

拟除虫菊酯类农药微生物降解研究进展^①

王兆守 李顺鹏*

(南京农业大学农业部农业环境微生物工程重点开放实验室 南京 210095)

摘要 拟除虫菊酯类农药是杀虫剂中的第三大类,这类农药残留已成为目前农产品中的主要农药残留类型之一。而微生物在降解农药残留中具有重要的作用,微生物降解技术已成为去除农药残留的绿色生产技术。拟除虫菊酯类农药的微生物降解国内外已有的研究主要集中在降解现象,菌株的分离、鉴定及生理生化特性,酶学,不同光学异构体的降解、降解途径等方面,本文对此进行了较详细的回顾,并对将来的研究方向进行了展望。

关键词 拟除虫菊酯; 农药残留; 微生物降解

中图分类号 S482.35; Q 93

拟除虫菊酯类农药是根据天然除虫菊素的结构人工合成的一类仿生杀虫剂,为杀虫剂中第三大类。此类农药过去一直被认为在体内易被氧化酶系统降解,无蓄积性,是毒性较低,使用安全的农药。最近研究表明,此类农药有蓄积性^[1],长期接触即使是低剂量的也会引起慢性疾病^[2~4];有些品种有致癌、致畸、致突变作用^[5~7];对哺乳动物具有中等的神经毒性、免疫系统毒性、心血管毒性和遗传毒性^[8~10];对家蚕、蜜蜂和鱼类等水生生物高毒,对鱼类的 LC_{50} 常在每升几微克的水平,安全系数为0.063左右,目前尚无特殊的治疗药物^[11,12]。所以,联合国粮农组织和世界卫生组织已对它们在农产品中的残留作出严格的限量。这类农药残留目前已成为我国农产品中主要的农药残留类型之一,严重影响了食品安全和我国农产品出口。

由于微生物降解具有成本低、效率高、无二次污染、生态恢复性好等优点,在降解石油、塑料、染料、表面活性剂等环境污染物中得到广泛应用,已成为当前环境科学研究的热点,这是国际上正在发展的一项环保新产业^[13~16]。据美国市场预测,在今后若干年中,市场对微生物降解技术服务及其生物产品的需求年平均增长率为15%^[17],而实际市场的需求可能远远超过这一预测结果。因此,微生物降解是去除拟除虫菊酯类农药残留较理想的方法。有关农药的微生物降解,国内外已有不少学者进行了相关的研究^[18~20],但由于拟除虫菊酯是20世纪80年代才开始作为一类替代农药出现的,应用的时

间不长,所以人们对拟除虫菊酯类农药残留的微生物降解研究较晚也较少^[21]。本文全面综述了近年来国内外在拟除虫菊酯类农药残留的微生物降解方面取得的成果,并对以后的研究方面进行了展望,对立项加强该类农药环境行为和环境归宿研究具有重要警示作用。

1 降解效果的发现

埃及 Magdoub 等^[22]1989年和印度 Misra 等^[23]1996年研究乳酸菌对牛奶中氰戊菊酯的降解情况,发现乳酸菌可以吸附并降解牛奶中氰戊菊酯,接种乳酸菌到受氰戊菊酯污染的牛奶中培养一段时间可以降低农药残留,从而减少经济损失。印度 Rangaswamy 等^[24]研究也发现,分离自土壤的细菌对氯氰菊酯和氰戊菊酯具有降解作用。巴西 Musumeci 等^[25]研究表明,假单胞菌对土壤结合态氯氰菊酯残留具有去除作用。这种细菌在普通培养基中丧失降解活性,但在以氯氰菊酯为唯一C源的基础培养基中具有降解活性。

2 菌株的分离、鉴定及生理生化特性研究

美国 Lee 等^[26]从受污染的沉积物中分离出56株拟除虫菊酯降解菌,其中6株能够在水相中转化联苯菊酯和氯菊酯及在沉积物中转化联苯菊酯。在水相中联苯菊酯被菌株 *Stenotrophomonas acidaminiphila* 迅速降解,半衰期由700 h以上降到30~131 h。氯菊酯异构体可被菌株 *Aeromonas sobria*、*Erwinia*

^①江苏省博士后科研资助计划项目和江苏省科技攻关项目(BE2002345, BE2003343)资助。

* 通讯作者

carotovora 和 *Yersinia frederiksenii* 降解。和联苯菊酯类似, 接入降解菌后, 顺式和反式氯菊酯半衰期缩短了近 10 倍。然而在沉积物存在条件下菌株 *S. acidaminiphila* 降解联苯菊酯受到显著抑制, 可能是联苯菊酯被强烈吸附到固相中使降解菌无法接触到。联苯菊酯在农田沉积物中半衰期为 343 ~ 466 h, 而在河流沉积物中半衰期增加到 980 ~ 1200 h。联苯菊酯在接种过的泥浆中的降解和未接种的系统相比没有显著增强。英国 Grant 等^[27~29]从使用拟除虫菊酯的菜园土壤和农田土壤的混和土样中分离出拟除虫菊酯降解菌。经显微镜方法、生物化学和遗传技术手段分析鉴定, 两株优势菌分别属假单胞菌属和沙雷氏菌属。通过 16S rRNA 基因序列比对, 假单胞菌属菌株为荧光假单胞菌, 沙雷氏菌属菌株为 *Serratia plymuthica*。这两个菌株在矿质肉汤和蔗糖培养基中都长得很好, 前者的生长限制因子是矿物质含量, 而后者是 C 源。荧光假单胞菌细胞生长和对氯氰菊酯和氟氯苯菊酯降解比 *Serratia plymuthica* 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 °C、80 r/min 条件下培养 14 天, 和对照相比, 对 250 mg/L 的氯氰菊酯去除率约为 66.7 %。埃及 Hashem 等^[30]从使用过拟除虫菊酯(氰戊菊酯、溴氰菊酯和氯氰菊酯)的土壤中分离出 8 株拟除虫菊酯类农药降解菌, 经鉴定都属于芽孢杆菌属, 这些降解菌都能以单种的拟除虫菊酯为唯一 C 源生长。虞云龙等^[31]从杭州农药厂废水排放口污泥中分离到 1 株降解菌 *Alcaligenes* sp.YF11, 在试验条件下, 菌量 OD_{415nm} 为 0.20 时, 该菌株对 50 mg/L 的氰戊菊酯、溴氰菊酯、三氟氯氰菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯、氯菊酯的降解速率分别为 5.06、8.01、3.04、9.24、2.00、3.84 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$, 对对硫磷、甲基对硫磷、杀螟松的降解速率分别为 16.15、28.55、20.86 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$, 对杀灭菊酯的降解为矿化作用。王兆守等^[32]从农药厂的下水道污泥中分离出能以拟除虫菊酯类农药为唯一 C 源和能源的降解菌阴沟肠杆菌 w10j15。在 30 °C、pH 7.0 基础培养基发酵液中, 该菌 3 天对 100 mg/L 的联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的降解率分别为 52.43 %、50.76 % 和 56.89 %。经紫外线诱变后, 正突变菌株 UW19 对联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯的降解率比出发菌株降解率提高了近 20 %; UW2 也比出发菌株提高了约 10 % 的降解率^[33]。丁海涛等^[34]分离到地衣芽孢杆菌 qw5 菌株, 培养 5 天, 对氰戊菊酯、氯氰菊酯、溴氰菊酯

的降解率分别为 53.8 %、41.2 %和 61.7 %。许育新等^[35]分离到红球菌属 CDT3 菌株, 在摇瓶中 3 天对 100 mg/L 的氯氰菊酯的降解率为 84.24 %, 小区试验中对茶叶上氯氰菊酯的降解率达到 68.94 %。

3 酶学的研究

Maloney 等^[36]从加吐温 80 为 C 源的无机盐基础培养基中分离到降解菌 *Bacillus cereus* SM3, 该菌能够降解第二代和第三代拟除虫菊酯, 和降解反应有关的酶称为氯菊酯酶, 这是用细胞粗酶液降解拟除虫菊酯的第一个例子。经离子交换柱和凝胶层析柱分离纯化得到氯菊酯酶, 经交联葡聚糖 G-100 凝胶层析测定, 分子量约为 61.3 kDa, 为羧酸酯酶。氯菊酯酶最适的 pH 为 7.5, 最适温度为 37 °C, 不需要辅酶和辅因子就能具有活性。这种酶可能是一种丝氨酸酯酶, 因为它似乎对有机磷化合物焦磷酸四乙酯敏感, 在一定的温度范围内稳定。细胞提取物包含另外一种酯酶, 对 beta-naphthylacetate 有活性, 但这种酶不同于氯菊酯酶。西班牙 Sogorb 等^[37]研究过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, 而羧酸酯酶对拟除虫菊酯类农药的解毒可能起重要作用。虞云龙等^[38]测定了降解菌 *Alcaligenes* sp.YF11 粗酶液降解杀灭菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯、溴氰菊酯、氯菊酯、三氟氯氰菊酯的最适 pH 分别为 8.0、8.5、8.0、8.0、9.0、7.5; 米氏常数分别为 41.4、136.8、65.4、222.8、5.2、8.67 nmol/ml, 最适温度为 32.5 °C, 该粗酶液在 pH 5.0 ~ 10.5 均具有降解活性, 但其研究没有涉及到酶的分离、纯化。

4 不同光学异构体的降解研究

日本 Sakata 等^[39]从 103 株对拟除虫菊酯有降解活性的菌株中筛选出 2 株细菌, 研究它们对拟除虫菊酯光学异构体的降解, 发现降解菌能产生数种带有很高的立体定向性的酯酶, 对氯氰菊酯和氰戊菊酯的不同光学异构体的降解有较高的底物特异性。

5 降解途径的研究

目前已报道的仅虞云龙等^[40]采用 GC-MS 检测到降解菌 *Alcaligenes* sp.YF11 对杀灭菊酯的 2 种降解产物, 通过这 2 种产物推导了降解菌 *Alcaligenes* sp.YF11 对杀灭菊酯的可能降解途径, 但研究没有涉及到参与降解过程的相关酶及影响降解的关键酶。

6 结束语

拟除虫菊酯类农药残留的微生物降解在降解菌的分离筛选和生理特性方面已有较多研究,而对降解酶系的组成及影响降解的关键酶研究有待进一步深入,对降解酶基因、降解农药途径的代谢调控机理及其遗传控制机制的研究尚未见报道。今后应加强这方面的研究。

参考文献

- Al-Makkawy HK, Madbouly MD. Persistence and accumulation of some organic insecticides in Nile water and fish. *Resources, Conservation and Recycling*, 1999, 27 (1-2): 105 ~ 115
- Sinha G, Agrawal AK, Islam F, Seth K, Chaturvedi RK, Shukla S, Seth PK. Mosquito repellent (pyrethroid- based) induced dysfunction of blood-brain barrier permeability in developing brain. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 2004, 22 (1): 31 ~ 37
- 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
- Mohnssen HM. Chronic sequelae and irreversible injuries following acute pyrethroid intoxication. *Toxicology Letters*, 1999, 107 (1-3): 161 ~ 176
- Shukla Y, Yadav A, Arora A. Carcinogenic and cocarcinogenic potential of cypermethrin on mouse skin. *Cancer Letters*, 2002, 182 (1): 33 ~ 41
- Shukla Y, Arora A, Singh A. Tumourigenic studies on deltamethrin in Swiss albino mice. *Toxicology*, 2001, 163 (1): 1 ~ 9
- Kasat K, Go V, Pogo BGT. Effects of pyrethroid insecticides and estrogen on WNT10B proto-oncogene expression. *Environment International*, 2002, 28 (5): 429 ~ 432
- Grosman N, Diel F. Influence of pyrethroids and piperonyl butoxide on the Ca^{2+} -ATPase activity of rat brain synaptosomes and leukocyte membranes. *International Immunopharmacology*, 2005, 5 (2): 63 ~ 270
- Xia YK, Bian Q, Xu LC, Cheng SP, Song L, Liu JI, Wu W, Wang SL, Wang XR. Genotoxic effects on human spermatozoa among pesticide factory workers exposed to fenvalerate. *Toxicology*, 2004, 203 (1-3): 49 ~ 60
- de la Cerda E. Action potential and underlying ionic currents by the pyrethroid insecticide deltamethrin. *Archives of Medical Research*, 2002, 33 (5): 448 ~ 454
- 王朝晖, 尹伊伟, 林小涛, 骆育敏, 林秋奇, 许忠能. 拟除虫菊酯农药对水生生态系统的生态毒理学研究综述. 暨南大学学报 (自然科学版), 2000, 21 (3): 123 ~ 127
- Wang LG, Jiang X, Yan DY, Forster S, Martens D. Comparison of two procedures for extraction and clean-up of organophosphorus and pyrethroid pesticides in sediment. *Pedosphere*, 2004, 14 (2): 229 ~ 234
- 李顺鹏, 蒋建东. 农药污染土壤的微生物修复研究进展. 土壤, 2004, 36 (6): 577 ~ 583
- 刘世亮, 骆永明, 丁克强, 曹志洪. 土壤中有机污染物的植物修复研究进展. 土壤, 2003, 35 (3): 187 ~ 192
- 董元华, 张桃林. 基于农产品质量安全的土壤资源管理与可持续利用. 土壤, 2003, 35 (3): 182 ~ 186
- Liao M, Xie XM, Subhani A. Combined effect of nutrient and pest management on soil ecological quality in hybrid rice double-cropping system. *Pedosphere*, 2003, 13 (2): 129 ~ 138
- Dean N. Advancing research for bioremediation. *Environment Problem*, 1992, 3 (7): 19 ~ 25
- 戴青华, 张瑞福, 蒋建东, 顾立锋, 李顺鹏. 一株三唑磷降解菌 mp-4 的分离鉴定及降解特性的研究. 土壤学报, 2005, 42 (1): 111 ~ 115
- 刘智, 李顺鹏. 甲基对硫磷降解菌 DLL-1 的诱变育种. 土壤学报, 2003, 40 (2): 293 ~ 300
- 张卫, 虞云龙, 吴加伦, 李少南, 樊德方. 阿维菌素在土壤中的降解和高效降解菌的筛选. 土壤学报, 2004, 41 (4): 590 ~ 596
- 虞云龙, 樊德方, 陈鹤鑫. 农药微生物降解的研究现状与发展策略. 环境科学进展, 1996, 4 (3): 28 ~ 36
- Magdoub MNI, Fayed AE, El-Shenawy MA, Abou-Arab AAK. Persistence of fenvalerate pyrethroid in milk in relation to lactic acid bacteria. *Egyptian Journal of Dairy Science*, 1989, 17 (2): 217 ~ 225
- Misra AK, Vinod RS, Bhattacharyya A. Degradation of fenvalerate (pyrethroid) pesticide in milk by lactic acid bacteria. *Indian Journal of Dairy Science*, 1996, 49 (9): 635 ~ 639
- Rangaswamy V, Venkateswarlu K. Degradation of selected insecticides [monocrotophos, quinalphos, cypermethrin and fenvalerate] by bacteria isolated from soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1992, 49

- (6): 797 ~ 804
- 25 Musumeci MR, Ostiz SB. Binding of cypermethrin residue in Brazilian soils and its release by microbial activity. *Revista de Microbiologia*, 1994, 25 (4): 216 ~ 219
- 26 Lee S, Gan J, Kim JS, Kabashima JN, Crowley DE. Microbial transformation of pyrethroid insecticides in aqueous and sediment phases. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2004, 23 (1): 1 ~ 6
- 27 Grant RJ, Daniell TJ, Betts WB. Isolation and identification of synthetic pyrethroid-degrading bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, 92 (3): 534 ~ 540
- 28 Grant RJ, Betts WB. Biodegradation of the synthetic pyrethroid cypermethrin in used sheep dip. *Letters in Applied Microbiology*, 2003, 36 (3): 173 ~ 176
- 29 Grant RJ, Betts WB. Mineral and carbon usage of two synthetic pyrethroid degrading bacterial isolates. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, 97 (3): 656 ~ 662
- 30 Hashem, Hafez FH, El-Mohandes MAO. Isolation and identification of pyrethroid insecticides-degrading bacteria from soil. *Annals of Agricultural Science*, 1999, 44 (1): 123 ~ 137
- 31 虞云龙, 宋凤鸣, 郑重, 陈鹤鑫, 樊德方. 一株广谱性农药降解菌 (*Alcaligenes* sp.) 的分离与鉴定. *浙江农业大学学报*, 1997, 23 (2): 111 ~ 115
- 32 王兆守, 林淦, 李秀仙, 梁小虾, 尤民生. 拟除虫菊酯降解菌的分离、筛选及鉴定. *福建农林大学学报 (自然科学版)*, 2003, 32 (2): 176 ~ 180
- 33 王兆守, 梁小虾, 林淦, 李秀仙, 尤民生. 拟除虫菊酯类农药降解菌的紫外线诱变. *华东昆虫学报*, 2003, 12 (2): 82 ~ 86
- 34 丁海涛, 李顺鹏, 沈标, 崔中利. 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
- 35 许育新, 戴青华, 李晓慧, 李顺鹏. 氯氰菊酯降解菌株 CDT3 的分离鉴定及生理特性研究. *农业环境科学学报*, 2004, 23 (5): 958 ~ 963
- 36 Maloney SE., Maule A, Smith ARW. Purification and preliminary characterization of permethrinase from a pyrethroid-transforming strain of *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59 (7): 2007 ~ 2013
- 37 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
- 38 虞云龙, 陈鹤鑫, 樊德方, 盛国英, 傅家谟. 拟除虫菊酯类杀虫剂的酶促降解. *环境科学*, 1998, 19 (3): 66 ~ 69
- 39 Sakata S, Mikami N, Yamada H. Degradation of pyrethroid optical isomers by soil microorganisms. *Journal of Pesticide Science*. 1992, 17 (3): 181 ~ 189
- 40 虞云龙, 陈鹤鑫, 樊德方, 陆贻通, 盛国英, 傅家谟. *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

STUDY ON MICROBIAL DEGRADATION OF SYNTHETIC PYRETHROID INSECTICIDES

WANG Zhao-shou LI Shun-peng

(Key Lab of Microbiological Engineering of Agricultural Environment of Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract Synthetic pyrethroid insecticides is the third largest class of insecticides. The residue of this kind of insecticides has become one of the most dominant insecticide residues in farm produce. And microorganism has important function on degrading pesticide residues. Therefore, the technology of microbial degradation has turned into the organic production technology to remove pesticide residues. Up to now, the study on microbial degradation of synthetic pyrethroid insecticides mostly focuses on degrading phenomena, isolation, identification, physiological and biochemical characteristics of strains, enzymology, the degradation of different optic isomers, degrading pathway and so on. This paper particularly reviews these domestic and overseas study. Moreover, it prospects the study direction in the future.

Key words Synthetic pyrethroid insecticides, Insecticide residues, Microbial degradation