta* strain M5R14 to bifenthrin, fenpropathrin and cypermethrin

项目	联苯菊酯		甲氰菊酯		氯氰菊酯	
	降解率 /%	比活力 / $\mu\text{g} \cdot (\text{mg} \cdot \text{h})^{-1}$	降解率 /%	比活力 / $\mu\text{g} \cdot (\text{mg} \cdot \text{h})^{-1}$	降解率 /%	比活力 / $\mu\text{g} \cdot (\text{mg} \cdot \text{h})^{-1}$
胞内粗酶液	44.56 $\pm$ 1.29	533.30 $\pm$ 15.44	45.45 $\pm$ 3.69	543.95 $\pm$ 44.16	45.66 $\pm$ 2.18	546.46 $\pm$ 26.09
胞外粗酶液	6.54 $\pm$ 1.65	70.75 $\pm$ 17.85	7.13 $\pm$ 1.28	77.13 $\pm$ 13.85	7.24 $\pm$ 2.45	78.32 $\pm$ 26.20
CK (无酶液)	2.28 $\pm$ 1.02	—	1.45 $\pm$ 0.84	—	1.39 $\pm$ 0.59	—

1) —表示未添加酶不存在比活力

2.2 pH 值对降解粗酶活性的影响

在 pH 为 4.0、5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、9.0、10.0 的磷酸盐的缓冲液中, 35℃ 下, 缺陷假单胞菌 M5R14 菌株的降解粗酶与联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯 3 种农药反应 2 h, 对 3 种拟除虫菊酯农药的降解率见图 1, 从中可知, 缺陷假单胞菌 M5R14 菌株的降解粗酶在 pH 4.0 ~ 10.0 之间对农药都有不同程度的降解, 适宜 pH 范围在 6.0 ~ 7.5 之间, 其对 3 种拟除虫菊酯农药的降解效率范围为 34.5% ~ 45.6%. 从图 1 同时可知, 降解粗酶降解活性的最适 pH 是 6.5, 对联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的降解率分别为 44.6%、45.4% 和 45.6%.

2.3 温度对降解粗酶活性的影响

pH 7.0 的磷酸盐缓冲液中, 缺陷假单胞菌 M5R14 菌株的降解粗酶液与联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯 3 种农药分别在 20、25、30、35、40、45、50℃ 下反应 2 h, 对 3 种拟除虫菊酯农药的降解率见图 2, 从中可以看出, 缺陷假单胞菌 M5R14 菌株产

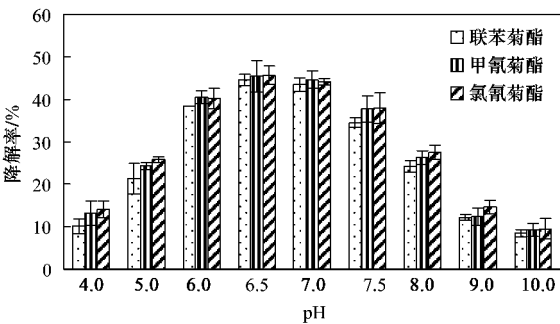


图 1 pH 值对缺陷假单胞菌 M5R14 菌株粗酶降解联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的影响

Fig.1 Effect of pH on degradation rate of bifenthrin, fenpropathrin and cypermethrin by crude enzyme of *Pseudomonas diminuta* strain M5R14

生的降解粗酶在温度 20 ~ 45℃ 范围内都能保持较好的降解活性, 最适温度为 35℃. 对联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的降解率分别为 44.6%、45.4% 和 45.6%.

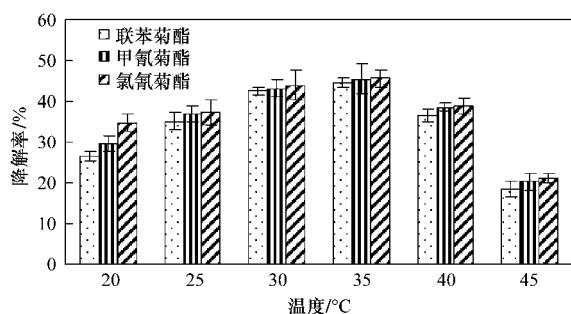


图2 温度对缺陷假单胞菌 M5R14 菌株粗酶降解联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的影响

Fig. 2 Effect of temperature on degradation rate of bifenthrin, fenpropathrin and cypermethrin by crude enzyme of *Pseudomonas diminuta* strain M5R14

2.4 降解粗酶的 pH 稳定性

缺陷假单胞菌 M5R14 菌株的降解粗酶于 pH 4.0、5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、9.0、10.0 的磷酸盐缓冲液中 35℃ 保温 30 min 处理后,再与联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯 3 种农药底物 35℃ 下反应 2 h,对 3 种农药的降解效果见图 3,从中可以看出,降解粗酶经 pH 5.0~8.0 处理后表现较稳定,对联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯降解率分别从 29.47%、31.68%、32.11% 到最高时的 44.56%、45.44%、45.66%。低于 pH 5.0 或高于 pH 8.0 处理后,降解粗酶对 3 种农药的降解率较低,如 pH 4.0 处理后,降解粗酶对联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯降解率只有 12.19%、14.47%、15.01%。

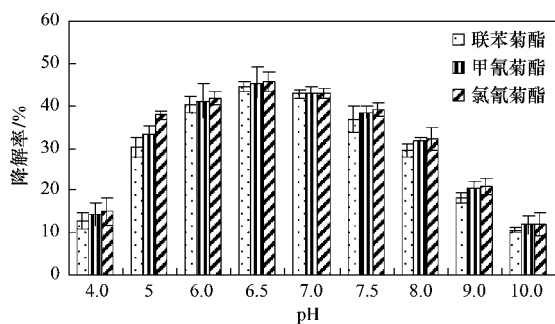


图3 缺陷假单胞菌 M5R14 菌株粗酶降解联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的 pH 稳定性

Fig. 3 Degradation stability to bifenthrin, fenpropathrin and cypermethrin under different pH by crude enzyme of *Pseudomonas diminuta* strain M5R14

2.5 降解粗酶的热稳定性

将缺陷假单胞菌 M5R14 菌株的降解粗酶于 pH 7.0 的缓冲液中,在 20、30、40、50、60、70℃ 下保温 30 min 处理后,再和含联苯菊酯、甲氰菊酯和氯

氰菊酯 3 种拟除虫菊酯农药的底物 35℃ 下反应 2 h,对 3 种农药的降解结果如图 4,从中可看出,在 20~50℃ 之间热处理后的粗酶液对 3 种拟除虫菊酯都能表现较高的降解率。但是热处理温度一旦超过 60℃ 降解粗酶对联苯菊酯,甲氰菊酯,氯氰菊酯的降解率迅速由 34.56%、45.44%、45.66% 降到 9.42%、10.46%、11.29%,下降幅度较大。由此可见热处理温度 60℃ 是该酶酶促反应的临界温度。

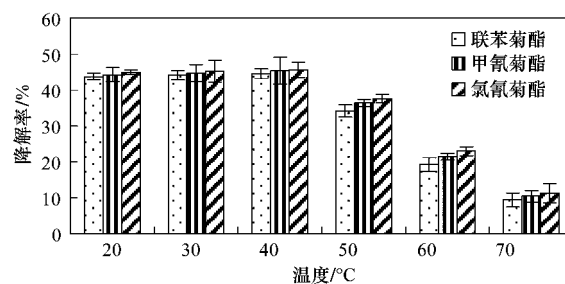


图4 缺陷假单胞菌 M5R14 菌株粗酶降解联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的热稳定性

Fig. 4 Degradation stability to bifenthrin, fenpropathrin and cypermethrin under different temperature by crude enzyme of *Pseudomonas diminuta* strain M5R14

2.6 降解粗酶的米氏常数 K_m 和最大反应速率

为了了解降解粗酶对 3 种拟除虫菊酯农药的最大反应速率等情况,采用 Lineweaver-Burk 作图法,求得降解粗酶对联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的米氏常数 K_m 、最大反应速率 V_{max} 和相关系数,结果见表 2。从表 2 中可以看出降解粗酶对于联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯这 3 种拟除虫菊酯类农药有不同的米氏常数和最大反应速率,反应速率倒数与农药浓度倒数呈线性关系。对联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯的反应速率倒数与底物浓度倒数线性拟合相关系数分别为 0.995、0.993、0.996;米氏常数分别为 4162.73、1092.57、1171.97 $\mu\text{mol/L}$;最大反应速率(以蛋白计,下同)分别为 0.152、0.038、0.043 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ 。从米氏常数和最大反应速率可以看出降解粗酶对联苯菊酯具有较好的亲和力,反应比较快。

2.7 降解粗酶对 3 种拟除虫菊酯农药的降解动力学分析

为了解缺陷假单胞菌 M5R14 菌株降解粗酶对 3 种拟除虫菊酯农药的同时降解行为,研究中采用一级动力学模型,对 20、40、60、80、100、120、150 min 的农药残留浓度 (c) 和时间 (t) 进行拟合,降解动力学方程为 $c_t = c_0 \times e^{-kt}$ (式中, c_t 为 t 时间农药的

表 2 缺陷假单胞菌 M5R14 菌株粗酶对联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯降解的 Lineweaver-Burk 拟合参数

Table 2 Corelation parameters Lineweaver-Burk of degradation to bifenthrin, fenpropathrin and cypermethrin by crude enzyme of *Pseudomonas diminuta* strain M5R14

农药名称	Lineweaver-Burk 拟合方程	米氏常数 K_m / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	最大反应速率 $V_{\max}$ / $\mu\text{mol}\cdot(\text{min}\cdot\text{mg})^{-1}$	相关系数
联苯菊酯	$y = 27.474x + 0.0066$	4 162.73	0.152	0.995
甲氰菊酯	$y = 23.925x + 0.0265$	1 092.57	0.038	0.993
氯氰菊酯	$y = 29.053x + 0.0233$	1 171.97	0.043	0.996

残留浓度, c_0 为样品的初始浓度, k 为降解速率常数), 半衰期 $t_{1/2} = \ln 2/k$, 拟合结果见表 3。从表 3 可知, 粗酶液对联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的同时降解符合一级动力学方程, 相关系数 (R^2) 分别为 0.997 1、0.980 6 和 0.978 8。通过计算得出粗酶液对联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯同时降解的动力学速率常数 (k) 分别为 0.005 8、0.006 1 和 0.009 7 $\text{mg}/(\text{L}\cdot\text{min})$, 半衰期 ($t_{1/2}$) 分别为 119.51、113.63 和 108.30 min。

表 3 缺陷假单胞菌 M5R14 菌株粗酶液对联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯降解的动力学参数

Table 3 Degradation kinetic parameters of crude enzyme of *Pseudomonas diminuta* strain M5R14 to bifenthrin, fenpropathrin and cypermethrin

农药名称	动力学方程	降解速率常数 (k)	相关系数 (R^2)	半衰期 /min
联苯菊酯	$y = 9.0888e^{-0.0058x}$	0.005 8	0.997 1	119.508 1
甲氰菊酯	$y = 9.3828e^{-0.0061x}$	0.006 1	0.980 6	113.630 7
氯氰菊酯	$y = 9.3071e^{-0.0064x}$	0.006 4	0.978 8	108.304 2

3 讨论

作为目前最有发展前途的杀虫剂, 拟除虫菊酯尚未找到新型的替代化合物, 在未来十几年内仍将广泛使用^[21]。采用微生物农药降解酶解决农药残留污染问题是当前环境科学研究的热点。由于农药的微生物降解实质上就是酶促降解, 而且酶可以在常温、常压等温和的反应条件下高效催化, 一些难以进行的化学反应在酶的催化作用下也能顺利完成。因此从微生物中提取降解酶, 将其应用于控制农药残留污具有广阔的前景。

本研究所用的缺陷假单胞菌对联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯都有很好的降解效果, 菌株能将这几种农药作为很好的氮源和碳源加以利用^[9]。研究发现, 缺陷假单胞菌 M5R14 菌株降解拟除虫菊酯类农药的酶位于其胞内, 这一特性与洪源范等^[22]的研究发现相似, 他们在研究甲氰菊酯降解菌 JQL4 特性时也发现其降解酶也位于降解菌 JQL4 胞内, 同时

相似结果在其他研究中也得到验证^[23,24]。本研究中, 缺陷假单胞菌 M5R14 菌株降解粗酶在 pH 4.0 ~ 10.0 之间对 3 种拟除虫菊酯类农药具有一定的降解作用, 但在 pH 5.0 ~ 8.0 降解稳定, 表明具有较广的 pH 适应性, 相似的结果在研究其他降解酶特性中都得到支持^[25,26]。同时发现在 20 ~ 50℃ 之间降解粗酶对 3 种拟除虫菊酯都能表现较高的降解率, 表明其具有较广的温度适应性, 同样这一特征在其他降解酶特性研究中也得到发现^[27]。上述结果都说明本研究中分离所得缺陷假单胞菌 M5R14 菌株降解粗酶具有较好的外界环境适应性。此外研究发现, 降解粗酶对联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯这 3 种拟除虫菊酯类农药的降解满足一级动力学方程, 降解半衰期分别只有 119.51、113.63 和 108.30 min, 与缺陷假单胞菌 M5R14 菌株对 3 种拟除虫菊酯类农药的降解半衰期 97.6、106.6 和 101.9 h 相比^[9], 大大缩短, 表明其降解效率远远高于母体。同时米氏常数和最大反应速率也反映了降解粗酶对 3 种拟除虫菊酯类农药具有较高的降解效率, 其作用差异可能和其与不同结构的拟除虫菊酯类农药的亲合力不一致有关^[28]。总的来看缺陷假单胞菌 M5R14 菌株降解粗酶对 3 种拟除虫菊酯类农药具有较高的降解效率和较广的环境适应性, 具有一定的开发应用前景。

4 结论

(1) 缺陷假单胞菌 M5R14 菌株分泌的降解粗酶位于胞内, 降解粗酶对 3 种菊酯农药降解的最适 pH 为 6.5, 最适温度为 35℃, 同时缺陷假单胞菌在 pH 5.0 ~ 8.0 和温度 20 ~ 50℃ 之间, 对联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯 3 种菊酯降解性能具有一定的稳定性。

(2) 降解粗酶对联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的降解过程满足一级动力学方程模型, 降解半衰期 ($t_{1/2}$) 分别为 119.51、113.63 和 108.30 min; 对这 3 种菊酯的米氏常数 K_m 分别为 4 162.73、1 092.57、1 171.97 $\mu\text{mol}/\text{L}$; 最大反应速率 $V_{\max}$ 分别为 0.152、0.038、0.043 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ 。

参考文献:

- [1] Fuentes M S, Benimeli C S, Cuozzo S A, *et al.* Isolation of pesticide-degrading actinomycetes from a contaminated site: Bacterial growth, removal and dechlorination of organochlorine pesticides [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2010, **64**(6):434-441.
- [2] 郑善良, 胡宝龙. 微生物学基础 [M]. 北京: 化学工业出版社, 1992.
- [3] Takayama K, Suye S, Kuroda K, *et al.* Surface display of organophosphorus hydrolase on *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Biotechnology Progress, 2006, **22**(4):939-943.
- [4] Bird S B, Sutherland T D, Gresham C, *et al.* OpdA, a bacterial hydrolase, prevents lethality in rats after poisoning with highly toxic organophosphorus pesticides [J]. Toxicology, 2008, **247**(2-3):88-92.
- [5] 贾玉红, 曲媛媛, 周集体, 等. 菲降解菌的特性及其降解酶纯化研究 [J]. 环境科学与技术, 2009, **35**(5):21-25.
- [6] 王彬彬, 熊丽, 郑永良, 等. 甲基对硫磷高效降解菌的分离鉴定及降解酶基因的克隆表达 [J]. 环境科学学报, 2008, **28**(10):1969-1975.
- [7] Maloney S E, Maule A, Smith A R. Purification and preliminary characterization of permethrinase from a pyrethroid transforming strain of *Bacillus cereus* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, **59**(7):2007-2013.
- [8] 郭杰炎, 蔡武城. 微生物酶 [M]. 北京: 科学技术出版社, 1986.
- [9] 廖敏, 张海军, 谢晓梅. 降解拟除虫菊酯类农药的缺陷假单胞菌的分离、鉴定及降解特性研究 [J]. 环境科学学报, 2009, **29**(7):1388-1394.
- [10] 胡志强, 许良忠, 任雪景, 等. 拟除虫菊酯类杀虫剂的研究进展 [J]. 青岛化工学院学报, 2002, **23**(1):48-51.
- [11] 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 [J]. 环境科学进展, 1996, **4**(3):28-34.
- [12] Al-Makkawy H K, Magdy D M. Persistence and accumulation of some organic insecticides in Nile water and fish [J]. Resources Conservation and Recycling, 1999, **27**(1-2):105-115.
- [13] Kolaczinski J H, Curtis C F. Chronic illness as a result of low-level exposure to synthetic pyrethroid insecticides: a review of the debate [J]. Food and Chemical Toxicology, 2004, **42**(5):697-706.
- [14] Nina G, Friedhelm D. Influence of pyrethroids and piperonyl butoxide on the Ca^{2+} -ATPase activity of rat brain synaptosomes and leukocyte membrane [J]. International Immunopharmacology, 2005, **5**(2):263-270.
- [15] 薛南冬, 王洪波, 徐晓白. 水环境中农药类内分泌干扰物的研究进展 [J]. 科学通报, 2005, **50**(22):2441-2449.
- [16] Anders C, Valery E F. Consequences of a short pulse of pesticide exposure for survival and reproduction of *Gammarus pulex* [J]. Aquatic Toxicology, 2004, **67**(3):287-299.
- [17] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dyebinding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, **72**(1-2):248-254.
- [18] Dixon M, Webb E C. Enzymes [M]. (3rd ed). London: Longmen Group Ltd., 1979. 61-63.
- [19] 俞建瑛. 生物化学实验技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002. 275.
- [20] 方玲. 降解有机氯农药的微生物菌株分离筛选及应用效果 [J]. 应用生态学报, 2000, **11**(2):249-252.
- [21] 王卓娅, 刘玉焕, 李荷. 克雷伯氏菌 ZD112 氯氟菊酯降解酶基因的克隆与生物信息学分析 [J]. 广东药学院学报, 2008, **24**(3):227-281.
- [22] 洪源范, 洪青, 武俊, 等. 甲氧菊酯降解菌 JQL4-5 的分离鉴定及降解特性研究 [J]. 环境科学, 2006, **27**(10):2100-2104.
- [23] 张承东, 张爱茜, 韩朔暎, 等. 含硫芳香族化合物降解酶的定域及胞内产物的鉴定 [J]. 环境科学, 2000, **21**(4):90-93.
- [24] 兰亚红, 谢明, 陈福良, 等. 施氏假单胞菌 JHY01 菌株毒死蜱降解酶的定位及其提取条件的优化 [J]. 中国生物防治, 2008, **24**(4):349-353.
- [25] 虞云龙, 陈鹤鑫, 樊德方, 等. *Alcaligenes* sp. YF11 菌对杀灭菊酯的降解机理 [J]. 环境污染与防治, 1998, **20**(6):5-7.
- [26] 洪永聪, 辛伟, 崔德杰, 等. 蜡状芽孢杆菌菌株 TR2 的氯氟菊酯降解酶特性 [J]. 青岛农业大学学报(自然科学版), 2007, **24**(3):185-188.
- [27] Liang W Q, Wang Z Y, Li H, *et al.* Purification and characterization of a novel pyrethroid hydrolase from *Aspergillus niger* ZD11 [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, **53**(19):7415-7420.
- [28] Liu T, Sun C, Ta N, *et al.* Effect of copper on degradation of pesticides cypermethrin and cyhalothrin [J]. Journal of Environmental Sciences, 2007, **19**(7):1235-1238.