

农药的微生物降解

郑 重

(浙江农业大学植保系)

摘要 本文讨论农药微生物降解的研究进展,包括降解微生物的分离和筛选技术,以有机氯和有机磷农药为代表的农药降解途径,微生物降解农药的作用机理,降解代谢中的酶促反应类型,并介绍微生物降解在农药三废处理中的应用。

农药微生物降解的研究开始于四十年代末^[1]。六十年代中期由于大规模施用化学农药所带来的环境问题日益明显,这一领域日趋活跃。通过近二十年来的工作,已经肯定了在水环境和土壤的农药降解中微生物起重要作用;分离到一批能降解或转化某种农药的微生物类群;研究了生物降解农药的主要作用方式及酶促反应类型,以及各类化学农药被微生物降解的分解规律。

微生物降解农药的实用前景也推动了这一研究的深入。农药在生产、贮存、销售和使用过程中所产生废药和废水的处理和去毒令人关注。特别是在田间机械化施药时,因器械清洗和剩余药液而产生大量低浓度农药废水,如不加处理则严重污染水体。但这些废水分散于各个农场,处理困难。这方面已提出了许多方法,生物净化是其中之一^[2]。生物处理设备简单而去毒效果较为彻底,很适用于农药废水的分散就地处理,但微生物作用的目标农药专一,又易受环境条件影响,因而有局限性。目前应用生化法处理农药废水的实用程度还有限,有必要进一步研究降解微生物菌株的筛选诱变,通过基因工程技术建立新菌株,或者通过降解酶系统及固定化酶技术,为处理农药废水提供更有效的手段^[3]。本文简述微生物降解农药的研究进展。

一、降解农药微生物的分离和筛选

为获取降解农药的微生物菌株,可从现

已收藏的菌种中筛选,亦可从土壤、水体或污水等污染环境直接分离筛选或经富集培养获得。

降解农药微生物的富集培养有分批培养、连续培养和土柱渗滤环流等多种手段,其中,用恒化器作连续培养是一种有效的方法^[4]。用目标农药作为恒化器培养中的生长限制底物,在这种选择压的作用下可筛选到能降解该农药的微生物菌株,或诱发出有降解能力的突变菌株^[5]。

降解微生物的富集现象在自然土壤中也存在。一种土壤长期施用某种农药使得降解微生物逐渐富集,当以后再施入这种农药时其分解大大加快。这是一些除草剂在连续施用该药的土壤中效果下降的原因。在降解微生物的分离中,这类土壤是很好的样品来源。

已经报道的对某种农药有降解能力的微生物有细菌、放线菌、真菌等,大多来自土壤微生物类群。细菌由于其生化上的多种适应能力以及容易诱发突变菌株从而占了最主要的位置。其中许多菌株来自假单胞菌属(*Pseudomonas*)^[6]。但是,目前还很难预见某一种或某一属的微生物能专门转化某一类农药。因为即使在一个种内只要菌株不同也足以影响它对农药的降解能力。

值得注意的是,在实验室往往用微生物的纯培养菌株作降解的研究。但事实表明许多混合的微生物群体降解效率更高,降解更

彻底。这也更接近于自然生态条件下混合微生物群体共同作用使某些农药降解的实际。因此,在降解微生物的富集培养中不应忽视利用在一定生态条件下(如恒化器中以目标农药为限制底物)稳定的微生物群体^[7]。

二、农药的微生物降解途径

已有的研究涉及到各种不同化学结构的农药类群,特别是大量使用的有机氯、有机磷、氨基甲酸酯类杀虫剂,苯氧羧酸类除草剂等。本文重点论述有机氯和有机磷杀虫剂的微生物降解。

对有机氯杀虫剂的微生物降解曾有广泛的研究。以 DDT 为例,许多微生物可使 DDT 脱 HCl 转化为 DDE。在淹水土壤的厌氧条件下,一些微生物可将 DDT 脱氯还原为 DDD。但 DDD 依然有生物毒性,而且相当稳定,对于环境仍不安全^[8]。国内外对 BHC 也有大量的工作,肯定在淹水土壤的厌氧条件下, γ -BHC 的微生物降解比较快,主要通过脱 HCl 形成多氯环己烯和多氯苯等代谢产物^[9]。

有机磷酸酯类农药在土壤和水环境中分解很快。现已确认这一过程以微生物作用为主^[8]。微生物降解主要是对 P-O-烷基或 P-O-芳基的水解。部分有机磷农药的生物转化还包括氧化和还原过程。如一些带硝基的农药可还原为带氨基的形式。

由于农药的生物降解受到环境条件和降解微生物种类的影响,因而目前还难以预见每一类农药的生物代谢途径,而只能总结出一些大概的反应过程。比如已经知道许多真菌转化某种农药往往先从羟基化开始,但这种羟基化可能发生在芳环的不同位置或者在侧链上,在各种真菌之间又不相同^[10,11]。因此,对各类农药生物降解途径的认识还远远不够。

但是,这类研究已经给我们不少启示。例

如以农药结构对微生物降解的抗性为依据,设计一些其持久性对维持药效和环境安全都合适的农药。以苯氧羧酸类除草剂为例,苯环上连接的氯原子数目和位置影响生物降解的难易程度。苯环上取代氯的数目越多,降解越困难;以氯的位置而言,苯环上间位取代的类型最难降解,因此 2,4,5-T 的生物降解比 2,4-D 要难得多。从苯氧羧酸类的脂肪酸侧链来看,凡属 ω -苯氧基羧酸的侧链都很容易经 β -氧化而脱去,但 α -苯氧基羧酸的侧链代谢则不容易。

三、在土壤和水环境中微生物对农药的作用方式

这种作用可分为两大类:一类是微生物直接作用于农药,大多由酶促反应引起,也称为微生物的农药代谢,一般所说的农药微生物降解多属此类。另一类是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。下面说明四种常见的作用方式。

(一) 矿化作用 矿化是有机化合物在环境中完全分解为无机产物,也就是彻底降解。要证明这一现象一般有两种方法。一是以 ^{14}C 标记农药的主体结构(如芳环),在封闭的实验体系中加标记农药作微生物培养。如果可以收集到 $^{14}\text{CO}_2$,说明标记农药完全分解,证明这种微生物可利用这种农药为碳源而生长。另一种方法是以供试农药为唯一碳源来培养微生物时可见到某种微生物群体的增长,而且这种增长与培养液中农药降解的加快有明显的相关性。由于矿化作用能使农药彻底分解,避免产生对环境有潜在威胁的中间产物,因而是农药生物降解最理想的方式,为降解微生物筛选的首要目标。

(二) 共代谢作用(辅代谢) 共代谢是微生物以某种基物为能源生长时,能同时代谢某些化学物质,但这种微生物不能以这些化学物质为能源,它对这类物质的代谢只是部分地改变了它们的结构,产生与母体相近似

的中间产物,结果是农药的转化,并没有完全降解^[8,10]。原因是在多步骤的酶促反应过程中,各种酶对底物的专化性不同。如果第一步反应的酶底物专化性程度低,而后的酶专化性强,那么在生长底物被多步反应彻底分解时,某些化学异物的分子只是部分地被改变,而不能被后来专化性强的酶所降解^[12]。但是,在自然条件下,共代谢产生的中间产物往往可被其他微生物种群或物理、化学因子所降解。而且共代谢在农药的微生物代谢过程中十分常见,因而是微生物作用于农药的重要方式。

(三) 生物浓缩或累积作用 这是指微生物菌体细胞通过吸附和吸收的过程积聚环境中的残留农药^[13],主要发生在水环境中。一般可用生物浓缩系数作为指标,它是微生物菌体内某农药的浓度与培养液中(或生长的水环境中)该农药浓度之比^[13]。由于微生物种类,农药种类以及培养环境的差异,在已经报道的微生物累积农药的实例中,浓缩系数的大小可由几百到几万不等^[13]。微生物菌体对农药的吸收最初是被动的吸附。这一过程很快,因为许多农药是亲脂的,很容易与细胞膜类脂结合,而后被吸附的农药再被菌体细胞吸收。这一过程则与微生物代谢活动有关,而且农药在被吸收的同时往往也可能被转化^[7]。

在研究微生物对农药的直接作用时,要注意实验室的结果可能代表不了自然条件下的代谢规律。比如矿化作用的表现常常受农药浓度影响。有的微生物只是在环境中的低浓度下才会表现矿化作用,而在实验室相对高浓度的培养条件下可能只能观察到共代谢的转化作用^[14]。

(四) 微生物对农药的间接作用 由于微生物的作用改变了微环境中的 pH,降低土壤的氧化还原电势,造成还原的环境,从而引起次生的化学降解。这在淹水的土壤中有不少例证^[10]。

四、农药微生物代谢的酶促反应类型

(一) 氧化 氧化是微生物降解农药的重要酶促反应。其中有多种形式,如:羟基化、脱烷基、 β -氧化、脱羧基、醚键开裂、环氧化、氧化偶联、芳环或杂环开裂等。以羟基化来说,微生物转化农药的第一步往往引入羟基到农药分子中,结果这种化合物极性加强,易溶于水,就容易被生物作用。羟基化过程在芳烃类化合物的生物降解中尤为重要,苯环的羟基化常常是苯环开裂和进一步分解的先决条件^[10,11]。在氧化反应中,脱烷基也是一种重要的降解去毒过程。苯胺类的 N-烷基和其他农药芳环上的烷基常常是微生物作用的第一个位点。氧化反应在加氧酶类的作用下进行。加氧酶可分两类:一类是单加氧酶,又称双功能氧化酶,需要 NAD^+ 或 NADP^+ 为辅酶;另一类是双加氧酶^[15]。加氧酶类的作用需要分子氧存在。

(二) 还原 在氯代烷烃类农药 DDT、BHC 的生物降解中常是还原性去氯反应。在厌氧条件下 DDT 还原脱氯与细胞色素氧化酶和 FAD 有关^[10]。微生物的还原反应还常使带硝基的农药还原成氨基衍生物,如硝基苯还原成苯胺类,在某些带芳环的有机磷农药代谢中常见。

(三) 水解 在氨基甲酸酯、有机磷和苯酰胺一类具有醚、酯或酰胺键的农药类群中,水解是常见的。有酯酶、酰胺酶或磷酸酶等水解酶类参与。由于许多非生物因子,如 pH、温度等也可以引起这类农药水解,因此微生物的酶促水解作用一般只有在分离到这类酶后才能确认。水解酶多为广谱性酶,在不同的 pH 和温度条件下都很稳定,又无需辅助因子,水解产物的毒性大大降低,在环境中的稳定性也低于其母体。因此,水解酶是农药生物降解中最有实用前景的酶类^[16]。

(四) 合成 生物降解中的合成反应可分缩合和接合两类。在土壤中通过微生物活动

而进行缩合十分常见,如苯酚和苯胺类农药及其转化产物在微生物的酚氧化酶和过氧化物酶作用下,可与土壤腐殖化过程中的腐殖酸类物质缩合,从而使这类化学异物结合到土壤的腐殖质中^[10]。这种现象对环境的后果尚难预料。微生物引起的接合反应常见的有甲基化和酰化反应。如苯酚类经甲基化成甲氧基苯而失毒,苯胺类经酰化成酰替苯胺^[10]。

五、农药微生物降解的实用化探索

(一) 通过基因工程技术构建高效降解菌

这一工作的基础是对降解质粒的研究。已经对 2,4-D 的降解质粒做了不少研究^[6]。这些降解质粒大多来自产碱菌属(*Alcaligenes*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)质粒编码的降解底物是以 2,4-D 为代表的氯代芳烃类。这类降解质粒的宿主范围广,几乎可在所有革兰氏阴性菌中转移。但这种质粒转移只能通过细菌接合的方式进行。要构建有高效降解能力的遗传工程菌株可通过降解质粒的转移构建多质粒菌株,筛选带有突变质粒的突变菌株以及用降解基因构建杂种质粒并使其在合适的宿主菌中表达。这方面突出的例子是 Kellogg 等^[17]通过几种降解质粒的相互作用筛选出一种质粒突变菌株,可以以 2,4,5-T 为唯一碳源生长。相比之下,用常规的培养法却一直未能分离到可利用 2,4,5-T 为唯一碳源的降解菌株。

但是,构建农药降解工程菌的研究还面临不少问题。由于担心这类工程菌对环境会有意想不到的影响,因此要想进入实用阶段必需十分谨慎。其次,对降解微生物类群及降解质粒的遗传学问题还需要更深入的研究。

(二) 农药降解酶制剂和固相酶反应器的研制

如果用微生物所产生的酶来处理农药废水而不是直接使用微生物菌株,那么对环境造成潜在威胁的风险即可避免。而且研究表明,一些酶比产生这类酶的微生物菌体更

能忍受异常的环境条件。比如,对硫磷水解酶可耐受高达 10% 的盐浓度,1% 的溶剂浓度和 50℃ 的温度,而产生这种酶的假单胞菌在这种条件下是不能生长的^[16,18]。因此认为用酶处理农药废水更有可能。水解酶在有机磷和氨基甲酸酯农药废水去毒处理中,由于其稳定,无需辅酶,水解产物易分解的特性最有希望进入实用化。已经在实验室将对硫磷水解酶固定在载体上做成固相酶反应器,1 分钟内即将对硫磷的浓度从 1ppm 降到 500ppb,连续使用 70 天仍保持酶活^[15,19]。

(三) 采用生物降解与其他降解机制相结合的降解系统

Karns 等^[15]报告了杀虫剂蝇毒磷(coumaphos)的降解处理模式。蝇毒磷在美国墨西哥边界用于牲畜的卫生处理。每年产生废水约 57 万立升,含有效药量 1500-3000μg/ml。目前处理方法是将废水贮放在混凝土砌的蒸发坑内。自然环境下该药半衰期达 300 天,因此需要更有效的处理方法。现发现有一种黄杆菌(*Flavobacterium sp.*)产生的对硫磷水解酶可使蝇毒磷迅速水解,其产物对紫外光照引起的臭氧化十分敏感。因而微生物水解加臭氧化处理共计 7 小时即将蝇毒磷完全分解。这一结果也在田间试验中证实。因此认为,将生物降解作为去毒处理的步骤之一,结合其他物理化学降解方法也许是一种有效的手段。

参 考 文 献

- [1] Audus, L. J., *Plant and Soil*, 3(2), 170(1951).
- [2] Dillon, A. P., 张铸等译, 农药的三废处理和去毒, 57-75 页, 化学工业出版社, 北京, 1987.
- [3] Nicholas, R. B., *ASM News*, 53(3), 138 (1987).
- [4] 郑重, 微生物学通报 16(2), 111(1989).
- [5] Cook, A. M. et al., *Experientia* 39(11), 1191 (1983).
- [6] Pemberton, J. M. and E. C. Wynne, Genetic engineering and biological detoxification/degradation of insecticides, In *Insecticide Microbiology*, R. Lal ed., pp. 147-168, Springer, Berlin, 1984.

- [7] Liu, S.-Y. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**(3), 733 (1989).
- [8] Barik, S., Metabolism of insecticides by microorganisms, In *Insecticide Microbiology*, R. Lal ed., pp. 87—130, Springer, Berling, 1984.
- [9] Tu, C. W., *Arch. Microbiol.*, **103**(3), 259 (1976).
- [10] Bollag, J.-M., Microbial metabolism of pesticides, In *Microbial Transformation of Bioactive Compounds* Vol.2, J. P. Rasazza, ed., pp. 125—168, CRC, Roca Raton, 1982.
- [11] Zheng, Z. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**(1), 66 (1989).
- [12] Alexander, M., *Science*, **211**, 132 (1981).
- [13] Lal, S., Microbial accumulation of insecticides, In *Insecticide Microbiology*, R. Lal ed., pp. 61—85, Springer, Berling, 1984.
- [14] Wang, Y.-S., *J. Agric. Food Chem.*, **33**(3), 495 (1985).
- [15] Karns, J. S. et al., Use of microorganisms and microbial systems in the degradation of pesticides, In *Biotechnology in Agricultural Chemistry*, H. M. LeBaron et al. eds., pp. 156—170, ACS, New York, 1987.
- [16] Munnecke, D. M., *Biotechnol. Bioeng.*, **21**(12), 2247 (1979).
- [17] Kellogg, S. T. et al., *Science*, **214**, 1133 (1981).
- [18] Munnecke, D. M., *J. Agric. Food Chem.*, **28**(1), 105 (1980).
- [19] Talbot, H. W. et al., *Biotechnol. Lett.*, **4**(2), 209 (1982).

(收稿日期: 1989 年 3 月 21 日)

城市污水再用于工业的研究*

王 占 生

(清华大学环境工程系)

摘要 城市再用污水的目标应先低后高以解决共同水质要求, 本文选择悬浮质与溶解性有机物开展过滤与微生物降解技术的试验研究, 并推出纤维球滤料过滤与生物填料接触氧化深度处理的方法。

污水经处理后再用于工业是水的又一次使用, 可节省大量水资源, 有利于工业的发展。以北京、天津为例, 工业万元产值取水量在 200m³ 以下, 则再用 1m³ 污水, 即可间接产生 50 元的工业产值。

本文主要研究再用于工业的污水处理中带有普遍性的问题。再用水水质指标概括起来主要是 pH 值、硬度、悬浮物与 COD (或 BOD 值), 其中 pH 值与硬度如有需要, 可另行处理。本文着重研究悬浮物与 COD 或 BOD 值。悬浮物会带来沉积、堵塞问题, COD (较 BOD 容易测定) 则产生生物垢 (因反映了能被强氧化剂氧化的无机物与有机物)。此外, 也要考察其他水质指标, 如氨氮与磷排入水体会造成富营养化, 但欲专门处理, 则要增加较多投资, 所以本文不作详细研究, 将来应在二级处理的同时采用厌氧-缺

氧-好氧系统去除。

美国水道协会 (AWWA) 提出的有关工业用水的水质标准中, 作为冷却水的浊度应 <50 度, pH 在 4—10 之间, 总硬度 <50 mg/L。

日本再用污水于补充工业循环冷却水与公共用水实例很多, 但也没有一个统一的水质标准, 一般都因地而异、因工业而异。

二级处理水水质一般为: SS20~30、BOD15~25、COD30~60、氨氮 (以 N 计) 15—25、磷 (以 P 计) 6—10 (以上单位皆为 mg/L)。从国外的经验看, 二级处理出水稍作进一步处理就可回用于补充冷却水。深度处理 (二级处理后还需要的处理) 的方法有:

* 参加工作的还有卜城, 张晓健, 马金, 邸凯迎, 张鸿海, 徐袁春等同志。

in general survey of technical chemicals and investigation of potential pollution sources.

Determination of ^{90}Sr , ^{137}Cs , Ca and K in Milk by Radiochemical and Chemical Method. Sha Lianmao, Wang Zhihui, Wang Fenghua (China Institute for Radiation Protection, Taiyuan): *Chin. J. Environ. Sci.*, **11**(2), 1990, pp. 51

A method for determining low-level radioactive nuclides in milk for intercomparison by WHO-IRC is presented in this paper. The results show that the values of ^{90}Sr , ^{137}Cs , Ca concentration appear to be agreement with IRC reference values. Some problems concerning the effect on analytical accuracy have been discussed as well.

A Survey of $^{239+240}\text{Pu}$ and ^{238}Pu in Main Foodstuff of China. Han Shouling et al. (Liaoning Provincial Institute of Labour Hygiene, Shenyang): *Chin. J. Environ. Sci.*, **11**(2), 1990, pp. 55

Radioactive plutonium isotopes in 16 samples of the main foodstuff collected from nine provinces and autonomous regions of China have been determined by means of radiochemical separation, electrodeposition and alpha-spectrum measurements. The results show that specific radioactivities of both $^{239+240}\text{Pu}$ and ^{238}Pu in the foodstuff vary from 1×10^{-4} Bq/kg to 1×10^{-3} Bq/kg, the concentrations of ^{238}Pu in foodstuff are less than $^{239+240}\text{Pu}$. However, by way of exception, the specific radioactivities of $^{239+240}\text{Pu}$ and ^{238}Pu in tea samples are 7.41×10^{-3} Bq/kg and 1.33×10^{-3} Bq/kg respectively.

Advances of Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR) in Environmental Chemistry and Its Methodology. Bai Naibin (Research Center for Eco-Environmental Sciences, Academia Sinica, Beijing): *Chin. J. Environ. Sci.*, **11**(2), 1990, pp. 62

QSAR is a useful means in safety assessment of chemicals. This article describes its application background, fundamental principles, evolution, conception model, mathematical model and algorithm, from which the author and his assistants have developed a software package of applied quantum chemistry with a purpose of producing the molecular structure descriptors. In the software a chemical substance toxicity database has been carried out so as to acquire lots and lots of biological activity data of chemicals, and in order to set up the relationship between molecular structure and its biological activity, a pattern recognition software has been applied. Finally, the perspective of QSAR research in environmental chemistry has

been discussed in this article.

Microbial Degradation of Pesticides. Zheng Zhong (Zhejiang Agricultural University, Hangzhou): *Chin. J. Environ. Sci.*, **11**(2), 1990, pp. 68

A general description on microbial degradation of pesticides is given in this review. The subject covers following aspects: isolation of the microbe-degraders, biodegradation pathway of some pesticides, and characteristics of microbial metabolism and involved enzymes. The practical approaches to biological detoxification of pesticides have also been discussed.

On the Environmental Characteristics and Changes in Northwestern Arid Area of China. Ma Ruijun (Department of Geography, Northwest Normal University, Lanzhou): *Chin. J. Environ. Sci.*, **11**(2), 1990, pp. 76

With a comparative approach, the author discusses theoretically the arid causes in the northwestern area of China from the viewpoints of its formation course, space structure, heat and moisture conjunction, natural factors and human activities on the environment as well.

Fuzzy Comprehensive Assessment of Environmental Quality by Computer Performance. Liu Hui, Wang Feiyue (Wuhan University): *Chin. J. Environ. Sci.*, **11**(2), 1990, pp. 81

This paper presents a fuzzy mathematical model designed for comprehensive assessment of environmental quality by means of IBM PC computer. The model has been applied successfully to the atmospheric environmental assessment in Wuhan.

Radioactive Impact Assessment of Returning the Coal-Ash Storage Sites of the Power Stations into Farmland. Wang Bing (Society of Environmental Protection of Handan Prefecture, Hebei Province): *Chin. J. Environ. Sci.*, **11**(2), 1990, pp. 84

The radionuclide contents of coal ash from the power stations in Handan Area are higher than that in the local soil except ^{40}K . However, this situation doesn't affect the sites to be reformed into farmland. The results of detection show that radionuclide contents in wheat, maize and rice which were planted on the farmland are not different from those planted on ordinary ones, and the additional radiation dosage received annually by the peasants working in the coal-ash storage sites is only 1% of the limit stipulated by Chinese authorities concerned.