

微生物降解农药的研究进展

杨明伟, 叶 非*

(东北农业大学理学院, 哈尔滨 150030)

摘要 在农药的微生物降解研究中,分离构建一种由天然微生物构成的复合系,将其应用于被污染的环境是消除农药污染的一个有效方法。本文综述了环境中降解农药的微生物种类、微生物降解农药的机理、在自然条件下影响微生物降解农药的因素及农药微生物降解研究方面的新技术和新方法。

关键词 微生物; 生物降解; 农药降解; 农药

中图分类号: Q 938.1; X592 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2010.03.006

Research progress in degradation of pesticides by microbes

Yang Mingwei, Ye Fei

(College of Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract Microbial degradation of pesticides is an effective way to eliminate pesticide-pollution. The types of microbes, the degradation mechanisms, the effects on microbial degradation of pesticides and the new technology and methods were summarized in this paper.

Key words microorganism; biodegradation; degrade pesticides; pesticides

随着农药工业的发展,大规模使用化学农药所带来的环境问题日益严重,研究者们相继对除草剂、杀虫剂、杀菌剂、杀线虫剂的微生物降解进行了深入细致的研究,近几十年工作发现微生物对土壤和水环境的农药降解起主要作用,已分离出一批能降解或转化某些农药的微生物类群,并探讨了微生物降解农药的主要作用方式及降解机制,以及各类化学农药微生物降解的途径^[1-3]。本文综述了近年来农药生物降解的研究进展,提出存在的问题和发展趋势。

1 降解农药的微生物类别

已报道的降解农药的微生物有细菌、真菌、放线菌、藻类等,大多数来自土壤微生物类群。细菌由于其生化上的多种适用能力以及容易诱发突变菌株从而占了主要的位置,其中假单胞菌属是最活跃的菌株,对多种农药有分解作用。图1列举了主要的降解农药的微生物类别^[4]。

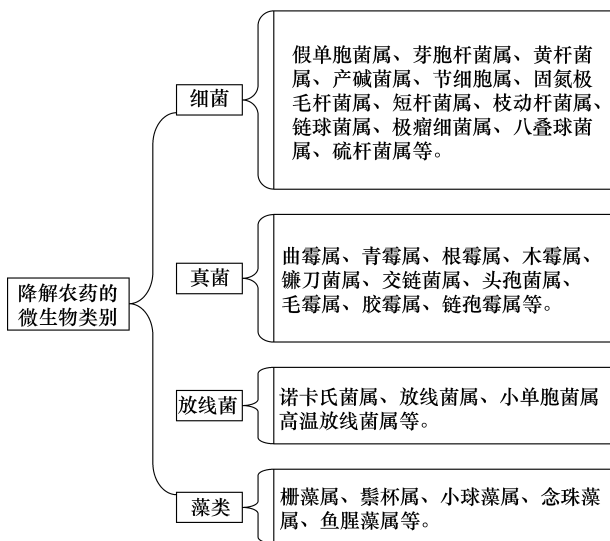


图1 降解农药的微生物类别

2 微生物降解农药的途径与机理

目前,对于微生物降解农药的研究主要集中于细菌。细菌降解农药的本质是酶促反应,即化合物

通过一定的方式进入细菌体内,然后在各种酶作用下,经过一系列的生理生化反应,最终将农药完全降解或分解成分子量较小的无毒或毒性较小化合物的过程。如假单胞菌 ADP 菌株以莠去津为唯一碳源,有 3 种酶参与了降解莠去津的前几步反应,首先是 A_{tzA} 酶催化莠去津水解脱氯的反应,得到无毒的羟基莠去津,该酶是莠去津生物降解的关键酶;其次是 A_{tzB} 酶催化羟基莠去津脱氯氨基反应,产生 N-异丙基氰尿酸酰胺;第 3 步是 A_{tzC} 酶催化 N-异丙基氰尿酸酰胺生成氰尿酸和异丙胺;最终莠去津被降解为 CO₂ 和 NH₃^[5]。由于降解酶往往比产生该类酶的微生物菌体更能忍受异常环境条件,酶的降解效率远高于微生物本身,所以利用降解酶可以作为净化农药污染的有效手段。但是,降解酶在土壤中容易受非生物变性、土壤吸附等作用而失活,难以长时间保持降解活性,并且酶在土壤中的移动性差等因素,限制了降解酶在实际中的应用。试验已经证明,编码合成这些酶系的基因多数在质粒上,如 2,4-D 的生物降解,即由质粒携带的基因所控制,通过质粒上的基因与染色体上的基因的共同作用,在微生物体内把农药降解^[6]。

目前对于各种杀虫剂的微生物降解途径已比较清楚,表 1 列举了几种主要的降解途径^[7]。

表 1 微生物降解农药的主要途径

降解途径	作用机理	适用对象
水解作用	在微生物作用下,酯键和酰胺键水解,使得农药脱毒	如马拉硫磷、敌稗、毒死蜱 ^[8] 等
脱卤作用	卤代烃类杀虫剂,在脱卤酶的作用下,其取代基上的卤被 H、羧基等取代,从而失去毒性	如 DDT 降解变为 DDE;二氯苯 ^[9] 等
氧化作用	微生物通过合成氧化酶,使分子氧进入有机分子,尤其是带有芳香环的有机分子中,插入 1 个羟基或形成 1 个环氧化物	如多菌灵和 2,4-D ^[10]
硝基还原	在微生物的作用下,农药中的—NO ₂ 转变为 NH ₂	如 2,4-二硝基酚,其降解产物为 2-氨基-4-硝基酚和 4-氨基-2-硝基酚;对硫磷转为氨基对硫磷;2,4-二硝基苯酚 ^[11]
甲基化	有毒酚类加入甲基使其钝化	如四氯酚、五氯酚 ^[12]
去甲基化	含有甲基或其他烷基,与 N、O、S 相连,脱去这些集团转为无毒	如敌草隆的降解即脱去两个 N-甲基;苯腈 ^[13]
去氨基	脱氨无毒	如醚草通、莠去津 ^[14]

3 影响微生物降解农药的因素

3.1 微生物自身的影响

微生物的种类、代谢活性、适应性等都直接影响到对农药的降解与转化。已经证明,不同的微生物种类或同一种类的不同菌株对同一有机底物或有毒金属的反应都不同。Kumar 等^[15]研究了 *Bacillus circulans*-I, *B. circulans*-II 和 *Staphylococcus* sp. 3 种不同细菌对硫丹的降解,研究表明:3 种细菌纯系培养 14 d 后,对 α -硫丹的降解率分别为 93.3%±0.15%,93.4%±0.15%和 89.95%,对 β -硫丹的降解率分别为 75.96%±0.05%,76.73%±0.05%和 82.9%±0.05%。

微生物具有较强的适应和被驯化的能力,通过一定的适应过程,新的化合物能诱导微生物产生相应的酶系来降解,或通过基因突变等建立新的酶系来降解。微生物降解本身的功能特性和变化也是最重要的因素。陈欢林^[16]指出真菌的代谢方式十分特殊,真菌细胞通过分泌胞外酶将潜在的食物分解,然后再吸收进入细胞,具有很强的分解能力。其中,白腐真菌对很多有毒污染物具有降解转化作用,为生物降解开拓了一条新的途径。白腐真菌的特异耐毒性,使其对毒性大的有机氯化物(如滴滴涕、林丹、氯丹等)也具有广谱降解能力。Huang 等^[17]研究表明 *Boletus edulis*, *Gomphidius viscidus*, *Laccaria bicolor* 和 *Leccinum scabrum* 等 4 种白腐真菌对滴滴涕具有降解能力。

微生物因其自身的生活习性不同,对不同农药的降解有着完全不同的结果,这也是研究人员普遍关心的问题,随着人们对微生物了解的深入,农药降解的研究也会取得长足发展。

3.2 农药结构的影响

农药化合物的分子量、空间结构、取代基的种类及数量等都影响到微生物对其降解的难易程度。不同化学结构的农药,生物降解性由易到难依次为脂肪酸类、有机磷酸盐类、长链苯氧基脂肪酸类、短链苯氧基脂肪酸类、单基取代苯氧基脂肪酸类、三基取代苯氧基脂肪酸类、二硝基苯类、氯代烃类^[18]。一般情况下,高分子化合物比低分子量化合物难降解,聚合物、复合物更能抗生物降解^[19];空间结构简单的比结构复杂的容易降解^[20];易溶于水的农药比难溶于水的农药易降解^[21]。陈亚丽等^[22]在试验中发

现,凡是苯环上有-OH 或-NH₂ 的化合物都容易被假单胞菌 WBC-3 所降解,这与苯环的降解通常先羟化再开环的原理一致。Potter 等^[23] 在小规模堆肥条件下研究了多环芳烃的降解后指出,2—4 环的芳烃比 5—6 环的芳烃容易降解。虞云龙^[24] 的研究表明,降解菌对拟除虫菊酯和一硫代磷酸酯杀虫剂的降解速率的差异主要是由它们的疏水性参数 ($\lg K_{ow}$) 引起的。但是,并非 $\lg K_{ow}$ 越小降解速率越大,氯代酚等化合物的微生物降解率先随着疏水性的降低而增大,疏水性进一步降低降解速率又减小,说明有机化合物对细胞膜的穿透要求合适的疏水性。

微生物只能降解特定结构的农药,所以农药结构决定降解该农药的微生物种类,只有对污染环境农药的结构充分了解,才能有效地对其进行生物降解。

3.3 环境因素的影响

环境因素包括温度、酸碱度、营养、氧、底物浓度、表面活性剂等。Sarraz 等^[25] 研究了假单胞菌 *Pseudomonas spinosa*, *P. aeruginosa* 和 *Burkholderia cepacia* 对硫丹的降解,证明了温度和 pH 对微生物降解硫丹的影响,指出上述三菌株降解硫丹的最佳温度为 30 ℃,pH 为 8.0。Athanasios 等^[26] 研究了敌草隆的微生物降解,指出其好氧降解为 60%,降解产物为 DCA,厌氧降解则超过 95%,降解产物为 DCPU。Rhodes^[27] 研究了不同土壤对 2,4-二氯苯酚降解的影响,发现微生物或其产生的酶系降解农药都需要适宜的温度、pH 及底物浓度。

Hundt 等^[28] 调查了芳香基化合物在土壤中和堆肥中被细菌 *Ralstonia* 和 *Pickettii* 降解及矿化情况,在土壤水分适宜的条件下,非离子型表面活性剂吐温 80 可增强微生物对芳香基化合物的利用率。Kastner 等^[29] 认为,在堆肥与被多环芳烃污染的土壤混合的情况下,堆肥中有机基质含量对于农药降解的作用要大于堆肥中生物的含量对于农药降解的作用;营养对于以共代谢作用降解农药的微生物更加重要,因为微生物在以共代谢的方式降解农药时,并不产生能量,需其他的碳源和能源物质补充能量。

农药的生物降解是一个复杂的过程,影响因素很多。近年来,人们越来越多地关注到环境对农药的生物降解的影响,取得了很多成果,在今后的研究中,尤其在农药生物降解实际应用中,环境因素将是

人们必须考虑的因素。

4 农药微生物降解的新技术和新方法

4.1 固定化微生物技术在农药降解中的应用

自 20 世纪 70 年代后期以来,固定化微生物的研究迅速发展,其应用范围很广。其中,应用固定化微生物技术降解污水中的农药,成为一个新的研究领域。Jiyeon 等^[30] 利用海藻酸钙固定微生物,对蝇毒磷的降解进行试验,取得了满意的结果,其降解能力优于未固定化微生物。Quan 等^[31] 用蜂窝状航空陶瓷包埋固定无色杆菌 *Achromobacter* sp., 制成流动床来降解 2,4-D,去除率达 87.9%~100%。

由于固定化细胞对底物和氧气扩散有阻碍,使细胞酶活性降低,通过基因工程手段制备高效工程菌是解决该问题的关键。闫艳春等^[32] 克隆抗性库蚊酯酶基因并在大肠杆菌中高效表达,用海藻酸钠包埋固定此工程菌,并处理有机氯农药三氯杀虫酯和菊酯类农药溴氰菊酯,结果表明,固定化工程菌能高效降解这两种农药。

4.2 农药降解酶制剂的研制及应用

如果用微生物产生的酶来处理农药残留而不是直接使用微生物菌株,那么对环境造成威胁或潜在威胁的风险即可降低。研究表明,一些酶比产生这类酶的微生物菌体更能忍受变异的环境条件,如对硫磷水解酶可耐受高达 10% 的盐浓度和 50 ℃ 的温度,而产生这种酶的假单胞菌在这种条件下却不能生长^[33]。固化酶对环境条件有较宽的忍受范围,可用于农药及类似结构的环境污染物的净化。用降解酶净化农药具有良好的效果,能否应用取决于稳定性及固定化技术的实用性,降解酶的获得可通过生物技术对降解农药的基因进行克隆、基因的高效表达来实现。

4.3 降解基因的克隆、表达及基因工程菌的构建

分子生物学的迅猛发展为农药降解菌从实验室走向实际应用提供了可能。人们寄希望通过基因工程技术将农药降解酶基因或降解质粒克隆到合适的宿主菌中并使其高效表达,构建“高效农药降解菌”,为农药的微生物降解开辟一条新途径。这一领域已成为当今环境生物技术的研究热点之一,也是今后工作的重点。Richard 等^[34] 构建的带有有机磷水解酶基因的工程大肠杆菌能够快速降解有机磷农药。沈标等^[35] 采用三亲接合法成功地将带有 *lux A B*

基因的 Ptr102 质粒转入甲基 1605 降解菌 DLL-1 中,获得的接合子荧光非常强,而且标记质粒非常稳定。此外,除草剂 2,4-D 降解质粒、莠去津降解酶基因等已成功地克隆表达^[36]。

5 存在的问题及展望

目前已相继分离和鉴定了各种降解农药的微生物菌株(包括细菌、真菌等),但是利用微生物进行生物修复的实际应用却往往由于其降解效率较低而受到影响。农药微生物降解的问题主要有以下几方面:(1)单一菌株的纯培养问题;(2)环境条件对微生物降解农药的影响;(3)微生物降解目标化合物对降解的影响;(4)微生物与被降解物接触的难易程度;(5)微生物的适应性问题。因此,农药降解菌从实验室到实际应用还有一段路要走。

微生物降解农药的研究方向包括:高效农药降解工程菌的开发、混合菌的培养、降解菌的固定化、白腐真菌降解农药的研究和农药生物降解的模型量化研究。近年来,伴随着基因工程和分子生物学研究技术的发展,科研工作者开始把重心转移到高效工程菌的构建,采用基因重组技术,将表达高效降解农药的酶的基因构建到载体中,经转化获得工程菌,以期提高起降解作用的特定蛋白质或酶的表达水平,从而提高降解效率,既能克服一些酶在环境中不能稳定存在的问题,又保持了酶的高活性。随着基因工程进一步发展,微生物在农药降解方面的潜力会得到更充分的体现。

参考文献

- [1] Barragán H C, Costa P J, Peralta C J, et al. Biodegradation of organochlorine pesticides by bacteria grown in microniches of the porous structure of green bean coffee[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2007, 59(3):239-244.
- [2] Li X H, Jiang J D, Gu L F, et al. Diversity of chlorpyrifos-degrading bacteria isolated from chlorpyrifos-contaminated samples[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2008, 62(4):331-335.
- [3] Wen J P, Li H M, Bai J, et al. Biodegradation of 4-chlorophenol by candida albicans PDY-07 under anaerobic conditions[J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2006, 14(6): 790-795.
- [4] 魏敏,李玉江. 微生物降解土壤残留农药的研究进展[J]. 山东化工, 2007, 36(3):15-18.
- [5] 张宏军,崔海兰,周志强,等. 莠去津微生物降解的研究进展[J]. 农药学报, 2002, 4(4): 10-16.
- [6] 崔中立,李顺鹏. 化学农药的微生物降解及其机制[J]. 江苏环境科技, 1998, 11(3):1-5.
- [7] 孙建光,姜瑞波,任天志,等. 我国农田和水体污染及微生物修复前景[J]. 中国农业资源与区划, 2008, 29(1):41-47.
- [8] Kenneth D R, Kent P S, Robin N Y, et al. Factors affecting the hydrolytic degradation of chlorpyrifos in soil[J]. J Agric Food Chem, 1996, 44(6):1582-1592.
- [9] Jacobus S, John E R. Reductive dehalogenation of dichloroanilines by anaerobic microorganisms in fresh and dichlorophenol-acclimated pond sediment [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1989, 55(10):2527-2531.
- [10] Eva M T, Mphokgo P M, Marleen C, et al. Methane oxidation as a method to evaluate the removal of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) from soil by plasmid-mediated bio-augmentation[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1998, 28(3):203-213.
- [11] Julie L E, Perry J G, James E G. Kinetics of in vitro nitro reduction of 2,4-dinitrophenol by rat liver homogenates[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 1974, 27(1):140-144.
- [12] Law W M, Lau W N, Lo K L, et al. Removal of biocide pentachlorophenol in water system by the spent mushroom compost of *Pleurotus pulmonarius* [J]. Chemosphere, 2003, 52(9):1531-1537.
- [13] Bernhard M B. Parameters influencing biotransformation rates of phenylurea herbicides by soil microorganisms[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 1998, 60(2):71-82.
- [14] Erickson L E, Lee K H. Degradation of atrazine and related triazines [J]. Critical Reviews in Environmental Control, 1989, 19(1):1-14.
- [15] Kumar M, Philip L. Enrichment and isolation of a mixed bacterial culture for complete mineralization of endosulfan [J]. Environ Sci Health B, 2006, 41(1):81-96.
- [16] 陈欢林. 环境生物技术与工程[M]. 北京:化学工业出版社, 2003:128.
- [17] Huang Y, Zhao X, Luan S J. Uptake and biodegradation of DDT by 4 ectomycorrhizal fungi[J]. Science of the Total Environment, 2007, 385(1-3):235-241.
- [18] 陈剑虹. 环境工程微生物学[M]. 武汉:武汉理工大学出版社, 2003:137.
- [19] 孔繁翔,尹大强,严国安. 环境生物学[M]. 北京:高等教育出版社, 2000:211-230.
- [20] 莫测辉,蔡全英,吴启堂,等. 城市污泥与玉米秸秆堆肥中多环芳烃(PAHs)的研究[J]. 农业工程学报, 2001, 17(5):73-77.
- [21] 常学秀,张汉波,袁嘉丽. 环境污染微生物学[M]. 北京:高等教育出版社, 2000:158.