

# 农药毒死蜱环境污染微生物修复研究进展

黄强, 吴祥为, 花日茂\*, 操海群, 汤锋, 李学德, 岳永德

(1. 安徽农业大学资源与环境学院, 安徽省“农产品安全”重点实验室, 安徽合肥230036; 2. 国际竹藤网络中心, 北京100102)

**摘要** 在简要介绍毒死蜱特性的基础上阐述了毒死蜱降解菌的筛选, 论述了毒死蜱环境污染的微生物处理, 并指出了毒死蜱微生物降解研究的发展方向。

**关键词** 毒死蜱; 环境污染; 微生物降解; 酶

**中图分类号** X172 **文献标识码** A **文章编号** 0517 - 6611(2008)22 - 09682 - 02

## Progress on the Microbial Remediation of the Environmental Pollution by Pesticide Chlorpyrifos

HUANG Qiang et al (College of Resources and Environmental Science of Anhui Agricultural University, Key Lab of Agricultural Food Safety of Anhui Province, Hefei, Anhui 230036)

**Abstract** Based on introducing the characteristics of chlorpyrifos-briefly, the screening of chlorpyrifos-degrading bacteria was described. The microbial treatment of the environmental pollution by chlorpyrifos was discussed. And the developmental direction of the research on the microbial degradation of chlorpyrifos was pointed out.

**Key words** Chlorpyrifos; Environmental pollution; Microbial degradation; Enzyme

农药在环境中的降解主要受生物因素和非生物因素2个方面的影响。前者是农药在生物体内代谢与降解, 如动植物和微生物的降解转化, 后者是农药在非生物因素如光、热等影响下进行的降解。在生物转化中, 微生物被认为是有机磷农药在环境中降解的最主要因素。残留农药的去除是减少农药危害的现实而有效的途径。微生物具有种类多、变异快和易于操纵的特点, 是生物修复的重要生物资源。所以, 分离筛选能高效降解农药的微生物是进行农药污染治理、生物修复的有效措施<sup>[1-5]</sup>。

### 1 毒死蜱简介

毒死蜱(Chlorpyrifos)又名乐斯本(陶氏益农)、白蚁清(陶氏益农), 1965年由美国陶氏公司在美国登记。其有效成分为O,O-二乙基O(3,5,6-三氯-2-吡基)硫逐磷酸酯。毒死蜱原药为白色颗粒状晶体, 室温下稳定, 有硫醇气味, 比重1.398(43.5), 熔点41.5~43.5, 溶解度为 $1.2 \times 10^{-5}$  g/kg水, 溶于大多数有机溶剂。其化学结构式<sup>[6-7]</sup>见图1。

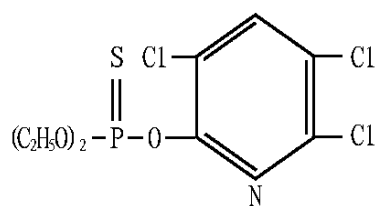


图1 毒死蜱化学结构式

Fig.1 The chemical structural formula of chlorpyrifos

毒死蜱是甲胺磷和甲基对硫磷等高效农药的新型高效、低毒替代品种, 作为一种广谱型有机磷酸酯类杀虫剂, 被广泛用于农业和城市卫生害虫的防治<sup>[8]</sup>。毒死蜱虽然毒性较低, 但在欧盟国家大量使用已使其在地中海沿岸的表面水中残留。由于它的生物富集作用, 对周围的环境、生物以及人类产生危害作用。随着人们对其安全性的认识, 一些发达国家已经开始禁用毒死蜱。2000年美国环境保护局官员Browner宣布禁止在美国家庭和庭院内使用毒死蜱杀虫剂,

并减少毒死蜱在其他方面的使用<sup>[9-11]</sup>。

### 2 毒死蜱降解菌的筛选

国内对毒死蜱的微生物降解研究起步较晚, 但发展比较迅速, 已经取得一定进展, 筛选和分离出了一些降解毒死蜱的微生物。报道最早的毒死蜱降解微生物是从施用二农和对硫磷的土壤中筛选出来的, 它们通过共代谢作用降解毒死蜱, 不能以毒死蜱为唯一碳源<sup>[12-13]</sup>。有学者将前人找到的降解对硫磷等的黄杆菌(*Flabobacterium* sp.)和节杆菌(*Athrobacter* sp.)用来降解毒死蜱, 取得了良好的效果<sup>[14]</sup>。杨丽从蔬菜大棚土壤中分离到一株能以毒死蜱为唯一碳源和能源生长的菌株DSP3。该菌在土壤试验中20 d对毒死蜱(100 ng/kg)的降解率接近100%, 在蔬菜大棚新鲜土壤中加入DSP3菌能有效促进毒死蜱在土壤中的降解。根据生理生化特征、16S rDNA序列分析、(G+C) mol%测定和DNA同源性分析, 将菌株DSP3鉴定为粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*)<sup>[15]</sup>。李晓慧等从长期受毒死蜱污染的污水处理池中分离到一株毒死蜱高效降解菌株, 经生理生化和16S rDNA序列同源性分析, 鉴定其为鞘胺醇单胞菌属(*Sphingomonas* sp.)细菌。该菌株能在24 h内完全降解100 ng/L的毒死蜱<sup>[16]</sup>。秦坤等筛选了3株真菌均能以乐斯本为唯一碳源生长从而将其降解<sup>[17]</sup>。吴祥为等从毒死蜱废水处理系统出口处的污泥中筛选出3株毒死蜱高效降解菌<sup>[18]</sup>。王金花等从污水排放口污泥中分离到3株以毒死蜱为唯一碳源生长的真菌WZ<sub>1</sub>、WZ<sub>2</sub>和WZ<sub>3</sub>, 鉴定均为镰孢霉属(*Fusarium* LK.exFx), 3株菌5 d内对50 ng/L毒死蜱的降解率分别高达93.5%、91.4%和83.5%<sup>[19]</sup>。刘新等从连续使用毒死蜱的土壤中分离了1株可降解毒死蜱的真菌曲霉Y。该菌还对甲胺磷有较强的降解能力, 对乐果有一定的降解能力<sup>[20]</sup>。

### 3 毒死蜱环境污染的微生物处理

降解菌的筛选是农药污染环境微生物治理的第一步, 目前, 国内外对降解菌在生物修复中的应用已经展开了广泛的研究。固定化微生物技术是生物工程领域中的一项新技术, 它是通过采用化学或物理的手段将游离细胞或酶定位于限定的空间区域内, 使其保持活性并可重复利用。由于其有利于提高生物反应器内的微生物细胞浓度和纯度, 并保持高效

基金项目 国家“863”项目(2007AA10Z403)资助。

作者简介 黄强(1982-), 男, 江苏丹阳人, 硕士研究生, 研究方向: 农药环境毒理。\* 通讯作者, E-mail: ni naohua@ahau.edu.cn。

收稿日期 2008-05-21

菌种, 污泥产量少, 二次污染小, 利于反应器的固液分离等特点, 人们开始考虑利用固定化微生物技术取代传统的活性污泥法。一般固定化微生物的制备方式大致可分为吸附法、共价结合法、交联法和包埋法4 大类。其中包埋法是微生物固定化最常用的方法。与游离微生物相比, 固定化微生物明显地显示出微生物密度高、反应速度快、微生物流失少、产物分离容易、反应过程控制较容易等优点, 已应用于生产实际且成果显著。乔传令等将已构建的可降解有机磷酸酯等杀虫药剂的转解毒酶基因工程菌细胞固定化, 测定了固定化细胞的酶活, 发现对毒死蜱等3 类杀虫剂均具有一定的降解效果<sup>[21]</sup>。研究表明, 微生物对环境中的特异性限制因子的应答能力一般是由质粒控制的。王晓等从一株毒死蜱降解菌中提取了降解质粒, 转入大肠杆菌JM109 构建新的降解工程菌; 并将降解质粒和工程菌应用于土壤之中, 实现了降解质粒与土壤微生物基因水平转移<sup>[22]</sup>。农药微生物降解的本质是酶促反应。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, 特别是对低浓度的农药, 所以农药降解酶目前已被公认为消除农药残留的最有潜力的新方法。国内的研究中已经提取、分离了许多有机磷杀虫剂的降解酶。谢慧等从高效降解真菌镰孢霉属WZ-I 中提取了降解酶, 研究了该降解酶的分离条件及对毒死蜱的降解特性, 结果表明, 其胞内酶对毒死蜱的降解率高达60.8%, 细胞碎片对毒死蜱的降解率为48.0%, 但由 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  沉淀提取的胞外酶液对毒死蜱的降解率仅为11.3%, 经8 次非诱导条件下培养提取粗酶液, 酶活力损失较少, 判断WZ-I 菌株的毒死蜱降解酶为胞内酶且属于组成酶。谢慧等利用毒死蜱降解菌WZ- 能高效降解毒死蜱的特性, 研究了消除蔬菜表面毒死蜱残留污染的途径, 结果表明, 使用一定浓度的降解酶液能有效去除蔬菜表面的农药残留污染, 在10 min 内最高去除率可达60.2%。此外, 还可以通过基因重组技术扩大降解菌对农药的降解谱, 提高治理效果<sup>[23]</sup>。

#### 4 毒死蜱微生物降解研究的发展方向

**4.1 构建“超级降解微生物”** 在自然条件下筛选的很多微生物都能同时降解一类或者同类的几种农药, 人们可以通过基因重组技术将不同降解农药质粒或降解农药基因组建到同一菌株内, 构建“超级降解微生物”, 从而扩大降解菌对农药的降解范围, 提高治理效果, 降低治理成本。

**4.2 降解酶的利用与降解基因的改良** 降解酶在微生物降解中凸显出其独特的优势, 但是由于直接筛选的降解菌的降解酶活性往往较低, 不能满足实际需要, 可以通过定向诱变、随机突变或DNA 改组等分子生物学技术来提高其活性, 以增强对污染物的降解能力, 在美国, DNA 改组技术已被应用

于环境污染物的去除。

**4.3 从实验室研究逐渐走向实际应用** 目前毒死蜱的微生物降解研究多停留在实验室水平, 与实际的农药应用相比, 是在相当强选择压下分离得到的降解菌, 且用纯培养的方式进行试验, 在田间农药残留量极低的情况下, 得到的降解菌可能降解活性偏低。今后在田间应用或实际使用的适应性和工程化方面有待于进一步研究。

#### 参考文献

- [1] DAVE KI, PHILLIPS L, LUKOW V A, et al. Expression and post-translational processing of a broad-spectrum organophosphorus neurotoxin degrading enzyme in insect tissue culture[J]. *Biotechnology Appl Biochem*, 1994, 19(3): 271 - 284.
- [2] MILLBRY W, KEARNEY P C. Degradation of pesticides by microorganisms and the potential for genetic manipulation[J]. *Genet*, 1991, 10: 334 - 346.
- [3] 沈德中. 污染环境的生物修复[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 15.
- [4] ASLAMEJ, LLOYD JONES G. A review of bacterial degradation of pesticides[J]. *Australia Journal of Soil Research*, 1995, 33: 925 - 942.
- [5] RACKE K D, LASKOWSKI D A, SCHULIZ MR, et al. Resistance of chlorpyrifos to enhanced biodegradation in soil[J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1990, 38: 1430 - 1436.
- [6] 王焕民, 张子明. 新农药手册[C]// 农业部农药检定所. 北京: 中国农业出版社, 1989: 3.
- [7] 刘乾开. 新编农药使用手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1993: 84 - 86.
- [8] DAVID S, STUART H, KEMN R. Analytical chemistry of chlorpyrifos and D-uron in aquatic ecosystems[J]. *Analytical Chimica Acta*, 1998, 360: 1 - 16.
- [9] SERRANO R, SERRANO R. Bioconcentration of chlorpyrifos, Chlorfenvinphos and Methidathion in *Mylus galloprovincialis*[J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1997, 59: 968 - 975.
- [10] SHERMAAJ D. Chlorpyrifos (dusban)- associated birth defects: Reports of four cases[J]. *Arch Environ Health*, 1996, 51(1): 5 - 8.
- [11] 秦钰惠, 王以燕. 美国关于毒死蜱的最新决定[J]. *农药*, 2000, 39(8): 45.
- [12] SETHUNATHAN N, YOSHIDA T. A Haobacterium that degrades diazinon and parathion[J]. *Can J Microbiol*, 1973, 19: 873 - 875.
- [13] SERDAR C M, GIBSON D T, MUNNECKE D M. Hasnid involvement in parathion hydrolysis by *Pseudomonas diminuta*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1982, 44: 246 - 249.
- [14] MALICK K, BHARATI K, BANERJI A, et al. Bacterial degradation of chlorpyrifos in pure cultures and in soil[J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1999, 62(1): 48 - 54.
- [15] 杨丽, 赵宇华, 张炳欣, 等. 一株毒死蜱降解细菌的分离鉴定及其在土壤修复中的应用[J]. *微生物学报*, 2005, 45(6): 905 - 909.
- [16] 李晓慧, 贾开志, 何健, 等. 一株毒死蜱降解菌株 *Sphingomonas* sp. Dsp-2 的分离鉴定及降解特性[J]. *土壤学报*, 2007, 44(4): 734 - 739.
- [17] 秦坤, 唐心强, 张丽青. 乐斯本降解真菌的筛选及降解特性研究[J]. *泰山医学院学报*, 2007, 28(6): 437 - 440.
- [18] 吴祥为, 花日茂, 操海群, 等. 毒死蜱降解菌的分离鉴定与降解效能测定[J]. *环境科学学报*, 2006, 26(9): 1433 - 1438.
- [19] 王金花, 朱鲁生, 王军, 等. 3 株真菌对毒死蜱的降解特性[J]. *应用与环境生物学报*, 2005, 11(2): 211 - 214.
- [20] 刘新, 尤民生, 魏英智, 等. 降解毒死蜱曲霉 Y 的分离和降解效能测定[J]. *应用与环境生物学报*, 2003, 9(1): 78 - 80.
- [21] 乔传令, 邢建民, 王靖. 转解毒酶基因工程菌的解毒作用研究[J]. *中国环境科学*, 2001, 21(2): 105 - 108.
- [22] 王晓, 楚小强, 虞云龙, 等. 毒死蜱降解菌株 *Bacillus laterosporus* DSP 的降解特性及其功能定位[J]. *土壤学报*, 2006, 43(4): 648 - 654.
- [23] 谢慧, 朱鲁生, 李文海, 等. 利用降解酶去除蔬菜表面农药毒死蜱残留[J]. *农业环境科学学报*, 2006, 25(5): 1245 - 1249.