

有机磷农药生物降解研究进展*

柏文琴 何凤琴 邱星辉**

(中国科学院动物研究所农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室 北京 100080)

摘要 有机磷农药是目前我国使用量最大的农药,对农业的发展有重要的作用,但同时造成了严重的环境污染.利用微生物或微生物源酶制剂来降解农药是近年来的一个主要努力方向.至今,已经陆续分离到许多有机磷降解菌,并对其相应的降解酶的生化性质进行了鉴定,相关的基因也被克隆、鉴定和改造.另外,基因工程及生物技术方面的进展为开发微生物或酶制品奠定了基础.本文综述了有机磷农药降解菌、降解酶以及有机磷农药生物降解技术等方面的研究现状.表1参61

关键词 有机磷农药;水解酶;微生物;降解

CLC X592

ADVANCES IN BIODEGRADATION OF ORGANOPHOSPHATES*

BAI Wenqin, HE Fengqin & QIU Xinghui**

(State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract Organophosphate compounds (OPs) are most extensively used pesticides around the world. Although OPs have playing important roles in protecting agricultural crops from insect pests and weeds, and in controlling disease-transmitting vectors, they cause serious environmental pollution problems. The biotechnology involving the use of microorganisms or their cell-free enzyme preparations in degrading pesticides appears to have, at the moment, the most promising applications in degrading the residual pesticides. Microorganisms capable of degrading many of organophosphorus pesticides have been isolated, many enzymes have also been characterized, and various OPs degrading genes have been cloned and identified. These findings offer great possibilities to exploit these degrading microorganisms and enzymes. In this article, the current knowledge of the organophosphate biodegradation was summarized. Tab 1, Ref 61

Keywords organophosphate; enzyme; microorganism; degradation

CLC X592

有机磷农药(organophosphorus pesticides, OPs)由于具有低残留、高效和使用成本低等特点,在农业生产中被广泛使用,但同时也带来了严重的环境问题,直接或间接地危害人类健康.有证据表明,OPs具有诱变性和致畸胎性,哺乳动物的神经和免疫系统疾病大多与OPs相关,这些疾病包括疯牛病、海湾战争综合症、帕金森综合症等^[1].如何消除有机磷农药对环境和人类的危害,已成为事关人类健康和国民经济发展的重大问题.

减少农药的使用是解决农药危害的根本出路,残留农药的去除也是减少农药危害的有效途径.有机磷农药消除方法有许多,包括物理的、化学的和生物的.传统的物理方法(包裹、焚烧和掩埋)和化学方法(包括氧化、还原和水解)成本高,可能产生新的污染物,且作用相对较慢^[2].利用生物或生物产品来降解污染物的生物修复方法具有无毒、无残留、无二次污染等优点,是消除和解毒高浓度的农药残留的一种安全、有效、廉价的方法^[3].

微生物具有种类多、变异快和易于操纵的特点,是生物修复的重要生物资源.至今已分离了许多有机磷农药的降解菌,其中一些微生物的有机磷降解酶的生化性质已经得到鉴定,少数有机磷农药降解基因已得到分离、鉴定和改造.用微生物或无细胞酶制品来消减农药污染的生物修复技术显示出广阔的应用前景.本文综述了有机磷农药降解微生物、降解酶以及生物修复技术的研究进展.

1 有机磷农药降解微生物的多样性

目前,已经分离的降解OPs的微生物,包括细菌、真菌、放线菌、藻类等,其中细菌由于其生化上的多种适应能力以及易诱发突变菌株,在降解农药的微生物中占重要地位.表1列出了几种主要有机磷农药的降解微生物.从表1可看出,某些有机磷农药同时有多种降解菌,同一种菌也会对多种有机磷农药具有降解作用,体现了微生物种类的多样性以及某些微生物功能的多样性,同时提示某些微生物可以应用于一种或多种农药的降解,而另一些则只能用于特定种类农药的降解.

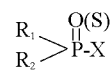
2 有机磷农药降解酶/基因

有机磷农药一般是磷酸、麟酸或氨基磷酸的酯或硫醇衍生物.一般结构为

收稿日期:2003-09-24 修回日期:2004-12-15

* 中国科学院院长基金特别支持项目(残留农药的酶降解技术研究)
资助 Supported by the President Foundation Program of the Chinese Academy of Sciences(Research on Bio-degradation of Organophosphates)

** 通讯作者 Corresponding author (E-mail: qiuxh@panda.ioz.ac.cn, Tel:010-62575748)



通常 R₁、R₂是烷基或芳(香)基,直接或通过 O 或 S 与 P 原子结合,有时,R₁直接与 P 原子结合,R₂ 结合到 O 或 S 原子上,O 或 S 原子与 P 原子形成双键,X 基团为卤素、脂肪族、芳香族或杂环类. X基团也通过氧或硫原子与P原子结合,称为解离基

团(leaving group),当有机磷农药与靶蛋白结合或被磷酸三酯酶水解时,该基团可发生解离. 氧或硫原子与磷原子以共价键结合,相应的有机磷化合物为磷酸酯和磷硫酯(phosphothioate)^[35]. 磷化合物代谢的起始步骤是芳(香)基磷酸(酯)键的水解,水解产物比原化合物极性增强,磷酸化作用减弱,所以毒性减弱,因此,水解反应通常被认为是解毒反应.

表 1 几种主要有机磷农药的降解微生物
Table 1 Microorganisms degrading several organophosphates

有机磷农药 Organophosphates	微生物 Microorganisms	参考文献 References
甲基对硫磷 Methylparathion	邻单胞菌属 <i>Plesiomonas</i> sp. DLL-1	4
	假单胞菌 <i>Pseudomonas</i> sp. A3	5
	黄杆菌属 <i>Flavobacterium</i> sp. ATCC27551	6
	大比目鱼黄杆菌 <i>F. balustinum</i>	7
	假单胞菌 <i>Pseudomonas</i> sp. WBC-3	8
	微藻 <i>Microalgae</i>	9
	藻青菌 <i>Cyanobacteria</i>	9
	产碱菌属 <i>Alcaligenes</i> sp.	10
	芽孢杆菌 <i>Bacillus</i> sp.	11
	青霉 <i>Penicillium waksmani</i>	12
	黄杆菌属 <i>Flavobacterium</i> sp. ATCC27551	6
对硫磷 Parathion	假单胞菌 <i>Pseudomonas</i> sp. ATCC29353	13
	芽孢杆菌 <i>Bacillus</i> sp.	14
	节杆菌 <i>Arthrobacter</i> sp.	14
	不动杆菌属 <i>Acinetobacter</i> sp.	15
蝇毒磷 Coumaphos	放射形土壤杆菌 <i>Agrobacterium radiobacter</i> P230	16
	诺卡氏菌 <i>Nocardia</i> sp. B-1, B-2, B-3	17
	假单胞菌 <i>P. montelli</i>	18
久效磷 Monocrotophos	假单胞菌 <i>Pseudomonas</i> sp. A3	5
	黑蓝节杆菌 <i>Arthrobacter atrocyaneus</i> MCM B-425	19
	巨大芽孢杆菌 <i>B. megaterium</i>	19
	铜绿假单胞菌 <i>P. aeruginosa</i> F10B	20
甲胺磷 Methamidophos	鲁氏酵母 <i>Saccharomyces rouxii</i> WY-3	21
	假单胞菌 <i>Pseudomonas</i> sp. WB-1	22
	瓶形酵母菌 <i>Pityrosporum</i>	22
	芽孢杆菌 <i>Bacillus</i> sp. NM-J ₅	23
二嗪磷 Diazinon	黄杆菌属 <i>Flavobacterium</i> sp. ATCC27551	6
	假单胞菌 <i>Pseudomonas</i> sp. A3	5
	假单胞菌 <i>Pseudomonas</i> sp. ATCC29353	13
乐果 Dimethoate	不动菌属 <i>Acinetobacter</i> sp.	15
	黑曲霉 <i>Aspergillus niger</i> ZHY256	24
	铜绿假单胞菌 <i>P. aeruginosa</i> MCMB-427	25
	黄曲霉 <i>Aspergillus flavus</i>	26
	聚多曲霉 <i>Aspergillus sydowii</i>	26
	假单胞菌 <i>Pseudomonas</i> sp. NM-L ₃	26
氧乐果 Omethoate	巨大芽孢杆菌 <i>B. megaterium</i>	27
异硫磷 Isufenphos	假单胞菌 <i>Pseudomonas</i> sp.	28
	节杆菌 <i>Arthrobacter</i> sp. B-5	29
马拉硫磷 Malathion	放射形土壤杆菌 <i>Agrobacterium radiobacter</i> P230	16
	黄曲霉 <i>Aspergillus flavus</i>	26
	聚多曲霉 <i>Aspergillus sydowii</i>	26
	微球菌 <i>Micrococcus</i> sp. M-36 和 AG-43	30
	绿色木霉 <i>Trichoderma viride</i>	31
	米曲霉 <i>Aspergillus oryzae</i>	32
	假单胞菌 <i>Pseudomonas</i> sp. A3	5
毒死蜱 Chlorpyrifos	微球菌 <i>Micrococcus</i> sp. M-36 和 AG-43	30
杀螟硫磷 Fenitrothion	伯克霍尔德菌 <i>Burkholderia</i> sp. NF100	33
丙线磷 Ethoprophos	恶臭假单胞菌 <i>P. putida</i> ep I 和 ep II	34

生物体内存在多种不同的有机磷降解酶,如有机磷水解酶,有机磷酸脱水酶等,其中最常见有机磷降解酶是磷酸三

酯酶(phosphotriesterases,PTE),PTE 作为一类重要的有机磷水解酶,已从许多生物体中鉴定出. 目前已知的有机磷降解酶

及其编码基因分述如下:

2.1 OPH (organophosphate hydrolase) /*opd* (organophosphorus degradation gene)

有机磷水解酶 OPH 是目前研究最多, 应用最广的一种有机磷水解酶, 它通过水解磷原子和亲电子解离基团之间的各种磷酸键 (P-O, P-F, P-CN 和 P-S), 从而可水解许多有机磷酸三酯、硫酸酯、氟磷酸酯。OPH 具有极高的催化效率, 水解对氧磷的 K_{cat} 和 K_{cat}/K_m 分别达 $2\ 100\ S^{-1}$ 和 $4 \times 10^7\ M^{-1}S^{-1}$ [36]。

从不同的地域 (美国、菲律宾、印度、澳大利亚) 分离到不同种属的细菌, 它们含有相似的有机磷降解酶基因称为 *opd*, 编码有机磷水解酶。在黄杆菌 *Flavobacterium* sp. ATCC27551 和缺陷假单胞菌 *Pseudomonas diminuta* MG 中有相同的 *opd* 序列, 分别位于 43 kb 的质粒 pPDL2 和 66 kb 质粒 pCMS1。杂交研究表明, 两个质粒上围绕 *opd* 基因的 5.1 kb 的区域是高度同源的, 同源区域一直延伸到 *opd* 基因上游 2.6 kb 和下游 1.7 kb, 而其余部分不存在同源性 [37]。随后又发现 *opd* 基因还存在于 *Flavobacterium balustinum* 的 86 kb 质粒 pBC9 上 [7], 通过 PCR 方法扩增出 *opd* 基因, 测序结果表明与来自 *Flavobacterium* sp. ATCC27551 和 *P. diminuta* MG 的 *opd* 基因有 98% 的相似性 [38]。在不同的地域, 不同种属的细菌中出现功能同源的基因, 推断这些基因可能从同一个祖先获得, 他们的自然宿主可能是一般的土壤微生物。最近研究表明, *opd* 基因在广泛的土著微生物间的转移可能通过转座子方式 [39]。

OPH 的三维分子结构、活性位点以及水解机制都得到阐明。OPH 分子为同源二聚体蛋白, 每个亚基折叠成一个 $(\alpha\beta)_8$ 桶状基元, 活性位点含有一对双核金属中心, 位于 β -链的 C-末端, 天然酶含有 Zn^{2+} , 用 Co^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 或 Mu^{2+} 代替 Zn^{2+} , 可保持全部的催化活性 [40]。两个 Zn^{2+} 结合在一簇组氨酸残基内, 其中一个 Zn^{2+} 通过一个精氨酸 (Asp) 和两个组氨酸 (His55, His57) 连接到蛋白上, 另外一个 Zn^{2+} 连接到两个组氨酸 (His201 和 His230) 残基上, 两个金属离子之间通过 Lys169 羧化作用形成的氨基甲酸基团和水分子 (或 OH^-) 连接在一起 [41]。结构和动力学研究推断该酶的反应机制可能是: 涉及金属桥连的 OH^- 亲核攻击磷原子和顺序替代解离基团 [42]。

2.2 ADPase (aryldialkylphosphate) /*adpB*

Mulbry [36] 等纯化了来自诺卡氏菌 B-1 的 ADPase, 研究表明该酶是一个分子量 (M_r) 43×10^3 的单体, 对乙基对硫磷的 K_m 和 K_{cat} 分别为 $25\ \mu mol$ 和 $26\ min^{-1}$, 比 OPH 的催化效率低 4 500 倍。用 ADPase 的 N 端序列的简并寡脱氧核酸序列, 扩增分离到相应的基因 *adpB* 的 57 bp 的片段, 以该片段的核苷酸序列为基础, 合成非简并序列用作 Southern 杂交的探针, 筛选菌株 B-1 亚基因组文库包含 *adpB* 的 DNA 片段 [43]。一个 3.55 kb 的 PstI 片段 (包含 *adpB*) 克隆到 *E. coli* 中, 并测定了包含 *adpB* 的 1 600 bp 区的核酸序列。在 pUC19 的 lac 启动子控制下, *adpB* 在 *E. coli* 中表达, 比在自然 *adpB* 启动子控制下的 B-1 菌高 15 倍。与黄杆菌的 *opd* 基因相比, *adpB* 与 *opd* 无明显同源性。

2.3 B-5 水解酶/*oph* (organophosphorus insecticide hydrolase - encoding gene)

Ohshiro 等 [44] 发现了一种新型的有机磷水解酶, 称 B-5

水解酶。组成型表达在节杆菌 (*Arthrobacter* sp.) B-5 的胞液中。B-5 水解酶有两个同功酶, 它们来自同一个基因 (*oph* 基因), 经过不同修饰加工, 有不同的等电点 (分别为 3.6 和 3.9), 但都由 M_r 为 45×10^3 的单个亚基组成, 有相似的 N 端氨基酸序列。B-5 水解酶与 *Nocardia* sp. B-1 的 ADPase 的 N 端有 51.6% 的氨基酸相似性, 在分子量、最适温度、细胞定位以及 DTT 和 Cu^{2+} 对二者的影响等特征高度相似。B-5 水解酶对异硫磷有很高的水解活力, 而对其他底物, 甚至对与异硫磷含有相同磷酸酯键的底物只有微弱的水解作用, 可见磷酸酯键对水解活性没有重要影响。从底物专一性方面来看, B-5 水解酶是一种不同于 OPH 的新型的有机磷水解酶。*oph* 基因与 *Nocardia* sp. B-1 的 *adpB* 基因具有同源性, 而与 *opd* 基因序列无明显同源关系 [45]。

2.4 OPDA/*opdA*

来自 *Agrobacterium radiobacter* 的有机磷水解酶 OPDA 是最近发现的酶, 可水解广泛的有机磷化合物 [46]。OPDA 与 OPH 蛋白的氨基酸序列有 90% 相似性, 二者均不能水解脂肪族 OPs 马拉硫磷, 对二乙基 OPs 的动力学相似, 但 OPDA 对二甲基 OPs 的 K_{cat} 高于 OPH, 且可以水解一些 OPH 不能水解的二甲基 OPs 如亚胺硫磷 (phosmet) 和倍硫磷 (fenthion)。*opdA* 基因位于染色体上, 与 *opd* 基因的核苷酸序列有 88% 的相似性。

2.5 HocA (hydrolysis of coroxon) /*hocA*

Home 等 [18] 用香豆磷和蝇毒磷作为磷源, 分离到菌株 *P. monteilli* C11, 从中鉴定出另一种酶, 该酶有很强的磷酸三酯酶活性, 对有机磷酸酯和硫酸酯有广泛的底物专一性, 但螯合剂不影响磷酸三酯酶活性, 表明该酶活性不依赖金属离子, 是一种新型的磷酸三酯酶。动力学数据表明, OPH/OPDA 在生物修复方面优于 HocA, 但是在一定的环境条件下, 如重金属污染的水中, 使用 HocA 的效果较好。该酶与 SWISS-PORT/GenBank 数据库的蛋白无序列相似性。相应的基因 *hocA* 由 501 个 bp 组成。培养物在缺乏磷酸盐的条件下生长时, *hocA* 基因的表达量增加, 表明该基因可能是 Pho 调节子的一部分。

2.6 MPD/*mpd* (methyl parathion - degrading gene)

崔中利等 [47] 通过鸟枪法从邻单胞菌 M6 的基因组文库中筛选出 *mpd* 基因, 该基因编码一种新型的有机磷降解酶。MPD 为 43×10^3 的胞内酶。通过基因测序, 该基因全长 2 191 bp, 与 *opd* 基因的限制性内切酶图谱完全不同, 两种基因无明显同源性。*mpd* 基因可有效表达在大肠杆菌中。通过序列比对表明这种有机磷降解酶可能是乳糖酶超家族的成员之一。

2.7 OPAA (organophosphorus acid anhydrolase) /*opaA*

从一些 *Alteromonas* sp. 纯化和鉴定了有机磷降解有关的另一类酶——有机磷酸脱水酶 OPAA。Western 杂交结果表明, 不同来源的 OPAA 有共同的结构域。这些 OPAA 的催化性质相似, 有高水平的 DFP (Diisopropylfluorophosphate) 水解活性, OPAA 对于沙林 (sarin) 和索曼 (soman) 类的神经毒气的脱毒活性优于有机磷杀虫剂。一般在 pH 7.5 ~ 8.5, 温度 40 ~ 55 °C 条件下有最高活性。它们均由单个的多肽链组成, 可被 Mn^{2+} 激活, 被 DFP 结构类似物抑制 [48]。编码有机磷脱水酶 OPAA 的基因 *opaA* 也已经克隆并测序, 通过序列比对, 发现 *opaA* 与人类脯胺酰氨基酸酶和 *E. coli* 的氨肽酶有高度相似性, 而与具有

相似功能的有机磷水解酶(OPH)序列无相似性。

综上所述,在已知的有机磷降解酶中,各种降解酶的酶学性质、底物范围等方面存在差异,在不同的污染环境中,可以选择不同的降解酶,或者多种降解酶联合处理。OPH 及 OPDA 由于具有广泛的底物范围和极高的催化效率,是至今最有应用前景的有机磷降解酶。相应的基因的克隆与表达可以构建降解谱广、降解彻底的工程菌,为微生物降解农药开辟新途径。也可将降解酶基因转入易于繁殖的宿主中获得高表达,提高酶产率,同时可以深入了解农药微生物降解的生化机制。

3 有机磷农药降解的基因改造

许多有机磷农药虽然可被天然菌株降解,但由于受自然条件的影响,其对农药的降解率较低或作用较慢,因此直接利用分离的微生物菌株往往不能达到期望的效果。利用生物工程技术可以改变酶的性质如酶的细胞定位、底物特异性、动力学特征,构造符合不同需要的工程菌或酶制剂。

3.1 构建工程菌株提高降解能力

Mulchandani 等将脂蛋白(Lpp)的信号序列的前九个氨基酸连到外膜蛋白(OmpA)的跨膜区,构建成 Lpp-OmpA 基因融合系统,将 OPH 展示定位到 *E. coli* 的表面。表面表达 OPH 的细胞可有效水解对硫磷和对氧磷,而不受细胞膜扩散限制,比胞内同样 OPH 表达水平的细胞水解活性高 7 倍^[49]。表面表达 OPH 的培养物有很长的货架寿命,在没有任何营养源的缓冲液中一个月仍保持 100% 的活性^[50]。将非生长的细胞通过简单吸附固定到非织物聚丙烯材料上,在补充 1 mmol L⁻¹ Co²⁺ pH 缓冲液中,可有效、快速水解近 100% 的对氧磷、二噻磷、蝇毒磷和甲基对硫磷^[51]。此方法把细胞培养与细胞固定和解毒过程分开,培养后不需无菌环境,为建立有效、简单、廉价的有机磷化合物脱毒技术奠定了基础。

3.2 蛋白质工程用于提高降解能力

为改良 OPH 的催化活性,可以通过基因改造的办法,OPH 的分子结构与活性关系的研究为酶的定点改造(理性设计)提供了理论依据。通过定点突变改变酶的活性位点的结构,从而影响 OPH 对底物水解专一性已经有很多报道。OPH 的 254 和 257 位组氨酸残基位于每个单体双金属活性位点的附近,这些残基决定了活性位点与底物的相互作用。利用基因工程技术定点改造 OPH 产生的突变体 H254R、H257L、H254R/H257L 的每个活性位点只含有一个金属离子,改变后的酶对内吸磷(demeton)(P-S 键)的水解作用提高了 2~30 倍,而对二异丙基氟磷酸(P-F 键)水解作用下降,H257L 和 H254R/H257L 突变体对 NPPMP(soman 的类似物)水解能力分别提高了 11 倍和 18 倍。这些结果表明,通过对 H254 和/或 H257 位点的定点修饰可以改变 OPH 对底物的专一性,这意味着对金属含量要求的改变增加了酶分子结构的灵活性,使得大底物易进入到活性位点,同时降低对小底物的催化效率,从而改变了酶的催化特性^[52]。另外,酶的随机改造(非理性方法)也被应用于改变 OPH 水解活性。为提高 OPH 对某些底物的活性,采用 DNA shuffling 技术筛选到几个突变体,其中之一 22A11 水解甲基对硫磷活性比野生型提高了 25 倍,通过类似的方法可能产生 OPH 突变体可以提高对难降解的二噻磷、毒死蜱和神经毒剂

如 sarin 和 soman 等有机磷化合物的降解活性^[53]。

4 有机磷降解菌及降解酶的应用

4.1 菌制剂的应用

有机磷降解菌在生物修复中的应用已经开展了广泛的研究。曹志方等^[22]将假单胞菌 WB-1 和瓶形酵母菌 WY-2 组成联合菌,在甲胺磷生产废水 SBR 生化处理工艺上进行小试,结果表明,联合菌投加到活性污泥中驯化后处理废水时,在进水 COD 浓度为 1 000~1 800 mg/L 范围内得到较好的处理效果,甲胺磷的去除率达到 85% 以上。李顺鹏^[10]等将甲基对硫磷的降解菌 *Alcaligenes* sp. 接种于含有甲基对硫磷的土壤中,表现了较强的降解农药残留的生态效应。在盆栽试验中,稻米与稻壳中甲基对硫磷比对照下降了 82.2%~100%。田间试验中,农药加菌,农药加有机肥加菌的处理,其稻米中的甲基对硫磷残留均检测不到,而对照(只施农药不加菌),稻米中的甲基对硫磷含量为 0.065 mg/kg,超过国家标准(0.05 mg/kg)。此外,程国锋^[23]等用甲胺磷降解菌 *Bacillus* sp. NM-J₅ 和乐果降解菌 *P. sp.* NM-L₃ 的菌制剂进行普通白菜变种矮脚黄残留降解小区试验,结果表明,菌剂对残留的甲胺磷和乐果有明显的去除效果。Lalithakumari 等^[5]将甲基对硫磷矿化菌株假单胞菌(*P. sp.*) A3 固定在硅藻纳珠中,在约 48 h 内降解 99% 的 1Mm 的甲基对硫磷,没有任何中间代谢物积累。Mulbry 等^[54]用从蝇毒磷污染的土壤中分离的菌株制成生物过滤柱,在 7~10 d 内可将污水中 1 500 mg/L 的蝇毒磷降低到 0.1mg/L。可见,降解菌的制剂可以有效去除土壤、蔬菜、污水中的农药。

4.2 降解酶的应用

4.2.1 固定化酶用于有机磷污染物的脱毒 固定化提供了固相支持物,制成的酶反应器已用于有机磷的解毒。固定化酶用于污水处理中,可以重复使用,而且避免极端条件下酶变性;用于土壤修复中,可避免土壤吸附、失活以及水解蛋白的微生物降解。OPH 固定在聚氨酯(polyurethane)泡沫上,保存和热稳定性比可溶性酶提高了几个数量级,储存在 25℃ 20% 的 DMSO 中,酶的半衰期达 1 500 d。估计 2.5 kg 的固定化酶在一年内可有效水解 30 000 t 的有机磷神经毒剂^[55]。一种新型的 OPH 催化剂形式,叫纳米复合物蛋白-硅酮聚合物,在长期的储存和使用中能保持高的活性和稳定性,可制成各种物理形式用于脱毒液相和气相有机磷神经毒剂,适合作为活性保护衣物材料以及大量有机磷化合物的脱毒的催化剂材料^[56]。将 OPH 和梭状芽孢杆菌的纤维素结合蛋白(CBD)融合表达,融合蛋白对对氧磷的 K_m 比 OPH 有微弱提高,固定到各种纤维素材料上有很高的稳定性,30 d 仍可保持起始活力的 85%,重复水解对硫磷仍可保持 100% 降解率^[57]。这些融合蛋白可开发成廉价的基于 OPH 的基础纤维素材料,可以同时吸附、降解有机磷污染物,可应用于:(1)高毒有机磷化合物的解毒的固定酶反应器,(2)作为接触有机磷化合物的工作人员防护服,(3)暴露于高毒神经毒剂的物体或表面物的解毒海绵或衣物。

4.2.2 生物传感器用于检测有机磷化合物 OPH 可以水解广泛的有机磷化合物,释放出容易检测的硝基酚、氟化物或氢离子,Mulchandani 等基于 OPH 已经开发了光学^[58]、电势计^[59]和安培计^[60]生物传感器,可以快速、敏感、选择性、直接

检测有机磷化合物。

4.2.3 医疗应用 磷酸三酯键断裂后,很大程度上降低了有机磷的毒性,所以 PTE 可以开发作为有机磷中毒的解毒剂或预防剂。研究表明:静脉注射 PTE 可以使鼠分别忍受 $2.9 \times LD_{50}$ 和 $7.3 \times LD_{50}$ 的对氧磷或二乙基氟磷酸(DEFB)。另外,用红细胞载体(CRBCs)代替静脉注射,将 PTE 进入到鼠体内,处理后的鼠对对氧磷的 LD_{50} 提高 126 倍。CRBCs 与通常的有机磷解毒剂阿托品和解磷啶联合作用,可对对氧磷的 LD_{50} 提高 1 000 倍^[61]。

5 结语

为减少或消除有机磷农药广泛使用带来的诸如对环境和食物安全的负面影响,利用微生物或微生物源酶制剂降解残留农药越来越受到重视。至今,已经分离到了许多高活性的降解菌,但农药降解微生物在室内与自然生态中的降解的性能存在较大差异,如何发挥农药降解微生物的降解性能,有待于深入探讨。随着分子生物学技术的发展,可以利用基因工程技术定向选育遗传工程菌株以及构建工程菌以拓宽农药降解谱、提高降解能力。酶的分子结构的研究,为从酶工程学角度提高酶的降解能力提供了理论依据。可以预计,随着新的降解微生物、降解酶的发现以及生物工程技术的发展,生物降解技术将在农药降解中起越来越重要的作用。

References

- Ragnarsdottir KV. Environmental fate and toxicology of organophosphate pesticides. *J Geol Soc*, 2000, **157**: 859 ~ 876
- Dave KI, Phillips L, Luckow VA, Wild JR. Expression and post-translational processing of a broad-spectrum organophosphorus-neurotoxin-degrading enzyme in insect tissue culture. *Biotechnol Appl Biochem*, 1994, **19**(3): 271 ~ 284
- Mulbry W, Kearney PC. Degradation of pesticides by microorganisms and the potential for genetic manipulation. *Crop Prot*, 1991, **10**: 334 ~ 346
- Liu Z(刘智), Sun JC(孙建春), Li SP(李顺鹏). Isolation, identification and characters of methyl-parathion degrading bacterium. *Chin J Appl Environ Biol*(应用与环境生物学报), 1999, **5**(suppl): 147 ~ 150
- Ramanathan MP, Lalithakumari D. Complete mineralization of methylparathion by *Pseudomonas* sp. A3. *Appl Biochem Biotechnol*, 1999, **80**(1): 1 ~ 12
- Sethunathan N, Yoshida TA. *Flavobacterium* sp. that degrades diazinon and parathion. *Can J Microbiol*, 1973, **19**: 873 ~ 875
- Somara S, Siddavattam D. Plasmid mediated organophosphate pesticide degradation by *Flavobacterium balustinum*. *Biochem Mol Biol Int*, 1995, **36**(3): 627 ~ 631
- Chen YL(陈亚丽), Zhang XN(张先恩), Liu H(刘虹), Wang YS(王银善), Xia XM(夏祥明). Study on *Pseudomonas* sp. WBC-3 capable of complete degradation of methyl-parathion. *Acta Microbiol Sin*(微生物学报), 2002, **42**(4): 490 ~ 497
- Megharaj M, Madhavi DR, Screenivasulu C, Umamaheswari A. Biodegradation of methyl-parathion by soil isolates of microalgae and cyanobacteria. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1994, **53**: 292 ~ 297
- Li SP(李顺鹏), Shen B(沈标), Wei SL(魏社林), Ji YL(季玉玲), Ding XG(丁先根), Jin CH(金存虎). Ecological effect of bacterium to degrade parathion methyl (PM) and its application. *Acta Pedol Sin* (土壤学报), 1996, **33**(4): 380 ~ 384
- Screenivasulu C, Aparna Y. Bioremediation of methylparathion by free and immobilized cells of *Bacillus* sp. isolated from soil. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2001, **67**: 98 ~ 105
- Rao AV, Sethunathan N. Degradation of parathion by *Penicillium waksmani* Zaleski isolated from flooded acid sulphate soil. *Arch Microbiol*, 1974, **97**(3): 203 ~ 208
- Siddaramappa R, Rajaram KP, Sethunathan N. Degradation of parathion by bacteria isolated from flooded soil. *Appl Microbiol*, 1973, **26**(6): 846 ~ 849
- Nelson LM. Biologically induced hydrolysis of parathion in soil: isolation of hydrolyzing bacteria. *Soil Biol Biochem*, 1982, **14**: 219
- Wang YJ(王永杰), Li SP(李顺鹏), Shen B(沈标). Isolation and activity of dimethoate-degrading strain. *J Nanjing Agric Univ*(南京农业大学学报), 2001, **24**(2): 71 ~ 74
- Harcourt RL, Horne I, Sutherland TD, Hammock BD, Russell RJ, Oakeshott JG. Development of a simple and sensitive fluorimetric method for isolation of coumaphos-hydrolysing bacteria. *Lett Appl Microbiol*, 2002, **34**(4): 263 ~ 268
- Shelton D. Isolation and characterization of coumaphos-metabolizing bacteria from cattle dip. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**: 2566
- Horne I, Harcourt RI, Sutherland TD, Russell RJ, Oakeshott JG. Isolation of a *Pseudomonas monteilli* strain with a novel phosphotriesterase. *FEMS Microbiol Lett*, 2002, **206**(1): 51 ~ 55
- Bhadbhade BJ, Sarnaik SS, Kanekar PP. Biomineralization of an organophosphorus pesticide Monocrotophos by soil bacteria. *J Appl Microbiol*, 2002, **93**(2): 224 ~ 234
- Singh S, Singh DK. Utilization of monocrotophos as phosphorus source by *Pseudomonas aeruginosa* F10B and *Clavibacter michiganense* subsp. insidiosum SBL 11. *Can J Microbiol*, 2003, **49**(2): 101 ~ 109
- Liu BB(刘斌斌), Zhao YF(赵永芳), Chao YP(钞亚鹏), Xie YM(谢裕民), Wang YS(王银善). Degradation of methamidophos by *Saccharomyces rouxii* WY-3. *Environ Sci*(环境科学), 2001, **22**(4): 37 ~ 41
- Cao ZF(曹志方), Wang YS(王银善). Biodegradation of methamidophos by microbes. *Adv Environ Sci*(环境科学进展), 1996, **4**(6): 32 ~ 41
- Cheng GF(程国锋), Li SP(李顺鹏), Shen B(沈标), Yang JH(杨军辉). Microbial degradation of residual pesticides in vegetable. *Chin J Appl Environ Biol*(应用与环境生物学报), 1998, **4**(1): 81 ~ 84
- Liu YH, Chung YC, Xiong Y. Purification and characterization of a dimethoate-degrading enzyme of *Aspergillus niger* ZHY256, isolated from sewage. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(8): 3746 ~ 3749
- Deshpande NM, Dhakephalkar PK, Kanekar PP. Plasmid-mediated dimethoate degradation *Pseudomonas aeruginosa* MCMB-427. *Lett Appl Microbiol*, 2001, **33**: 275 ~ 279
- Hasan HA. Fungal utilization of organophosphate pesticides and their degradation by *Aspergillus flavus* and *A. sydowii* in soil. *Folia Microbiol (Praha)*, 1999, **44**(1): 77 ~ 84
- Yang XR(杨晓蓉), Zong H(宗浩), Zheng G(郑鸽), Sun S(孙胜). The isolation and characterization of a strain of omethoate-degrading efficient bacteria. *J Sichuan Nor Univ*(四川农业大学学报), 2001, **24**(4): 392 ~ 394
- Racke KD, Coats JR. Enhanced degradation of isofenphos by soil mi-

- croorganisms. *J Agric Food Chem*, 1987, **35**: 94 ~ 99
- 29 Ohshiro K, Kakuta T, Sakai T, Hirota H, Hoshino T, Uchiama T. Biodegradation of organophosphorus insecticides by bacteria isolated from turf green soil. *J Ferment Bioeng*, 1996, **82**(3): 299 ~ 305
 - 30 Guha A, Kumari B, Bora TC, Roy MK. Possible involvement of plasmids in degradation of malathion and chlorpyrifos by *Micrococcus* sp. *Folia Microbiol*, 1997, **42**(6): 574 ~ 576
 - 31 Matsumura F. Malathion degradation by *Trichoderma viride* and a *Pseudomonas* sp. *Science*, 1966, **153**: 1278 ~ 1280
 - 32 Lewis DL, Paris DF, Baughman GL. Transformation of malathion by a fungus, *Aspergillus oryzae*, isolated from a freshwater pond. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1975, **13**(5): 596 ~ 601
 - 33 Hayatsu M, Hirano M, Tokuda S. Involvement of two plasmids in fenitrothion degradation by *Burkholderia* sp. Strain NF100. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(4): 1737 ~ 1740
 - 34 Karpouzias DG, Morgan JAW, Walker A. Isolation and characterization of ethoprophos - degrading bacteria. *FEMS Microbiol Ecol*, 2000, **33**: 209 ~ 218
 - 35 Vilanova E, Sogorb MA. The role of phosphotriesterases in the detoxication of organophosphorus compounds. *Crit Rev Toxicol*, 1999, **29**(1): 21 ~ 57
 - 36 Mulbry WW, Karns JS. Purification and characterization of three parathion hydrolases from Gram - negative bacterial strains. *Appl Environ Microbiol*, 1989, **55**: 289
 - 37 Harper LL, McDaniel CS, Miller CE, Wild JR. Dissimilar plasmids isolated from *Pseudomonas diminuta* MG and a *Flavobacterium* sp. (ATCC27551) contain identical *opd* genes. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**(10): 2586 ~ 2589
 - 38 Somara S, Manavathi B, Tebbe CC, Siddavatam D. Localisation of identical organophosphorus pesticide degrading (*opd*) genes on genetically dissimilar indigenous plasmids of soil bacteria: PCR amplification, cloning and sequencing of *opd* gene from *Flavobacterium balustinum*. *Indian J Exp Biol*, 2002, **40**: 774 ~ 779
 - 39 Horne I, Qiu XH, Russell RJ, Oakeshott JG. The phosphotriesterase gene *opdA* in *Agrobacterium radiobacter* P230 is transposable. *FEMS Microbiol Lett*, 2003, **222**(1): 1 ~ 8
 - 40 Benning MM, Shim H, Raushel FM, Holden HM. High resolution X - ray structure of different metal - substituted forms of phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *Biochemistry*, 2001, **40**: 2712 ~ 2722
 - 41 Benning MM, Kuo MJ, Raushel FM, Holden HM. Three - dimensional structure of the binuclear metal center of phosphotriesterase. *Biochemistry*, 1995, **34**: 7973 ~ 7978
 - 42 Benning MM, Hong SB, Raushel FM, Holden HM. The binding of substrate analogs to phosphotriesterase. *J Biol Chem*, 2000, **275**: 30556 ~ 30560
 - 43 Mulbry WW. The arylalkylphosphatase - encoding *adpB* from *Nocardia* sp. strain B - 1: cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli*. *Gene*, 1992, **121**: 149 ~ 153
 - 44 Ohshiro K, Ono T, Hoshino T, Uchiyama T. Characterization of isofenphos hydrolases from *Arthrobacter* sp. strain B - 5. *J Ferment Bioeng*, 1997, **83**(3): 238 ~ 245
 - 45 Ohshiro K, Kakuta T, Nikaidou N, Watanabe T. Molecular cloning and nucleotide sequencing of organophosphorus insecticide hydrolase gene from *Arthrobacter* sp. strain B - 5. *J Biosci Bioeng*, 1999, **87**(4): 531 ~ 534
 - 46 Horne I, Sutherland TD, Harcourt RL, Russell RJ, Oakeshott JG. Identification of an *opd* (organo - phosphate degradation) gene in an *Agrobacterium* isolate. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(7): 3371 ~ 3376
 - 47 ui ZL, Li SP, Fu GP. Isolation of methyl - parathion - degrading strain M6 and cloning of the methyl parathion hydrolase gene. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(10): 4922 ~ 4925
 - 48 Cheng TC, Harvey SP, Chen GL. Cloning and expression of a gene encoding a bacterial enzyme for decontamination of organophosphorus nerve agents and nucleotide sequence of the enzyme. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**(5): 1636 ~ 1641
 - 49 Richins RD, Kaneva I, Mulchandani A. Biodegradation of organophosphorus pesticides by surface - expressed organophosphorus hydrolase. *Nat Biotechnol*, 1997, **15**: 984 ~ 987
 - 50 Chen W, Mulchandani A. The use of live biocatalysts for pesticide detoxification. *Trends Biotechnol*, 1998, **16**: 71 ~ 76
 - 51 Mulchandani A, Kneva I, Chen W. Detoxification of organophosphate nerve agents by immobilized *Escherichia coli* with surface - expressed organophosphorus hydrolase. *Biotechnol Bioeng*, 1999, **63**(2): 216 ~ 223
 - 52 Sioudi B, Grimsley JK, Lai K, Wild JR. Modification of near active site residues in organophosphorus hydrolase reduces metal stoichiometry and alters substrate specificity. *Biochemistry*, 1999, **38**: 2866 ~ 2872
 - 53 Cho CM, Mulchandani A, Chen W. Bacterial cell surface display of organophosphorus hydrolase for selective screening of improved hydrolysis of organophosphate nerve agents. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(4): 2026 ~ 2030
 - 54 Mulbry WW, Delvalle PL, Karns JS. Biodegradation of the organophosphate insecticides coumaphos in highly contaminated soils and in liquid wastes. *Pestic Sci*, 1996, **48**(2): 149 ~ 155
 - 55 LeJeune KE, Mesiano AJ, Bower SB, Grimsley JK, Wild JR, Russell AJ. Dramatically stabilized phosphotriesterase - polymers for nerve agent degradation. *Biotechnol Bioeng*, 1997, **54**(2): 105 ~ 114
 - 56 Richins RD, Mulchandani A, Chen W. Expression, immobilization, and enzymatic characterization and cellulose - binding domain - organophosphorus hydrolase fusion enzymes. *Biotechnol Bioeng*, 2000, **69**(6): 591 ~ 597
 - 57 Gill L, Ballesteros A. Degradation of organophosphorous nerve agents by enzyme - polymer nanocomposites: efficient biocatalytic material for personal protection and large - scale detoxification. *Biotechnol Bioeng*, 2000, **70**(4): 400 ~ 410
 - 58 Mulchandani A, Pan S, Chen W. Fiber - optic enzyme biosensor for direct determination of organophosphate nerve agents. *Biotechnol Prog*, 1999, **15**(1): 130 ~ 134
 - 59 Mulchandani P, Mulchandani A, Kaneva I, Chen W. Biosensor for direct determination of organophosphate nerve agents 1: potentiometric enzyme electrode. *Biosens Bioelectron*, 1999, **14**(1): 77 ~ 85
 - 60 Wang J, Krause R, Block K, Musameh M, Mulchandani A, Schoning MJ. Flow injection amperometric detection of OP nerve agents based on an organophosphorus - hydrolase biosensor detector. *Biosens Bioelectron*, 2003, **18**(2 ~ 3): 255 ~ 260
 - 61 DiSioudi BD, Miller CE, Lai KH, Grimsley JK, Wild JR. Rational design of organophosphorus hydrolase for altered substrate specificities. *Chem Biol Interact*, 1999: 119 ~ 120; 211 ~ 223