

苏云金芽孢杆菌几丁质酶的研究进展*

卢伟 蔡峻 陈月华**

(南开大学生命科学学院微生物学系天津市微生物功能基因组学重点实验室 天津 300071)

摘要: 苏云金芽孢杆菌制剂作为无公害农药已经得到社会的认可, 如果再开发其几丁质酶抑制真菌和杀虫增效功能, 不仅可充分利用这一农业微生物菌种资源, 也将给予传统生物农药以新的生命力。综述了苏云金芽孢杆菌几丁质酶方面研究的国内外最新进展。

关键词: 苏云金芽孢杆菌, 几丁质酶

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2007) 01-0143-05

Research Progress on *Bacillus thuringiensis* Chitinase*

LU Wei CAI Jun CHEN Yue-Hua**

(Department of Microbiology, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin Key Laboratory of Microbial Functional Genomics, Tianjin 300071)

Abstract: The leading bio-regional pesticide, *Bacillus thuringiensis*, is accepted by the public and widely used biopesticide in the world. *B. thuringiensis* chitinase may contribute to the biocontrol of phytopathogenic fungi and enhance insecticidal activity. It helps to take full advantage of Bt and upgrade the efficiency. This paper reviews the progresses of *B. thuringiensis* chitinase.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, Chitinase

几丁质酶在生物防治方面有两大用途: 其一可以防治真菌病害。因为除卵菌外所有真菌的细胞壁都含有几丁质, 通过水解细胞壁的几丁质可有效的抑制真菌的生长^[1]。其二, 对杀虫剂有增效作用。几丁质是昆虫中肠围食膜的主要结构成分。围食膜是昆虫抵御细菌和病毒的屏障, 被几丁质酶破坏后, 可加速害虫的罹病进程。因此, 与生物农药一起施用, 显著提高防治植物病虫害的效果^[2]。

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis* 简称 Bt) 商品制剂, 作为最重要的生物杀虫剂, 已成功用于多种农、林、果蔬和卫生害虫的防治, 且在减少化学杀虫剂的污染和植物保护中起到了重要作用。许多学者致力于 Bt 几丁质酶的研究, 其目的是为了扩大 Bt 制剂的作用范围, 进一步提高杀虫活性。近几年来, 关于几丁质酶在苏云金芽

孢杆菌的分布、酶的产生条件、酶的性质与结构、Bt 几丁质酶基因的克隆、几丁质酶在生物防治中的作用等方面的研究逐渐增加。本文就上述内容作简单综述, 以期对苏云金芽孢杆菌几丁质酶方面更加广泛和深入的研究提供参考。

1 Bt 几丁质酶及其基因的分布

筛选产几丁质酶菌株最常用的方法是制备以胶体几丁质为唯一碳源的琼脂平板, 通过观察水解圈的有无及大小, 初步确定菌株分解几丁质的能力。近年来, 有几个实验室利用这一方法检测了几丁质酶在苏云金芽孢杆菌中的分布。由于所用培养基不完全一致, 检测的菌株有多有少, 因此检出阳性率也有一定的差别。见表 1。

由表 1 可见, 筛选到产几丁质酶的 Bt 菌株的阳性率在 9.3% ~ 87.0% 之间, 差别比较大。笔者

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30570052)

天津市自然科学基金资助项目 (No. 05YFJMJC00900)

** 通讯作者 Tel: 022-23505964, E-mail: yhchen@nankai.edu.cn

收稿日期: 2006-02-24, 修回日期: 2006-05-04

认为主要原因是培养基中除几丁质外的其他成分。多数实验室利用无机盐加胶体几丁质平板筛选,阳性率都超过50%。本室也是利用这种培养基,筛选了Bt菌株960余株,阳性率为53%(另文报道)。因为在这种培养基上,除几丁质外无任何碳源可以利用,菌体产几丁质酶的能力得到了充分

诱导。而Wiwat^[3]等人利用营养肉汤加胶体几丁质筛选的阳性率仅9.3%。营养肉汤含有细菌生长所需的碳源。按照细胞代谢调节的规律,对于非组成型表达几丁质酶的菌株而言,就不会再去合成该酶,导致检出率低。

表1 Bt几丁质酶的分布检测

平板培养基组成		检测的Bt菌株总数	阳性率	作者
胶体几丁质	其他成分			
0.3%	营养肉汤	150	9.3%	Wiwat et al. ^[3]
1.0%	无机盐	256	87.0%	Driss et al. ^[4]
10.0%	无机盐	70	54.3%	Liu et al. ^[5]
13.0%~14.0%	无机盐	152	65.1%	Rojas-Avelizapa et al. ^[6]

Liu等^[5]检测了70个不同血清型的Bt菌株,几乎包含了Bt所有的血清型。但是属于血清3、5、11和14的菌株均为几丁质酶阴性,而这4个血清型的多株菌的几丁质酶基因序列已被测定。本室检测也发现,属同一血清型的不同菌株,几丁质酶检测结果完全相反,未发现有任何规律。由此可见,Bt菌株的血清型与几丁质酶的产生没有必然联系。

林毅等^[7]利用设计的一对几丁质酶基因引物,以15株不同血清型的苏云金芽孢杆菌DNA为模板,扩增几丁质酶全长基因,发现有9个菌株存在该基因,阳性率达60%。这与多数学者对几丁质酶的检测结果基本一致。由此证明超过50%的Bt菌株能产生几丁质酶。

但是,有些学者认为平板筛选方法有很大局限性^[7]。因为几丁质酶在其性质、酶反应条件及其能否分泌到胞外等方面存在差异。而特异引物PCR方法也可能因为不同几丁质酶基因中引物匹配度的原因造成一些漏检,或者检出沉默基因。因此,笔者认为对于研究Bt菌株几丁质酶的分布情况,需要利用平板筛选和PCR检测的复合方法。

2 Bt几丁质酶的合成条件研究

和其他产几丁质酶的微生物一样,Bt几丁质酶通常也认为是诱导酶,一般认为几丁质或除几丁质单糖以外的几丁质水解产物都可以作为诱导物。而碳氮源,pH、温度等培养条件则一般认为与Bt的最佳培养条件相同。

李力^[8]和祈红兵等^[9]人分别就Bt产几丁质

酶的条件进行了研究。他们发现,不加诱导物时几丁质酶的产量很低或几乎没有。而在诱导物中,细粉几丁质效果最佳,N-已酰葡萄糖则会强烈的抑制几丁质酶的合成。在培养基中加入各种碳源后几丁质酶的产量都会明显减少。无机氮源对酶量的提高基本上没有作用,而有机氮源都能大幅度提高酶的产量,尤其是蛋白胨和酵母膏。与此相反,Arora等^[10]发现了能组成型表达几丁质酶的Bt HD-1菌株,几丁质酶的产量和诱导物无关,甚至在葡萄糖存在的情况下也能产生几丁质酶。

在目前的研究中,多数产几丁质酶的Bt菌株都是在有诱导物的平板上筛选出来的,这些菌株在没有诱导物存在的情况下是否能够合成几丁质酶,目前尚无这方面的研究结果。

3 Bt几丁质酶的理化性质

几丁质酶按照底物和酶切方式的不同,分为内切和外切几丁质酶。已报道的Bt几丁质酶中,外切酶多于内切酶。外切酶的产物即有几丁单糖也有几丁二糖^[4,10,12,13]。Bt几丁质酶作用的最适温度是60℃左右,最适pH偏中性,与大多数细菌几丁质酶最适pH3.0~11.0之间相符^[11]。Barboza-Corona等^[12]通过在*E. coli*表达Bt几丁质酶基因,得到纯化的几丁质酶。这种酶最适pH为6.34,最适温度为57.2℃。但在pH4~9,21℃~68℃都表现出不同程度的活性,甚至在pH8时,仍然有40%的活性。而Liu^[5]等人发现,所检测的38株pH7条件下产几丁质酶的Bt中有17株在pH10的平板上仍有酶活性。由于昆虫中肠的碱性环境,

人们通常认为相比酸性和中性几丁质酶，碱性几丁质酶对杀虫增效作用可能更为明显^[11]。

4 Bt 几丁质酶基因和酶的分子生物学研究

4.1 Bt 几丁质酶基因及其核酸序列特点 目前 GenBank 中已收录几丁质酶基因序列的 Bt 的 9 个亚种 11 个菌株 (表 2)，其中 8 个序列为我国学者提供^[7,14,15]。

表 2 已克隆几丁质酶基因的苏云金芽孢杆菌亚种、血清型及其基因大小

Bt 亚种	血清型	ORF (bp)	基因登录号
<i>Alesi</i>	H3a	2031	AY452507
<i>Kurstaki</i>	H3a3b	2067	AY189740
<i>Kurstaki</i>	H3a3b	2031	AJ635226
<i>Sotto</i>	H4a4b	2067	AY129671
<i>Kenya</i>	H4a4c	2031	AF424979
<i>Canadensis</i>	H5a5c	2031	AY455290
<i>Entomocidus</i>	H6	2031	AY456381
<i>Toumanoffi</i>	H11a11b	2031	AY452506
<i>Pakistani</i>	H113	1908	BTU89796
<i>Israelensis</i>	H14	2067	AF526379
不详	—	2025	AY074882

表 2 中大部分的 Bt 几丁质酶基因的 ORF 是 2,031bp 或 2,067bp，只有两个不同，分别为 Bt *pakistani* 的 1,908bp 和另外一个 2,025bp。Arora 等^[10]在 HD-1 中得到的几丁质酶基因 *chi36* 大小为 1,083bp，与上述 Bt 几丁质酶基因大小相差较大。但 GenBank 中没有该序列。

上述几丁质酶基因序列的同源性很高。通过比较发现，Bt *kurstaki* 的 *chi255*、Bt *pakistani* 的 *chi471* 和 Bt *kenya* 的 *chi474*，都具有相同的 SD 序列 (5'GAAGG3')，且它们启动子的保守序列完全

相同，-10 序列为 (5' TTAATA3')，-35 序列为 (5'TTGAGA3')，转录终止密码子 (TAG) 下游有一重复序列认为可能是转录终止子^[4]。研究表明，它们的启动子和枯草杆菌营养期的 σ^A 因子所识别的启动子及 Bt *cry3A* 基因的启动子有同源性，而与 Bt 中依赖芽孢形成的 *cry* 基因启动子 BtI 和 BtII 没有同源性。并且有学者通过几丁质酶合成曲线，也证明 Bt 几丁质酶的产生是从营养期开始与芽孢的形成无关^[12]。

4.2 Bt 几丁质酶的氨基酸序列 Bt 几丁质酶分为 3 个区域，从 N 端开始依次分别为：几丁质酶催化区，粘蛋白 III 型同源区 (fibronection-like domains, FLDs) 和几丁质结合区 (chitin-binding domain, CBD)。Bt 几丁质酶通常为胞外酶，因此几丁质酶 N 端部分都有信号肽。

4.2.1 信号肽：信号肽与几丁质酶的分泌有关。笔者将表 2 中 11 个 Bt 几丁质酶信号肽的氨基酸序列进行了比较，发现它们完全一致，N 端都有符合一般信号肽特征的蛋白质序列。

4.2.2 几丁质酶催化区域：催化区域是几丁质酶水解几丁质的区域。Bt 几丁质酶的催化区域和糖水解酶 18 家族的典型活性基序列同源^[16]，且 Bt 不同菌株之间几丁质酶催化区域的同源性很高 (见图 1)。Bt *kurstaki* 几丁质酶 (序列号：CAG25670) 的 D-207，D-209，E-211 3 个氨基酸 (图 1 中箭头所指位置，) 被认为对于催化有着重要的作用，E-211 可能参与了儿丁质酶的酸碱催化^[4]。其他 10 株 Bt 几丁质酶相应位点也完全相同。

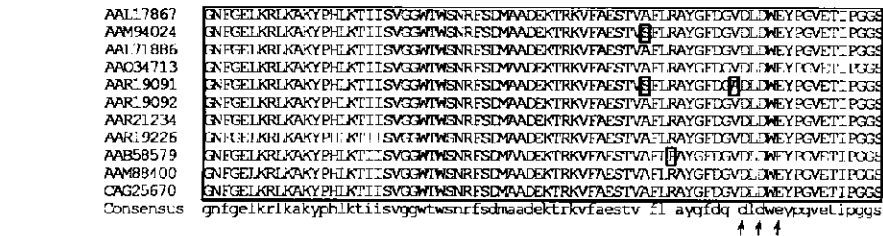


图 1 11 株 Bt 几丁质酶催化区氨基酸序列比较

图左侧为 Bt 几丁质酶在 GenBank 中相应的蛋白质序列号，图中小方框表示不相同的氨基酸
AAL17867 (Bt *kenya*)、AAM94024 (Bt *sotto*)、AAL71886 (Bt)、AAO34713 (Bt *kurstaki*)、AAR19091 (Bt *toumanoffi*)、AAR19092 (Bt *alesi*)、AAR21234 (Bt *canadensis*)、AAR19226 (Bt *entomocidus*)、AAB58579 (Bt *pakistani*)、AAM88400 (Bt *israelensis*)、CAG25670 (Bt *kurstaki*)

4.2.3 粘蛋白Ⅲ型同源区 (FLDs): FLDs 区域在降解不同类型的不可溶多聚物的酶中发现, 如细菌的几丁质酶、纤维素酶和淀粉酶。FLDs 可能和酶与底物的结合有关^[12]。在 FLDs 中, 典型的芳香族氨基酸是非常保守的。Bt 几丁质酶的 FLDs 同源性也很高, 表 2 的 11 个 Bt 几丁质酶中, 除 Bt *pakistanii* 的 ChiA71 只有一个 FLDs^[13] 外, 其余 10 个

Bt 几丁质酶都有两个 FLDs。这 10 个 Bt 几丁质酶的第一个 FLDs 与其他细菌的 FLDs 同源性较低, 但是它们之间的同源性很高, 除极个别外, 几乎完全一致 (未列比较图)。它们的第二个 FLDs 与其他细菌几丁质酶同源性较高而相互之间有些差异 (见图 2)。

AAL17967	ISQKTEPPINVKNTWVNNQSSVQVWIASTNGVVEYETPAGEEKGSTTNSITIKNLKNTETFSVIAKQVAGNSQPTALVTKIDEANI	574
AAM94024	ISQKTEPPINVKNTWVNNQSSVQVWIASTNGVVEYETPAGEEKGSTTNSITIKNLKNTETFSVIAKQVAGNSQPTALVTKIDEANI	586
AAL71886	ISQKTEPPINVKNTWVNNQSSVQVWIASTNGVVEYETPAGEEKGSTTNSITIKNLKNTETFSVIAKQVAGNSQPTALVTKIDEANI	572
AA034113	ISQKTEPPINVKNTWVNNQSSVQVWIASTNGVVEYETPAGEEKGSTTNSITIKNLKNTETFSVIAKQVAGNSQPTALVTKIDEANI	566
AA319091	ISQKTEPPINVKNTWVNNQSSVQVWIASTNGVVEYETPAGEEKGSTTNSITIKNLKNTETFSVIAKQVAGNSQPTALVTKIDEANI	574
AA319092	ISQKTEPPINVKNTWVNNQSSVQVWIASTNGVVEYETPAGEEKGSTTNSITIKNLKNTETFSVIAKQVAGNSQPTALVTKIDEANI	574
AA22234	ISQKTEPPINVKNTWVNNQSSVQVWIASTNGVVEYETPAGEEKGSTTNSITIKNLKNTETFSVIAKQVAGNSQPTALVTKIDEANI	574
AA319226	ISQKTEPPINVKNTWVNNQSSVQVWIASTNGVVEYETPAGEEKGSTTNSITIKNLKNTETFSVIAKQVAGNSQPTALVTKIDEANI	574
AA58578	ISQKTEPPINVKNTWVNNQSSVQVWIASTNGVVEYETPAGEEKGSTTNSITIKNLKNTETFSVIAKQVAGNSQPTALVTKIDEANI	440
AA488400	ISQKTEPPINVKNTWVNNQSSVQVWIASTNGVVEYETPAGEEKGSTTNSITIKNLKNTETFSVIAKQVAGNSQPTALVTKIDEANI	566
CA25670	ISQKTEPPINVKNTWVNNQSSVQVWIASTNGVVEYETPAGEEKGSTTNSITIKNLKNTETFSVIAKQVAGNSQPTALVTKIDEANI	574
Consensus	I qk teppinvk ntnk s s q l w stdnvgv eyeita eekes tnsititknlkntet fs iakd g p alvk	

图 2 11 株 Bt 几丁质酶 FLDs 氨基酸序列比较

4.2.4 几丁质酶结合域 (CBD): Bt 几丁质酶的 CBD 对于酶结合底物起到重要的作用, 也有一些这一区域高度保守, 特别是芳香族氨基酸, 并且在木聚糖酶、纤维素酶的相应区域都存在 (图 3)。

CBD 对于酶结合底物起到重要的作用, 也有一些几丁质酶的这个区域参与了底物的水解。

AAL17867	VTNMGSGVNFESI I K N N G T T P I K N W K L F D Y S G N L T Q V M D S K	629
AA394024	VTNMGSGVNFESI I K N N G T T P I K N W K L F D Y S G N L T Q V M D S K	641
AA317886	VTNMGSGVNFESI I K N N G T T P I K N W K L F D Y S G N L T Q V M D S K	627
AA034713	VTNMGSGVNFESI I K N N G T T P I K N W K L F D Y S G N L T Q V M D S K	641
AA319091	VTNMGSGVNFESI I K N N G T T P I K N W K L F D Y S G N L T Q V M D S K	629
AA319092	VTNMGSGVNFESI I K N N G T T P I K N W K L F D Y S G N L T Q V M D S K	629
AA21234	VTNMGSGVNFESI I K N N G T T P I K N W K L F D Y S G N L T Q V M D S K	629
AA319226	VTNMGSGVNFESI I K N N G T T P I K N W K L F D Y S G N L T Q V M D S K	629
AA58578	VTNMGSGVNFESI I K N N G T T P I K N W K L F D Y S G N L T Q V M D S K	495
AA488400	VTNMGSGVNFESI I K N N G T T P I K N W K L F D Y S G N L T Q V M D S K	641
CA25670	VTNMGSGVNFESI I K N N G T T P I K N W K L F D Y S G N L T Q V M D S K	629
Consensus	vt n m g s g v n f e s i i k n n g t t p i k n w k l f d y s g n l t q v m d s k	

图 3 11 株 Bt 几丁质酶结合区域氨基酸序列比较

并非所有的 Bt 几丁质酶都有通常的 3 个结构域。例如, Chi36 只有几丁质酶催化域, 而缺少 FLDs 和 CBD, 但是这不影响它的活性^[10], 因此 FLDs 和 CBD 并不是水解几丁质所必需的, 这种情况在其他微生物的几丁质酶中也存在。

5 Bt 几丁质酶在杀虫增效和抑制真菌方面的应用

1998 年英国学者^[17]率先用 Bt *israelensis* IP578 和 Bt *aizewai* HD133 两菌株所产生的几丁质酶对蚊幼和海灰翅夜蛾的杀虫增效作用分别进行了研究。实验运用了一种特异的几丁质酶抑制剂阿洛氮菌素 (allosamidin), 在生测系统中通过对比实验证明几丁质酶在杀虫活性上的增效作用。随后有多组学者分别证明了 Bt 几丁质酶对小菜蛾、埃及伊蚊的杀虫增效作用^[3,5,13]。Arora 等^[10]在大肠杆菌中克隆了 HD-1 的几丁质酶基因, 发现表达的几丁质酶能够增效 Bt 的营养期杀虫蛋白对斜纹夜蛾 (*S. litura*) 幼虫的毒力, 使得 LC₅₀ 降低 30%。

Bt 几丁质酶抑真菌研究目前处于初始阶段, 研究论文还很少。Moar 等^[18]诱变 Bt HD-548 后筛选出一株高产几丁质酶、广谱抑制真菌的突变菌株, 并于 2001 年申报了菌株及其基因的专利。后来, Driss 等^[4]也发现产几丁质酶菌株 Bt *kurstaki* 的发酵上清, 对黑曲霉有很强的抑制作用。有报道称绝大多数的细菌性几丁质酶属于糖水解酶 18 家族, 其主要功能是分解周围环境中的几丁质, 以满足其自身对营养的需求, 而对真菌的抑制能力较弱或无^[19]。无论杀虫还是抑真菌试验, 多数研究均采用粗几丁质酶或发酵的上清液, 因此有些学者认为, 这些杀虫和抑真菌的作用也不能排除粗酶和培养液中的其他活性成分所起的作用。

总之, 该方面的研究深度和广度都不够, 缺乏系统的研究论文。

6 目前存在的问题和展望

Bt 几丁质酶的研究与应用处于初始阶段, 缺少具有深入和系统的研究结论。目前在研究中要

注意的问题有以下几方面。首先,需要筛选高产几丁质酶的Bt菌株。在已报道的Bt菌株中,其几丁质酶的活性与其他芽孢杆菌相比并不是很高。另外需要加强Bt几丁质酶杀虫增效及抑制真菌方面研究,进一步明确几丁质酶的作用。其次,要对Bt几丁质酶的表达方式进行研究,以确定其是诱导型酶还是组成型酶,以及Bt几丁质酶的合成是否与传统Bt发酵工艺相吻合。总之,苏云金芽孢杆菌几丁质酶的应用基础研究还需要更加系统和深入。

参考文献

- [1] 郑爱萍,李平. 中国生物工程杂志, 2002, 40: 75~79.
- [2] 邱立友,王明道,戚元成,等. 微生物学通报, 2006, 33(2): 58~62.
- [3] Wiwat C, Thaitanun S, Pantuwatana S, et al. Journal of Invertebrate Pathology, 2000, 76: 270~277.
- [4] Driss F, Kallassy-Awad M, Zouari N, et al. Journal of Applied Microbiology, 2005, 99: 945~953.
- [5] Liu M, Cai Q X, Liu H Z, et al. Journal of Applied Microbiology, 2002, 93: 374~379.
- [6] Rojas-Avelizapa L I, Cruz-Camarillo R, Guerrero M I, et al. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 1999, 15: 299~308.
- [7] 林毅,关雄. 生物技术, 2004, 14(3): 1~2.
- [8] 李力,黄胜元,关雄. 中国病毒学, 2000, 15: 94~97.
- [9] 祁红兵,刘屹,李红敬. 信阳师范学院学报(自然科学版), 2003, 16(1): 42~44.
- [10] Arora N, Ahmad T, Rajagopal R, et al. Biochemical and Biophysical Communications, 2003, 307: 620~625.
- [11] 孙胜利,喻子牛,贾新成. 微生物学杂志, 2002, 22(5): 47~50.
- [12] Barboza-Corona J E, Nieto-Mazocco E, Velázquez-Robledo R, et al. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(2): 1023~1029.
- [13] Thamthiankul S, Suan-Ngay S, Panbangred W. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 56: 395~401.
- [14] 钟万芳,姜丽华,阎文昭,等. 遗传学报, 2003, 30(4): 364~369.
- [15] Lin Y, Guan X. Biotechnology Letters, 2004, 26: 635~639.
- [16] Henrissat B, Bairoch A. Biochem J, 1993, 293: 781~788.
- [17] Sampson M N, Gooday G W. Microbiology, 1998, 144: 2189~2194.
- [18] William J M, Auburn A L. 2001, Patent No. US 6, 280, 722 B1.
- [19] 陈少波,吴根福. 科技通报, 2004, 20(3): 258~262.

• 科技信息 •

堆肥生物技术治理废油泥的研究

在本刊2006年33(3):23已报导发展堆肥生物技术治理农村有机废弃物。这里介绍堆肥生物技术治理废弃油泥的研究成果。俄罗斯喀山大学研究人员对石化生产中废弃的油泥(含有沥青、树脂、苯酚、二甲苯等有毒或致癌性的碳氢化合物)进行了治理的研究。用化学方法清除这些废弃油污是解决不了这一难题,而用堆肥生物技术途径以治理带来机会,即某些特定微生物在治理油污过程中起重要作用,如木屑作为填充物含有某些特定微生物,通过它们的分解吸收,清除转化油泥中污染物,同时使这些特定微生物能有效维持生命活力;还得向堆积物中洒些微生物所需的“养料”,其中如聚丙烯化合物生产中所产生的各种废弃物,以满足这些特定微生物的“嗜好”。部署就绪后,在这些堆积物中通风以强化微生物的活动,并在堆肥场底层通过一管子收集废液;如此的堆肥1.5年后,油泥中的碳氢化合物含量由最初的96g/Kg降至12g/Kg,其中多环芳烃减少90%,这样,从原来的有毒害环境基本上转为无害化;所有这些含油泥堆积物变为可培植的土壤,为种植蔬菜如水萝卜等开辟新基地,生长的蔬菜的安全性还得监测。从目前试验研究结果看来,这项堆肥生物技术综合治油污是有效的,大大缩短时间,使其无害化,净化受污染的土壤,使其恢复肥力,能正常地服务农业以安全生产。这里面还有些问题需要进一步探究:(1)废油污堆肥治理起主要作用是哪些解烃微生物?(2)起综合治理油污微生物又是哪些?(3)代谢油污(含油泥)的中间产物的残留,其安全性监测以及何种微生物继续起作用呢?(4)经治理后去污土壤的结构性(肥力)恢复到何种水准?要不另一类有益微生物以提高土壤肥力呢?所有这些问题需要经多年的重复性实验探究,以确保农业生产安全。