

拟除虫菊酯类农药降解菌及降解酶的研究概况

王兆守^{1,3,4*} 刘丽花^{1,2} 陈小兰² 邵宗泽⁴

(1. 厦门大学化学化工学院化学工程与生物工程系 厦门 361005)

(2. 厦门大学化学化工学院化学系 厦门 361005)

(3. 厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室 厦门 361005)

(4. 国家海洋局第三海洋研究所海洋生物遗传资源重点实验室 厦门 361005)

摘要: 拟除虫菊酯类农药目前已成为我国出口的蔬菜、水果中主要的 3 类农药残留之一, 引起急慢性中毒事件也越来越多, 对人类、水生生物和自然环境造成很大危险。而农药生物降解作为去除农药污染的有效手段, 逐渐成为环境科学研究的热点。重点综述了拟除虫菊酯类农药降解菌的分离、降解酶的提取、纯化、降解机理、固定化研究, 并对以后要解决的问题进行了展望。

关键词: 拟除虫菊酯, 降解菌, 降解酶, 纳米材料, 固定化

The Research Survey of the Degrading-bacteria and Degrading-enzyme of Synthetic Pyrethroid Insecticides

WANG Zhao-Shou^{1,3,4*} LIU Li-Hua^{1,2} CHEN Xiao-Lan² SHAO Zong-Ze⁴

(1. Department of Chemical and Biochemical Engineering, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005)

(2. Department of Chemistry, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005)

(3. State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005)

(4. Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, Third Institute of Oceanography State Oceanic Administration, Xiamen 361005)

Abstract: Synthetic pyrethroid insecticides have become one of the three major kinds of pesticide residues in the exported vegetables and fruits in China nowadays. They also caused more and more acute or chronic poisoning affair and do great damage to human beings, aquatic biology and natural environment. As an efficient way to remove pesticides pollution, the biodegradation of pesticides has gradually become the hot issue in the field of environmental sciences. The study on the separation of degrading-bacteria and the extraction, purification, mechanism and immobilization of the degrading-enzyme of pyrethroids is reviewed in this paper. And the problems under resolved in the future work are also prospected.

Keywords: Synthetic pyrethroid insecticides, Degrading-bacteria, Degrading-enzyme, Nanomaterials, Immobilization

基金项目: 福建省青年科技人才创新项目(No. 2007F3094); 厦门大学引进人才科研启动费项目(No. 0000-X071C3); 厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室开放基金(No. MEL0603); 国家海洋局近岸海域生态环境重点实验室开放基金(No. 200702); 国家海洋局第三海洋研究所海洋生物遗传资源重点实验室开放研究基金(No. HY200601)

* 通讯作者: Tel: 0592-2186195; ✉: wzs@xmu.edu.cn

收稿日期: 2007-12-25; 接受日期: 2008-02-30

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

1947年 La Forlge 合成第一种拟除虫菊酯类农药-丙烯菊酯(allethrin), 20世纪60年代世界范围内掀起了研究开发拟除虫菊酯的热潮, 但是这些拟除虫菊酯(如胺菊酯、苜味菊酯等)对光不稳定, 只能用于室内防治害虫, 不能在野外使用。自从1973年合成了第一种对光稳定的拟除虫菊酯类杀虫剂苯醚菊酯之后, 此类农药不断发展壮大, 并且结构也变化多样, 至今已有70多个品种^[1]。2003年世界拟除虫菊酯杀虫剂的销售量为13.0亿美元, 列杀虫剂第二位, 较2002年的12.7亿美元上升了2.36%; 有人预测到2008年拟除虫菊酯杀虫剂的销售量将达14.9亿美元, 比2003年上升12.7%, 拟除虫菊酯杀虫剂将位居杀虫剂市场之首^[2]。

但是曾一度被人们认为低毒、使用安全的拟除虫菊酯类农药, 近年来相关研究表明, 此类农药有蓄积毒性, 人长期接触会引起慢性疾病^[3,4], 有致癌、致畸、致突变的危险^[5,6]; 另外对鱼类、蛙类等水生生物有很高的毒性^[7]。而以微生物为主体的生物修复技术可用于降解各种有机污染物^[8], 具有高效、安全、无二次污染、费用低等优点, 所以, 生物修复可用于降解、去除拟除虫菊酯类农药残留。

生物修复技术是指利用天然存在或特殊培养的微生物, 在可调控环境条件下, 通过微生物的降解或生物转化, 把有害污染物转变或降解为无毒无害的物质^[9]。目前农药污染生物修复主要是从被农药污染的土壤中分离、筛选降解菌, 然后用于农药的生物降解、修复。其中有机磷农药和有机氯农药的降解研究相对较多, 如: 艾涛等^[10]通过富集培养和平板稀释法, 从受农药乐果污染的土壤中分离得到一株降解能力较强的降解有机磷农药的真菌菌株L3, 经鉴定为 *Aspergillus nomius*, 28℃、pH6.0条件下培养120h对乐果的降解率达29.2%, 而且120h后对辛硫磷降解率达95.3%, 降解效果很好; 马爱芝等^[11]从受六六六(HCH)污染的土壤中分离得到对六六六高度选择降解的菌株BHC-A, 经鉴定为鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas* sp.), 15d后BHC-A在土壤中对 α -、 β -、 γ -、 δ -HCH 4种异构体的降解率为84.3%, 去除明显、有效。但有关拟除虫菊酯类农药生物降解的报道还不多, 而生物降解有望成为降解此类农药很有前景的一种方法, 故对此进行了概述。

1 菌株的分离、筛选及降解特性研究

国内外在拟除虫菊酯类农药降解菌的分离、筛

选及降解特性方面的研究相对较多。丁海涛等^[12]从活性污泥的富集培养物中分离得到在通气、pH7~8、温度30℃左右能明显地去除氰戊菊酯、氯氰菊酯、溴氰菊酯等拟除虫菊酯类农药的菌株qw5, 降解率分别为53.8%、41.2%和61.7%; 许育新等^[13]用GC-MS研究了红球菌(*Rhodococcus* sp.)CDT3降解氯氰菊酯的最适条件, 发现碱性条件尤其是在30℃、pH8.0时降解效率最高达80%; 而且当增加碳源或其它能源时, 对氯氰菊酯有很显著的降解效果。王兆守等^[14]从茶叶中分离到一株标号为c1f6经鉴定为假单胞菌属的菌株也可有效地降解联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯, 降解率分别为55.64%、44.56%和52.19%。Grant等^[15,16]从使用拟除虫菊酯的菜园和农田土壤的混和土样中分离出两株优势菌: 荧光假单胞菌和普城沙雷菌, 前者细胞生长及对氯氰菊酯和氟氯苯菊酯的降解比后者更快, 对拟除虫菊酯类农药的耐受性也更强。用分离到的菌株处理含有氯氰菊酯的绵羊蘸洗液, 在25℃、80r/min条件下培养14d, 对250mg/L的氯氰菊酯去除率约为66.7%。

2 农药降解酶的提取及粗酶研究

实验中常用的酶是粗酶。粗酶是指直接从生物体内提取出的酶, 其制备方法为: 首先培养待测的细胞或微生物等, 接着加入缓冲溶液在冰浴中匀浆, 离心取上清液可得。虞云龙等^[17]测定了降解菌(*Alcaligenes* sp. YF11)粗酶在pH5.0~pH10.5降解杀灭菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯、溴氰菊酯、氯菊酯、三氟氯氰菊酯均具有降解活性。洪永聪等^[18]研究表明, 蜡状芽孢杆菌TR2粗酶液对氯氰菊酯在35℃、pH8.0最佳条件下降解率最高, 20min的降解率达84.6%。西班牙Sogorb等^[19]研究用酶对拟除虫菊酯类农药进行脱毒和解毒, 发现酯键的水解将导致拟除虫菊酯类农药的解毒。但粗酶的研究还不足以准确反映酶学的特性, 为了进一步深入研究, 有必要进行酶的分纯化。

3 农药降解酶的纯化

Malony等^[20]通过离子交换层析、凝胶过滤层析等方法从蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus* SM3)中分离纯化了氯菊酯酶(permethrinase)。在37℃、pH7.0条

件下, 该酶的活性最强, 而且不需要任何辅酶或辅因子。林淦等^[21]从恶臭假单胞菌 CP-1 中提取粗酶, 以 0.005 mol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 溶液为洗脱液, 经 DEAE-52 阴离子交换层析和 CM-52 阳离子交换层析两步纯化酯酶, 结果表明, 比活力由最初的 15.0 U/mg 分别提高到 55.4 U/mg 和 85.0 U/mg; 纯化倍数和最终回收率分别为 5.67% 和 90.6%, 纯化效果较好。测定其对甲氰菊酯的降解作用, CP-1 菌株细胞培养 60 h 提取的降解酶的酶活力最大。但国内外已有的降解酶研究没有涉及到特定酶所参与的特定降解步骤, 对参与具体降解步骤的酶的种类及特性的研究尚未阐明。

4 降解机理

微生物具有降解活性主要是因为它体内存在各种酶。其中酯酶是一类很重要的酶, 多数情况下属于关键酶, 广泛地分布于脊椎动物的各种组织和血清、昆虫、植物、细菌及真菌中。它具有酶的通性, 为具有选择性的生物催化酶, 且只水解与酯有关的物质, 使酯键断裂, 所以可以催化降解多种含酯键农药: 有机磷农药^[22]、氨基甲酸酯类农药^[23]、拟除虫菊酯类农药^[18]等。而酯酶水解拟除虫菊酯类农药的通式见图 1:



图 1 酯酶水解拟除虫菊酯类农药的通式

Fig. 1 Formula for the course of esterase hydrolyzing pyrethroids

虞云龙等^[24]采用 GC-MS 测定杀灭菊酯降解产物来推断拟除虫菊酯类农药的降解途径, 结果发现杀灭菊酯经 *Alcaligenes* sp. YF11 培养降解 12 h 后可以检测到 C 和 D 化合物的峰(C 和 D 化合物分子结构式见图 2), 而降解到 24 h 后就观察不到 C 和 D 的存在了, 由此可判断 C 和 D 为中间产物, 推断 *Alcaligenes* sp. YF11 降解杀灭菊酯属于矿化作用。Paingankar 等^[25]从城市汽车仓库土壤中分离出一种微生物, 测定其对丙烯菊酯的降解, 利用 GC-MS 分析产物, 推断降解途径。随着丙烯菊酯逐渐降解, 生成了不同的物质, 培育 48 h 丙烯菊酯主要降解成含量为 20% 的化合物 D(2-Ethyl-1,3-dimethyl cyclo-

pent-2-ene-carboxylic acid)、含量为 19% 的化合物 E [Cyclopropanecarboxylic acid 2,2-dimethyl-3-(2-methyl-1-propenyl)] 和含量为 0.12% 的化合物 G[2-Propenal (1,1-dimethyl ethyl)-methyl]等; 72 h 后各物质含量都有提高, 只有化合物 G[2-Propanal (1,1-dimethyl ethyl)-methyl]没有检测到, 可以推测化合物 G 为中间产物。由以上研究可知, 降解机理方面尽管相关学者进行了一定的研究, 但总体上说, 国内外对降解途径中酶催化产生的中间代谢产物、降解具体过程的研究还有待于进一步深入。

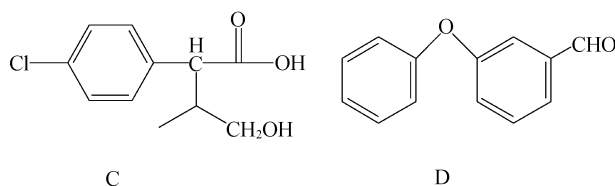


图 2 化合物 C 和化合物 D 的分子结构式

Fig. 2 Molecular structure of compounds of C and D

5 农药降解酶的固定化

目前利用农药对酶的抑制特性, 将酶固定化制备农药生物传感器的研究在检测有机磷农药方面已经很成熟: 许学勤等^[26]以大孔径强碱性阴离子交换树脂作为固定化载体, 采用离子结合法, 对植物粗酶液进行固定化, 得到的固定化酶对 10^{-7} mol/L 水平下的敌敌畏的抑制仍有明显的响应, 这一效果明显优于游离酶的抑制响应; 高慧丽等^[27]采用溶胶-凝胶法将乙酰胆碱酯酶固定在醋酸纤维膜上, 再将酶膜固定在聚四氨基钴酞菁 (p-Co-TAPc) 修饰的玻璃电极(GCE)上, 对有机磷农药(对硫磷、辛硫磷、氧化乐果)进行检测, 检测限分别可达 2.0×10^{-9} mol/L、 1.4×10^{-9} mol/L 和 1.1×10^{-8} mol/L; 刘润等^[28]利用戊二醛交联法将乙酰胆碱酯酶和牛血清白蛋白固定在羧基化多壁碳纳米管修饰玻璃电极表面, 制备了可应用于检测有机磷农药的新型生物传感器, 辛硫磷及氧化乐果的检出限达到 3.6×10^{-4} g/L 和 5.9×10^{-4} g/L, 该方法具有良好的重现性和回收率。但对拟除虫菊酯类农药降解酶的固定化研究还相对较少。

5.1 降解酶的常规固定化技术

虞云龙等^[29,30]将海藻酸钠与 *Alcaligenes* sp. YF11 降解酶液均匀混合, 再将混合物注入氯化钙溶

液中,使其交联、聚合形成凝胶,降解酶即被包埋在凝胶内部形成固定化酶,测定其对氰戊菊酯的降解率,结果显示:在 35 °C、pH8 的最佳条件下降解率为 90%~100%,降解效果很好,采用酶的固定化既可保持酶的稳定性,也可长期重复使用。但这种方法只适合实验室制备,难于大量生产。

林淦等^[31]把海藻酸钠溶液与甲氰菊酯降解酶均匀混合,注入氯化钙溶液使其交联、聚合形成凝胶,则形成内包甲氰菊酯降解酶凝胶的固定化酶,制备的固定化酶可以重复连续利用 3 次。Lineweaver-Burk 法测定出固定化酶对甲氰菊酯的 $K_m=298.13 \text{ nmol/mL}$,在 pH6.8、35 °C 的最佳条件下,固定化酶活力为游离酶活力的 80%,活性低于游离酶液。所以,为了提高酶的活性,应该努力寻找新的固定化方法。

5.2 降解酶在纳米材料中的固定化

近来随着科学技术的不断发展,纳米技术成为当今科学研究的热点^[32]。纳米材料因其尺寸小而具有很大的比表面积,粒径为 2 nm 时,表面的体积百分数增到 80%。庞大的比表面,键态严重失配,出现许多活性中心,所以,可将降解酶修饰到剩余的多活性中心,增加降解酶的稳定性。

纳米材料在催化反应中具有重要作用,在降解有机污染物方面已有很多报道。自从 1894 年报道 Fenton($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$)反应以来,更多的学者着重在降解水污染物、有机污染物方面开展相关研究^[33]。近些年在催化剂修饰方面报道也很多,如:Li 等^[34,35]将二联吡啶钌配合物修饰固定在交换树脂、NaY/沸石上催化 H_2O_2 降解罗丹明和孔雀石,研究结果表明,负载量在 0.03 时降解率达 100%。Ha 等^[36]将六精氨酸标识的酯酶有效地固定在表面羧酸化的金纳米离子上,以对-硝基苯酚丁酸酯为底物测定酶的活性。但是有一部分是非特异性吸附,而且吸附的部分只有 58%表现出酶的活性。最近一种新的固定方法,Suman 等^[37]把胆固醇氧化酶和胆固醇酯酶固定到四己基正硅酸盐溶胶-凝胶介质中测定胆固醇油酸盐,对葡萄糖、乳酸盐、尿酸和抗坏血酸选择性好,可用于血清和血液中胆固醇的测定。

纳米材料由于其特殊的表面效应和催化效应,可以修饰很多基团,在农药降解方面有广阔的应用前景。而把拟除虫菊酯类农药的降解酶固定到纳米材料上研究酶的活性还未见报道过,应加强这方面

的研究。

6 小结与展望

生物修复能有效地降解农药,具有高效、安全、费用低等优点,而农药降解酶在生物修复中起着最关键的作用。降解酶可用于多种农药的降解,效果较显著;而固定化酶可以克服游离酶的不稳定性,具有稳定性和可重复利用等优点,但是由于空间效应等的影响,使降解酶的活性受到限制。纳米材料因具有大量的表面积而存在多个位点,可以进行修饰,把降解农药的酶键合到纳米材料的表面,不仅可以提高稳定性和多次利用,而且还可以提高酶的活性,提高农药的降解速度。但在生物修复中结合纳米材料这一方面的研究还很少,成为未来要研究解决的问题。同时,微生物降解酶除了可以降解农药,还可以用来进行各种手性醇、酸、酯的对映体拆分^[38],成为今后对农药降解酶开发利用的另一个发展方向。

参考文献

- [1] 胡志强,许良忠,任雪景,等.拟除虫菊酯类杀虫剂的研究进展.青岛化工学院学报,2002,23(1):48-51.
- [2] 张一宾,张悛编.世界农药新进展.北京:化学工业出版社,2007,pp.46-47.
- [3] Al-Makkawy HK, Magdy DM. Persistence and accumulation of some organic insecticides in Nile water and fish. *Resources Conservation and Recycling*, 1999, 27(1-2): 105-115.
- [4] Kolaczinski JH, Curtis CF. Chronic illness as a result of low-level exposure to synthetic pyrethroid insecticides: a review of the debate. *Food and Chemical Toxicology*, 2004, 42(5): 697-706.
- [5] Nina G, Friedhelm D. Influence of pyrethroids and piperonyl butoxide on the Ca^{2+} -ATPase activity of rat brain synaptosomes and leukocyte membrane. *International Immunopharmacology*, 2005, 5(2): 63-270.
- [6] 薛南冬,王洪波,徐晓白.水环境中农药类内分泌干扰物的研究进展.科学通报,2005,50(22):2441-2449.
- [7] Anders C, Valery EF. Consequences of a short pulse of pesticide exposure for survival and reproduction of *Gammarus pulex*. *Aquatic Toxicology*, 2004, 67(3): 287-299.
- [8] 顾继东,王莹莹.环境激素类有机污染物的微生物降解和药物类化合物的残留问题.生态科学,2003,22(1):1-5.

- [9] 金志刚, 张 彤, 朱怀兰. 污染物生物降解. 广州: 华东理工大学出版社, 1997, pp.213-230.
- [10] 艾 涛, 王 华, 温小芳, 等. 有机磷农药乐果降解菌株 L3 的分离鉴定及其性质的初步研究. 农业环境科学学报, 2006, **25**(5): 1250-1254.
- [11] 马爱芝, 武 俊, 汪 婷, 等. 六六六(HCH)降解菌 *Sphingomonas* sp. BHC-A 的分离与降解特性的研究. 微生物学报, 2005, **45**(5): 728-732.
- [12] 丁海涛, 李顺鹏, 沈 标, 等. 拟除虫菊酯类农药残留降解菌的筛选及其生理特性研究. 土壤学报, 2003, **40**(1): 123-129.
- [13] 许育新, 李晓慧, 张明星, 等. 红球菌 CDT3 降解氯氰菊酯的特性及途径. 中国环境科学, 2005, **25**(4): 399-402.
- [14] 王兆守, 林 淦, 尤民生, 等. 茶叶上拟除虫菊酯类农药降解菌的分离及其特性. 生态学报, 2005, **25**(7): 1824-1827.
- [15] Grant RJ, Daniell TJ, Betts WB. Isolation and identification of synthetic pyrethroid-degrading bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, **92**(3): 534-540.
- [16] Grant RJ, Betts WB. Biodegradation of the synthetic pyrethroid cypermethrin in used sheep dip. *Letters in Applied Microbiology*, 2003, **36**(3): 173-176.
- [17] 虞云龙, 陈鹤鑫, 樊德方, 等. *Alcaligenes* sp. YF11 菌对杀灭菊酯的降解机理. 环境污染与防治, 1998, **20**(6): 5-7.
- [18] 洪永聪, 辛 伟, 崔德杰, 等. 蜡状芽孢杆菌菌株 TR2 的氯氰菊酯降解酶特性. 青岛农业大学学报(自然科学版), 2007, **24**(3): 185-188.
- [19] Sogorb MA, Vilanova E. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicology Letters*, 2002, **128**(1-3): 215-228.
- [20] Maloney SE, Maule A, Smith ARW. Purification and preliminary characterization of permethrinase from a pyrethroid-transforming strain of *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**(7): 2007-2013.
- [21] 林 淦, 黄升谋. 甲氰菊酯降解酶的部分纯化及其性质研究. 河南农业科学, 2005, (12): 47-50.
- [22] 金彬明, 刘佳明. 海洋微生物有机磷降解酶的纯化与性质研究. 中国微生物学杂志, 2007, **19**(1): 37-39.
- [23] 仪美芹, 于彩虹, 杨 明, 等. 鲫鱼(*Carassius auratus*)体内胆碱酯酶的组织分布及其对氨基甲酸酯类杀虫剂的敏感度. 安全与环境学报, 2006, **6**(3): 57-60.
- [24] 虞云龙, 陈鹤鑫, 樊德方, 等. *Alcaligenes* sp. YF1 菌对杀灭菊酯的降解机理. 环境污染与防治, 1998, **20**(6): 5-7.
- [25] Mandar P, Manish J, Dileep D. Biodegradation of allethrin, a pyrethroid insecticide, by an *Acidomonas* sp.. *Biotechnology Letters*, 2005, **27**: 1909-1913.
- [26] 许学勤, 徐 斐, 华泽钊. 用于有机磷农药残留快速检测的固定化小麦酯酶研究. 食品科学, 2003, **24**(5): 122-126.
- [27] 高慧丽, 康天放, 王小庆, 等. 溶胶-凝胶法固定乙酰胆碱酯酶生物传感器测定有机磷农药. 环境化学, 2005, **24**(6): 707-710.
- [28] 刘 润, 郝玉翠, 康天放. 基于碳纳米管修饰电极检测有机磷农药的生物传感器. 分析实验室, 2007, **26**(9): 9-12.
- [29] 虞云龙, 盛国英, 傅家谟. 农药降解酶的固定化及其降解特性. 应用与环境生物学报, 1999, **5**(Suppl): 166-169.
- [30] 虞云龙, 史 锋, 樊德方. 一种固定化酶对氰戊菊酯的降解特性. 农药学报, 1999, **1**(1): 74-77.
- [31] 林 淦, 韩 萍, 吴传兵. 固定化农药降解酶对受污染水体的净化作用. 安徽农业科学, 2006, **34**(17): 4371-4372.
- [32] 张立德编著. 纳米材料. 北京: 化学工业出版社, 2000, pp. 39-45.
- [33] Tao X, Ma WH, Zhang TY, et al. Efficient photooxidative degradation of organic compounds in the presence of iron tetrasulfophthalocyanine under visible light irradiation. *Angewandte Chemie International Edition*, 2001, **40**: 3014-3016.
- [34] Li J, Ma WH, Huang YP, et al. Oxidative degradation of organic pollutants utilizing molecular oxygen and visible light over a supported catalyst of $\text{Fe}(\text{bpy})_3^{2+}$ in water. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2004, **48**: 17-24.
- [35] Li J, Ma WH, Huang YP, et al. A highly selective photooxidation approach using O_2 in water catalyzed by iron(II) bipyridine complex supported on NaY zeolite. *Chemical Communication*, 2003, 2214-2215.
- [36] Ha TH, Jeong JY, Chung BH. Immobilization of hexa-arginine tagged esterase onto carboxylated gold nanoparticles. *Chemical Communication*, 2005, 3959-3961.
- [37] Suman S, Rahul S, Malhotra BD. Immobilization of cholesterol esterase and cholesterol oxidase onto sol-gel films for application to cholesterol biosensor. *Analytica Chimica Acta*, 2007, **582**(2): 335-343.
- [38] 赵玉巧, 许建和. 不动杆菌生物合成新型羧酸酯酶的摇瓶培养条件优化. 高校化学工程学报, 2005, **19**(4): 523-526.