

有机磷农药在水生态系中生物 净化机理研究

4. *Pseudomonas* sp. CTP-01 的对 硫磷水解酶诱导合成性质

谭渝云 张甬元 孙美娟 张进军

(中国科学院水生生物研究所)

提 要

Pseudomonas sp. CTP-01 的对硫磷水解酶具有底物诱导合成性质。停滞生长期的细胞接触底物半小时即产生相应酶的合成,而指数生长期的细胞接触底物48小时后才发生酶的合成。甲基对硫磷及对硝基酚也具有诱导作用,可见合成对硫磷水解酶的诱导特异基团可能与对硝基酚及其苯环上的取代基有密切关系。

生物与环境的统一,是环境科学中为人们所关心的研究课题之一。当外界环境发生变化时,一部分不能适应环境变化的生物被淘汰了;另一部分则不断改变自己的内部条件适应变化了的环境。与此同时,生物又反作用于环境。生物的这种适应能力可分为二种类型:一类是通过自然突变形形成新的突变种;另一类更为普遍,是通过形成诱导酶使之适应新的环境,这种能力称为生理适应或酶适应。

随着工业的发展,大量新的人工合成有机物质如杀虫剂、除草剂进入环境。与此同时,生物对这些物质表现出适应能力。长期使用一种杀虫剂,昆虫体内所产生的抗药性,在许多情况下就是因为生物体内酶系统产生了适应。另外,在土壤或水环境中,由于细菌的酶适应而导致这些农药降解或进一步被利用作为自身的营养物质,这就是常见的生物净化现象的本质。因此,探讨农药对细菌酶的诱导合成能力是阐明生物净化机理和更好地控制和利用生物净化能力的不可缺少的基础研究课题之一。

Wallnöfer^[5] 等对降解苯胺类除草剂的酰胺酶特别是对酶的诱导合成性质进行了详细研究。Stevens^[4] 等报道了藻脲酸钠可以诱导产生藻脲酶。

我们在氧化塘净化有机磷农药机理的研究中分离出一种极毛杆菌 *Pseudomonas* sp., 代号 CTP-01 对硫磷高效分解菌,并从菌体中制备出具有高活力的无细胞酶制剂^[1]。本文仅对对硫磷水解酶为底物的诱导合成性质进行某些探讨,进一步阐明酶的合成与环境

的关系,为水生生态系中生物净化能力的产生提供生物化学依据。

材 料 和 方 法

菌种培养 将鸭儿湖氧化塘中分离出的 CTP-01, 保存在含对硫磷、葡萄糖和牛肉膏的琼脂培养基上。扩大培养时将菌种接入经高压灭菌体积为 200 毫升的锥形瓶的培养基中, 30℃ 恒温培养 3 天。培养基的组成为每升 Burk 无机培养基加 0.25% 牛肉膏和 1.25% 葡萄糖。

诱导试验方法 锥形瓶中培养 3 天的菌体, 经离心收集, 并用新鲜 Burk 无机培养基洗一次, 再次离心除去剩余的有机培养基, 剩下的菌体用于各组试验。

证明酶的诱导合成性质、蛋白抑制剂的作用以及不同化学物质与诱导酶形成的关系等试验, 在 500 毫升锥形瓶中进行。将收集的菌体接种在各种不同处理的瓶中, 培养至有底物的试验瓶中对硫磷完全被分解, 对硝基酚黄色褪尽时收集菌体, 测定对硫磷水解酶的活力。

对硫磷水解酶的形成与时间的关系和不同生长期细胞对诱导响应时间的影响等试验, 是在 2000 毫升的培养缸中进行的。菌体按上述处理收集后, 接种入含 12.5 毫克/升对硫磷的 Burk 无机培养基中, 在 30℃、pH 7.2 条件下搅拌、通气培养, 根据细菌分解对硫磷的情况, 随时补加对硫磷, 并用浓度为 14% 的 NaOH 溶液控制 pH 在 7.2 左右。定时取样测定细菌细胞的密度、整细胞活力和无细胞酶制剂活力。酶的提取和分析仍用常规方法^[1]。

整细胞活力的测定 在细菌的细胞破碎前, 在分光光度计波长 500 nm 处测定细菌悬液的光密度, 并取出一定量按测酶活力的方法测定整细胞分解对硫磷的速率, 以每单位 OD₅₀₀ 每分钟分解对硫磷的毫微克分子数表示整细胞活力。

细菌生长用分光光度计波长 500nm 处测定细胞悬液的光密度来表示。

对硫磷、甲基对硫磷分别为武汉葛店化工厂和沙市农药厂取得的原油。对硝基酚、氯胺苯醇和其他有机磷农药为市售, 二乙基硫代磷酸的钾盐为实验室制备提纯。

结 果 与 讨 论

1. 对硫磷水解酶的底物诱导合成性质 CTP-01 具有高效分解对硫磷的能力, 制备的无细胞酶制剂, 对硫磷水解酶活力最高达到 10⁴ 毫微克分子/毫克蛋白/分钟。用含葡萄糖和蛋白胨作碳源的培养基而不接触对硫磷培养的细菌制备成无细胞酶制剂, 生长旺盛的细胞不能检测出对硫磷水解酶活力, 停滞生长期的细胞酶活力极低, 仅为对硫磷作唯一碳源的培养物所显示出酶活力的 1/61 (表 1)。

表 1 的结果说明了对硫磷水解酶在细菌细胞内大量合成, 必须要有相应的底物存在, 如果不接触底物, 而仅供给有机碳源, 在细菌体内合成相应酶的水平是极低的。

2. 用蛋白质合成抑制剂证明酶的诱导合成性质 氯胺苯醇是一种熟知的细胞内蛋白质合成抑制剂, 用对硫磷作唯一碳源培养细菌, 并加入不同浓度的氯胺苯醇, 观察细菌

体内对硫磷水解酶合成的情况, 结果见表 2。

表 1 对硫磷对 CTP-01 对硫磷水解酶的底物诱导作用

培养时间(天)	培 养 基 成 份	酶 比 活 (毫微克分子/毫克蛋白/分钟)
7	Burk 培养基含 300 ppm 对硫磷	727.5
7	Burk 培养基加葡萄糖牛肉膏	12.86
3	同 上	0

表 2 氯胺苯醇对细菌诱导酶形成的抑制作用

对硫磷 (毫克/升)	氯胺苯醇 (毫克/升)	酶 比 活 (毫微克分子/毫克蛋白/分钟)	抑制百分率(%)
300	0	200	0
300	20	9.3	95
300	40	5.6	97
300	60	0	100

从表 2 的结果可看出, 在没有抑制剂的处理中, 酶的形成是十分明显的, 氯胺苯醇 20 毫克/升可以抑制酶合成的 95%, 当浓度增加到 60 毫克/升时完全阻碍了酶的合成。氯胺苯醇对已合成的酶催化对硫磷水解反应没有明显的影响。试验证明了细胞在合成对硫磷水解酶过程中底物起着重要作用, 一旦酶蛋白合成受到阻碍, 即使底物存在也不会引起酶的合成。Engelhardt 等用 Linuron 诱导细菌 *Bacillus sphaericus* 产生降解 Linuron 的酰胺酶, 也进行了氯胺苯醇抑制诱导酶的生成试验^[3], 与我们的试验结果是十分一致的。

3. 诱导酶形成的动力学 将停滞生长期的细菌接种到含对硫磷的液体培养基中, 试验开始半小时后, 每间隔一定时间取样测定整细胞和无细胞酶制剂的对硫磷水解酶的活力, 结果见表 3。对硫磷水解酶在细菌体内合成的速度与诱导的时间以及与细胞生长繁殖速度的关系见图 1。

表 3 诱导时间与水解对硫磷整细胞活力和酶活力的关系

诱导时间 (小时)	整 细 胞 活 力 (毫微克分子/OD ₅₀₀ /分钟)	酶 活 力 (毫微克分子/毫克蛋白/分钟)
0	5.18	83.9
0.5	22.91	252.2
3	53.45	352.35
6	146.82	633.35
12	740.72	2217.4
24	4850.00	5820.0
48	4742.22	12105.6
120	4930.00	13580.0

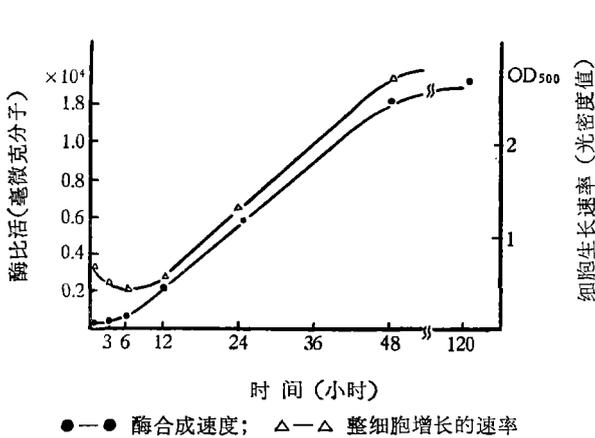


图1 酶的合成与诱导时间的关系

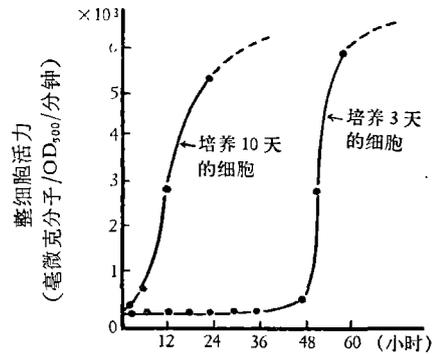


图2 细胞生长情况与对硫磷水解酶合成的关系

从表3可以看出,细菌接触底物半小时后,整细胞和酶制剂水解对硫磷的活力都有明显增高,整细胞为开始的4倍,无细胞酶制剂为开始的3倍,并随培养的时间加长逐步增高,但在6小时以内上升得比较缓慢,6小时以后急剧上升,48小时达到高峰。在有底物诱导的培养条件下,整细胞与酶制剂水解对硫磷的活力增长情况是十分相同的。试验结果还表明(图1),开始6小时细胞密度从 OD_{500} 为0.73下降到0.44,6小时以后细菌重新繁殖,12小时达到0.55,然后成直线上升,48小时达到高峰,这一结果与对硫磷水解酶的合成规律是相一致的。细胞密度下降,可能是由于细菌利用的碳源突然从葡萄糖和牛肉膏转为对硫磷,因此产生了一段适应期,正如图1的动力学曲线表现出有6小时的滞缓期,这个时期内酶活力成曲线上升,然后酶大量合成,活力直线上升,而这时细菌正处在指数生长期,48小时以后趋于平衡状态。

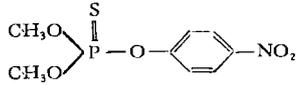
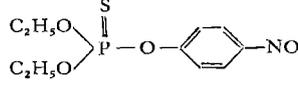
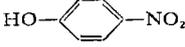
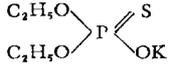
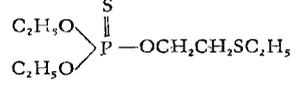
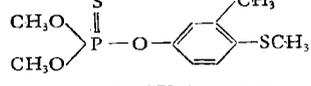
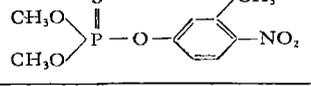
4. 诱导响应时间与细菌生长期的关系 将葡萄糖作为碳源培养细菌,分别将指数生长期和滞缓生长期的细胞转入以对硫磷为碳源培养,定时测定细菌分解对硫磷的速率,结果见图2。

从图2可以看出,滞缓生长期的细胞在接触底物半小时后就显示出明显的降解对硫磷活力。然而处于旺盛生长期的细胞接触底物48小时以后才开始表现出降解活力,诱导响应时间比较长。在这段时间内菌悬液的光密度从0.062下降到0.015,大部分不适应的细胞被淘汰。到48小时以后,细菌细胞重新开始繁殖,这时降解对硫磷的活力也大大增加了,增加的速率与停滞生长期细胞的试验结果一致。试验说明了诱导响应时间是与细胞的生长状态密切相关的。指数生长期细胞大部分是刚分裂的新生细胞,对于外界环境条件的变化适应性较差。反之,老细胞对外界条件变化容易产生酶系统的适应。

5. 诱导剂的特异性 试验已经证明对硫磷对CTP-01具有底物诱导作用,用其他类似结构的物质及其对硫磷的代谢产物代替对硫磷作为诱导剂,细菌在 30°C 下用摇床培养3天后,测定各组对硫磷水解酶活力,结果见表4。

从表4可以看出,甲基对硫磷和对硝基酚也可以诱导细菌细胞大量合成对硫磷水解酶,特别是甲基对硫磷效果超过了乙基对硫磷。杀螟松等其他化合物虽然在结构上与对硫磷很相似,但是诱导合成对硫磷水解酶的能力很弱。可见,细菌的底物诱导是有一定的

表 4 各种化合物对细菌诱导酶合成的作用

化合物名称	化 学 结 构	浓度毫克/升	酶 比 活 (毫微克分子/ 毫克蛋白/分钟)
甲基对硫磷		150	8571.3
乙基对硫磷		150	4005.0
对硝基酚		60	1907.4
二乙基硫代磷酸钾		250	39.14
内吸磷		150	44.38
倍硫磷		150	42.98
杀螟松		150	91.45
对 照	Burk 无机培养液		31.97

特异性。上述三种能力较强的诱导剂,都具有对硝基酚基团,而诱导效果很小的化合物正是缺少这一基团或对硝基酚基团上有其他取代基,这一结果说明了 CTP-01 合成对硫磷水解酶的诱导特异基团可能同对硝基酚及其苯环上的取代基有密切关系。诱导酶的生成除了底物本身的诱导作用以外,还可以为其他类似化学物质诱导,Blake 等^[2]在研究水解 Propanil 的酰胺酶时曾提到这种情况,指出单一的酶可能为现存的不同化合物诱导。从我们的试验结果可以看到,对硫磷水解酶除了底物本身外,也可以被其他物质诱导,但这类化合物必须要有一个主要诱导基团,如果缺少这一基团,结构上即使很相近,诱导能力也是很弱的。

对硫磷能够诱导细菌产生相应的酶类。而且细菌随着接触底物时间的延长,经过一段适应期以后,在细胞内大量合成水解对硫磷的酶类。只有当这些酶类大量合成时,细菌才能在这样的环境条件下迅速生长繁殖。严家湖氧化塘长期接受含有多种有机磷农药废水。造成一种特殊生态环境,这些化合物不断地对微生物产生诱导作用,生成了各种能分解这类毒物的细菌。我们已经从氧化塘中分离出能分解对硫磷的 CTP-01 和能分解对硝基酚的 CTP-02,并且都具有很高的分解效率。因此这种特殊诱导生态系统的形成是氧化塘对各种毒物具有很强净化能力的生物学基础。

参 考 文 献

- [1] 张甬元等, 1981。有机磷农药在水生态系中生物净化机理研究。1. 对硫磷的酶解。本刊、本期:
- [2] Blake, J. and D. D. Kaufman, 1975. Characterization of acylanilide-hydrolyzing enzyme (s) from *Fusarium oxysporum* Schlecht. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 5(4): 305—313.
- [3] Engelhardt, G., Wallnöfer, P. R. and R. Plapp, 1971. Degradation of linuron and some other herbicides and fungicides by a linuron-inducible enzyme obtained from *Bacillus sphaericus*. *Appl. Microbiol.*, 22(3): 284—288.
- [4] Stevens, R. A. and R. E. Levin, 1977. Purification and characteristics of an Alginase from *Alginovibrio aquatilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33(5): 1156—1161.
- [5] Wallnöfer, P. R. and J. Bader, 1970. Degradation of urea herbicides by cell-free extracts of *Bacillus sphaericus*. *Appl. Microbiol.*, 19(5): 714—717.

MECHANISM OF BIODEGRADATION OF ORGANOPHOSPHATE PESTICIDES IN AQUATIC ECOSYSTEM

4. THE INDUCIBLE SYNTHESIS CHARACTER OF PARATHION HYDROLASE IN *PSEUDOMONAS* SP. CTP-01

Tan Yuyun, Zhang Yongyuan, Sun Meijuan and Zhang Jinjun

(*Institute of Hydrobiology, Academia Sinica*)

Abstract

Parathion hydrolase may rapidly hydrolyze P-O bond of parathion molecule. Experiments show that the parathion-induced formation of the enzyme in *Pseudomonas* sp. CTP-01 is responsible for parathion degradation. Methyl parathion and p-nitrophenol also served as inducers of the enzyme. Response of stationary phase cells to substrate induction is much faster than response of cells at the exponential phase of growth.