

专论与综述

微生物降解农药的研究新进展*

杨小红^{* * 1} 李俊¹ 葛诚² 沈德龙¹(农业部微生物肥料质量监督检验测试中心 北京 100081)¹(中国农业科学院土壤肥料研究所 北京 100081)²

摘要: 农药中, 尤其化学农药中高毒、高残留、难降解的农药是重要的环境污染物, 而微生物治理农药污染是一项有效手段, 几十年来, 在这方面已进行了大量研究。从农药降解菌的种类、工程菌的构建、微生物降解农药的机理、降解特性、影响因素及应用效果等几方面综述了近年这些方面的研究进展, 并提出农药微生物降解研究领域的发展趋势和有待进一步解决的问题。

关键词: 农药、微生物降解、影响因素

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 06-0093-04

NOVEL ADVANCES ON PESTICIDES DEGRADATION BY MICROORGANISMS*

YANG Xiao-Hong^{* * 1} LI Jun¹ GE Cheng² SHEN De-Long¹(Center for quality supervision and test of microbial fertilizers, Ministry of Agriculture, Beijing 100081)¹(Soil and Fertilizer Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)²

Abstract: Pesticides, especially chemistry pesticides with high toxicity, high residue, and difficult degradation are a kind of important environment pollutants and pesticide degradation by microorganisms is one of the powerful means to treat pesticide pollution. Many researchers conducted lots of studies on it. Types of pesticide degraders, construction of genetically engineered microorganisms, degrading mechanisms, degradation characteristics, influencing factors, applying effect and so on were summarized in this article. The research trend of degradation of pesticides by microorganisms and problems to be solved were also put forward.

Key words: Pesticides, Microbial Degradation, Influencing factors

农药污染是我国影响范围最大的一种有机污染, 不仅污染土壤环境和农作物, 而且还进一步污染到地面水体和地下水以及海洋环境, 直接威胁着人类的生存环境和身体健康。我国是个农业大国, 农药, 尤其是化学农药的使用, 依然是保证粮食作物增产、稳产的重要的和有效的手段, 为了解决这个矛盾, 一方面要开发高效、低毒、低残留的化学农药或生物农药, 另一方面则是要找到能够高效、快速降解农药残留的制剂。在生态系统中, 微生物对农药的分解起着重要的作用。它对外来化合物降解或转化所具有的巨大潜力, 一直是国内外的研究热点, 对降解农药的研究始于 40 年代末, 至今已取得了很大进展, 表现在降解农药的微生物种类不断被发现, 降解机理日趋深入, 降解效果稳定提高等方面。

* 973 资助项目 (No. 001CB1089)

* * 联系人 E-mail: baby88440363@sina.com, Tel: 010-68918675

收稿日期: 2003-01-26, 修回日期: 2003-04-22

1 农药降解微生物种类

大量研究证明, 自然环境中存在的多种微生物在农药降解方面起着重要的作用, 科研工作者通过富集培养、分离筛选等技术已发现了许多能够降解农药的微生物^[1]。近年来, 随着有机磷类农药的大量使用和拟除虫菊酯类、除草剂类农药的兴起, 围绕这类农药的降解微生物的筛选与研究取得了一定的进展。已发现降解有机磷类农药的微生物有假单胞菌属微生物, 如施氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*)、嗜中温假单胞菌 (*P. mesophilica*)、铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*) 和类产碱假单胞菌 (*P. pseudocalcaliges*); 芽孢杆菌属中的地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 和蜡样芽孢杆菌 (*B. cereus*); 真菌中有华丽曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 和鲁氏酵母菌 (*Saccharomyces rouxii*); 此外, 在不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、黄杆菌属 (*Flavobacterium*)、邻单胞菌属 (*Plesiomonas*) 也分离到降解此类农药的微生物。拟除虫菊酯类降解菌主要有产碱菌属 (*Alcaligenes*)。除草剂类农药中的阿特拉津 (*atrazine*) 在国内外使用最为广泛, 其降解菌的研究报道相对较多, 有农杆菌属 (*Agrobacterium*)、假单胞菌属、芽孢杆菌属、真菌中的某些属等。上述降解菌中的曲霉菌、酵母菌及不动杆菌微生物均是近几年新发现的种; 此外, 利用白腐真菌 (*white-rot fungus*) 降解农药的研究也已成为热点。

2 微生物降解农药的机理

微生物对农药的作用方式可分为两大类, 一类是微生物直接作用于农药, 通过酶促反应降解农药, 常说的农药微生物降解多属于此类; 另一类是通过微生物的活动改变了化学和物理的环境而间接作用于农药。常见的作用方式有矿化作用、共代谢作用、生物浓缩或累积作用和微生物对农药的间接作用。微生物通过酶促反应降解农药的方式主要有氧化、脱氢、还原、水解、合成等几种反应类型^[2]。

当微生物农药的降解作用是由其胞内酶引起时, 整个降解过程通过 3 个步骤: (1) 将农药吸附于微生物细胞表面, 这一过程是一种动态平衡, 也是导致降解初期出现“迟缓期”的关键阶段。(2) 农药穿透细胞膜进入膜内, 在菌量一定时, 农药对细胞膜的穿透率决定了其穿透细胞膜的量, 农药对细胞膜的穿透是降解的限速步骤。农药的这种穿透率与农药分子结构参数 (主要是亲脂性参数和空间位阻参数) 密切相关。(3) 农药在细胞膜内通过与降解酶结合发生酶促反应, 这是一个快速过程。

3 微生物降解农药的几方面进展

除上述两方面外, 在农药降解菌的筛选、降解特性、工程菌的构建和影响因素, 以及应用效果等方面的研究也取得了许多的进展。

3.1 农药降解菌的分离、筛选及降解特性研究 农药降解菌的分离、筛选方法, 各实验室基本类同, 为获取降解农药的微生物菌株, 可以从已收藏的菌株中筛选, 亦可以从农药污染的土壤、水体或污水中直接分离筛选或经富集培养获得; 降解特性的研究包括各种农药的微生物降解效果影响因素的研究。实验室液体摇瓶培养条件下, 微生物降解农药的影响因素包括温度、pH、通气条件、微生物浓度、受试农药浓度、离子条件、营养条件^[3]。实验中得出的各影响因素的最适条件一般为: 温度 28℃ ~ 35℃, pH 范围在 6.8 ~ 7.5, 通气条件为培养液体积与摇瓶容积之比 1/3 ~ 1/5, 150r/min 摇床振

荡, 微生物浓度 $10^6 \sim 10^8$ CFU/mL, 而受试农药浓度与微生物本身特性和农药本身性质相关, 从每升几十毫克到每升上千毫克, 均超过自然环境中农药实际存在的浓度, 所采用的无机盐培养基中大多含有磷酸盐缓冲液、硫酸镁、铁离子、钙离子、钠离子等, 不能以农药为唯一碳源、能源的需另外添加一定的葡萄糖或蔗糖, 有的培养液中还需添加少量酵母膏或蛋白胨作为氮源以提高微生物降解农药的能力。

3.2 降解酶基因的克隆、表达调控及基因工程菌的构建 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, 构建降解谱广、降解彻底的工程菌, 为生物降解农药开辟新途径。这一领域已成为当今环境生物技术的热点之一, 目前有很大进展。闫艳春^[4]将抗性尖音库蚊五带亚种的抗有机磷农药基因一酯酶基因克隆到质粒 pRL-439 中, 得到了高酶活的工程菌, 将工程菌固定化后对两类难降解农药 (有机氯、菊酯类) 进行降解, 结果表明, 固定化细胞在 1 小时内对上两类农药可降解 90% 以上。Wilfred Chen^[5]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。此外, 有机磷农药水解酶基因、除草剂 2, 4-D 降解质粒、阿特拉津降解酶基因已成功的克隆并表达, 使构建的工程菌具有更高的降解活性。

3.3 土壤模拟条件下微生物降解农药的特性及影响因素 将实验室筛选出的农药降解菌接种于遭受某种农药污染的土壤或人为加入农药的土壤中, 模拟土壤自然环境, 测定其进入土壤后农药的降解动态或改变一些条件, 分析土壤环境下微生物降解农药的影响因素。综合这方面的实验^[6-9]结果, 可归纳出以下几方面: (1) 土壤中土著微生物对农药的降解作用是缓慢的, 接种降解菌后可使农药的降解速度大大加快。(2) 在一定农药浓度下, 接菌量越大, 降解速度越快, 滞留期越短, 当菌量达到一定程度时, 农药降解加快的趋势并不明显。(3) 农药浓度太低, 不利于微生物的获取, 而太高则可能使微生物的生长受到抑制。(4) 高的土壤湿度有助于农药降解率的提高。(5) 土壤 pH 对微生物的降解作用影响较大。(6) 农药施入土壤后, 与土壤充分混合与否, 对农药降解效果的影响很大, 混合可加快农药的微生物降解。(7) 少量有机物质 (氮源或碳源) 的加入有助于降解率的提高, 加入量过高往往导致降解率下降, 这可能源于微生物对不同碳源的偏好利用。但对外加营养的依赖性小、适应性较强的菌剂来说, 向土壤中加入营养物质与否, 对菌剂的降解效果影响不大。(8) 农药残留的时间越长, 微生物对其降解效果越差。这可能是因为土壤对农药的吸附作用导致农药的生物可得性降低。(9) 液体接种物比颗粒型接种物降解作用的滞留期要短。

土壤中生物降解农药特性及影响因素的研究为土壤修复剂的实际高效应用提供了一定的理论基础, 为土壤修复剂的正确使用提供了思路。如能克服影响因素, 降解菌剂将更好地发挥微生物的降解活性。

3.4 农药降解菌的应用效果研究 这方面的研究报道相对较少。李顺鹏^[10]将从活性污泥中分离到的兼厌气性降解菌产碱菌属的一个种 (*Alcaligenes* sp.) 应用于盆栽试验、小区试验和田间试验均取得了很好的对甲基对硫磷的降解效果。盆栽试验中, 处理的各叶片变黄程度比对照均要轻, 统计差异显著; 小区试验中, 稻米与稻壳中甲基对硫磷处理比对照下降了 82.2% ~ 100%, 效果显著; 田间试验中, 农药 + 菌, 农药 + 有机肥 + 菌的处理, 其稻米中均检测不到甲基对硫磷残留, 而对照稻米中的甲基对硫磷残留量为 0.065, 超过国家标准 (0.05mg/kg)。方玲^[11]将分离到的微生物制成混合降解菌剂

应用于盆栽和田间试验,所得到的降解效果类似于纯培养试验,降解效果显著。程国锋^[12]的小区试验也表明,降解菌剂对普通白菜中残留的甲胺磷和乐果有明显的去除作用,各处理的平均降解达到80%以上。以上说明利用农药降解菌剂解决蔬菜、作物等的农药残留问题是可行的,其应用前景是乐观的。目前,国内已有“农药残留降解菌剂”产品问世,并获得了专利。

4 展望

今后的微生物降解农药的研究方向主要有以下几方面: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。有待进一步研究的问题还有许多,具体有如何在自然界中筛选多功能微生物资源;如何使实验室条件下微生物降解与实际应用效果接近;如何克服影响微生物降解效果的各种限制因子;构建的工程菌其农药降解质粒的稳定性及菌种的安全管理;对于农药微生物降解制剂产品,其降解农药能力的评价及产品进入市场的管理应及早有相应的配套法律法规等等。这些问题的解决,必将推动农药微生物降解的研究进入更高领域,推动农药残留降解菌剂的广泛应用,解决好环境中的农药污染问题。

参考文献

- [1] 郑金来,李君文,晁福宝.环境科学研究,2001,14(2):62~64.
- [2] 林玉锁,龚瑞忠,朱忠林.农药与生态环境保护,北京:化学工业出版社,1999,174~176.
- [3] 李淑彬,周仁超,刘玉焕,等.微生物学通报,1999,26(1):27~30.
- [4] 阎艳春,乔传令,周晓涛.中国环境科学,1999,19(5):461~465.
- [5] Wilfred C, Ashok M. Trends in Biotechnology, 1998, 16(2): 71~76.
- [6] 周军英,林玉锁,徐亦刚,等.中国环境科学,2000,20(6):511~514.
- [7] Niranjana A, Rajiv A, Ashwani K. Soil Biology & Biochemistry, 2000(32): 1697~1705.
- [8] Dimitrios G. Karpouzias, Allan W. Soil Biology & Biochemistry, 2000(32): 1753~1762.
- [9] Philippe D, Nisha R.P, Gerard C, et al. Soil Biol. Biochem, 1996, 28(12): 1805~1811.
- [10] 李顺鹏,丁宪根.土壤学报,1996,33(4):380~384.
- [11] 方铃.应用生态学报,2000,11(2):249~252.
- [12] 程国锋,李顺鹏,沈标,等.应用与环境生物学报,1998,4(1):81~84.