

文章编号 :1003-8701(2009)04-0037-04

环境中有机磷农药降解方法的研究进展

张金花^{1,2},刘亚光¹,任金平²,韩润亭²,
郭晓丽²,刘晓梅²,李莉²

(1.东北农业大学,哈尔滨 150030;2.吉林省农业科学院植物保护研究所,吉林 公主岭,136100)

摘要:有机磷农药广泛应用于农业生产中,但是对环境造成了严重的污染。本文综述了有机磷农药的降解方法,主要是氧化降解、微生物降解、光催化降解方法,并介绍了降解酶的应用和未来研究的方向。

关键词:有机磷农药;降解方法;降解酶

中图分类号:X592

文献标识码:A

Progress of Studies on Degradation of Organic Phosphorus Pesticides in the Environment

ZHANG Jin-hua^{1,2}, LIU Ya-guang¹, REN Jin-ping², HAN Run-ting², GUO Xiao-li², LIU Xiao-mei², LI Li²

(1. Northeast Agricultural University, Harbin 150030; 2. Institute of Plant Protection, Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province, Gongzhuling 136100, China)

Abstract: Organic phosphorus pesticides had been widely used in agricultural production, but they caused serious pollution. The degradation of organic phosphorus pesticides was reviewed in the paper, which mainly includes oxidative degradation, microbial degradation, photo-catalytic degradation. The application of degrading enzyme and the direction of the future research were also introduced.

Keywords: Organic phosphorus pesticides; Degradation methods; Degradation enzyme

20世纪60年代以来,许多国家开始禁止或限制使用有机氯农药,以致有机磷农药逐步发展成为目前应用广泛、品种最多的农药。但有机磷农药大多为神经毒素,抑制神经钠通道或乙酰胆碱酯酶,对人等非靶标生物会产生直接或间接毒性效应;有机磷农药对广泛分布于细胞膜上的ATP酶(腺苷三磷酸酶)的活性有一定的影响;有机磷农药可影响免疫系统^[1];有机磷杀虫剂大部分是弱的烷化剂,能与鸟嘌呤碱基起甲基化作用。长期大规模生产和使用有机磷农药,不仅对环境造成严重污染,在食物及饲料中的残留对人及养殖动物也有严重的影响,在某些环境中也会有较长的残存期并在动物体内产生蓄积作用。所以需要经济方便、安全实用的净化措施消除有机磷农药的污

染,妥善的解决有机磷农药生产使用和环境保护的问题。

因此研究有机磷农药的降解具有广泛的应用前景和重大的应用价值。有机磷农药的降解主要有生物降解、光化学降解、化学降解等方式,其中生物降解的作用占重要地位。生物降解主要是微生物降解。国外从20世纪50年代,我国从20世纪60年代开始研究有机磷农药的治理技术,确认微生物降解有机磷农药具有费用省、环境影响小、可最大限度降低污染物浓度、可用于其他技术难以应用的场地等优点。

1 常见有机磷农药降解的方法

1.1 氧化降解

化学氧化是降解有机磷农药的有效方法,通过化学反应被氧化为微毒或无毒的物质,从而达到处理的目的。常用的氧化剂有过氧化氢、过碳酸钠、铈配合物等。国外在H₂O₂降解农药方面的研

收稿日期:2008-12-28;修回日期:2009-02-25

作者简介:张金花(1978-),女,研究实习员,在读硕士,主要从事生物农药、植物病理的研究。

究主要集中在 3 个方面：将 H_2O_2 与 Fe^{3+} 或 Fe^{2+} 组成 Fenton 时，通过氧化还原反应处理各种农药污染物；由于过氧化氢反应活性强，生成水和氧气，不产生 2 次污染，不会引起废水的盐碱化，过量使用也不会引发污染问题，被称为“最清洁”的化学品。方剑锋等^[2]研究了过氧化氢对甲胺磷、毒死蜱、久效磷的降解性能及影响因素，得到用过氧化氢处理的有机磷农药比不加时的降解率提高 5~13 倍。过碳酸钠在水中离解成碳酸钠和过氧化氢，能产生有效氧降解有机磷农药，另外，溶于水之后成碱性，可加快降解，是一种新型的氧化剂。吴勇勇等^[3]通过气相色谱仪测定有机磷农药降解率，研究对甲基磷、甲基对硫磷有明显的降解效果，由于过碳酸钠不稳定，溶于水后很快会分解，所以增加过碳酸钠用量与延长降解时间虽可使降解率增加，但效果并不明显。汪东风等^[4]根据糖铈配合物能有效的切断核酸中磷酸二酯键的原理，利用铈配合物降解含磷脂键有机磷农药的作用，研究了不同铈配合物在体外对其的降解作用。结果表明，在各种糖铈配合物中，果糖及半乳糖的铈配合物对甲胺磷的降解作用较好。

1.2 生物降解

由于传统的物理和化学方法降解有机磷农药虽然效果不错，但成本太高且容易造成二次污染，因此只能作为一种辅助手段加以利用。随着生物技术的不断发展，对有机磷农药的降解进行了探索，充分肯定了微生物在降解中的重要作用。微生物主要包括细菌、真菌、放线菌、藻类等，其中细菌由于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。微生物具有种类多，变异快和易于操纵的特点，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得到鉴定，少数有机磷农药降解基因已得到分离、鉴定、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出广阔的应用前景。郑天凌等^[5]从沿岸海域分离了 38 株有机磷农药的耐药菌，用分批培养法进行富集培养，得到有机磷农药的降解菌，并着重研究了其中两株菌对甲胺磷农药的降解情况。结果表明，在 10 d 内，降解菌株 1 比降解菌株 2 的降解率高 6%，在各自的甲胺磷培养液中，降解菌株 1 的数量也多于 2，在降解过程中降解菌株 1 的毒性要比 2 下降幅度大。张瑞福等^[6]采用添加有机磷农药的选择性培养基，在长期受有机磷农药污染的土壤中分离到 7 株有机磷农药降解菌。

经生理生化鉴定和系统发育分析，16 Sr DNA 序列同源比较，系统发育分析和染色体 ERIC-PCR 指纹图谱扩增表明有机磷农药长期污染的土壤中有有机磷农药降解菌具有丰富的多样性。在进一步的研究中，张瑞福等^[7]又对分离自同一有机磷农药污染土壤的 7 株有机磷农药降解菌的降解特性进行了比较，7 株降解菌都能利用甲基对硫磷为唯一碳源生长，并生成中间代谢产物对硝基苯酚。对硝基苯酚的降解经过一段延滞期，不同菌株降解对硝基苯酚的能力和延滞期有很大差异，丰富了有机磷农药降解菌的多样性，并比较了分离至同一污染土壤的有机磷农药降解菌的降解特性，微生物具有降解农药的功能，优良菌株被不断地从受农药污染的土壤和水体中筛选出来。近年来人们开始尝试着运用基因工程的手段创建农药降解工程菌株。王永杰等^[8]以一株可广谱降解有机磷农药的地衣芽孢杆菌为出发菌株，进行了紫外诱变和甲胺磷梯度平板选育高效降解甲胺磷突变株的研究。筛选出突变菌株 P_{12} ，在 $\theta = 30^\circ C$ ，溶解氧 215 mg/L 的培养条件下，在 3 d 内对甲胺磷的降解率为 80.11%，比出发菌株提高了将近 10% 的降解率，农药斜面连续传代 10 次，降解活力保持稳定。有机磷农药降解酶可降解有机磷农药分子，破坏有机磷的磷酸酯键而使其脱毒。由于各种有机磷农药都有类似的结构，只是取代基不同，所以一种有机磷农药降解酶往往可降解多种有机磷农药。20 世纪 80 年代，Munnecke^[9]等发现有机磷农药降解酶比产生这类酶的微生物菌体更能忍受异常环境条件，如来源于假单胞菌的降解酶在 10% 的无机盐、1% 的有机溶剂、50℃ 下都能保持高活性，而该酶的产生菌在同样的条件下却不能生长。而且，酶的降解效果远远胜过微生物本身，特别是对低浓度的农药。因此，研究从应用微生物菌体净化农药污染转向利用有机磷农药降解酶。闫艳春等^[10]用抗性库蚊酯酶基因，引入原核表达载体 pRL439，转化大肠杆菌 HB101 细胞，获得表达。通过酶切、Southern 杂交鉴定重组质粒。研究了重组菌酯酶的活性，重组质粒 pRL-B1 表达的酯酶具有高酶活并能高效降解酯酶的特异性底物 a- 乙酸萘酯和 b- 乙酸萘酯，经对重组菌进行细胞固定化后降解有机磷农药对硫磷，反应时间短，降解效率高。刘玉焕等^[11]把华丽曲霉 Z58 有机磷农药降解酶经硫酸铵分级沉淀，SephadexG100 凝胶过滤、DEAE52 离子交换层析得到了分离纯化，用聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定为单一组分。该酶的

最适反应温度 45℃,对热较稳定,并且能在 pH 值 6~10 范围内保持活性。重金属 Cu^{2+} 对该酶具有明显的促进作用,而 SDS 对酶具有抑制作用。此酶对所试的有机磷农药都有良好的降解作用。

1.3 光催化降解

光催化是用光激发催化剂产生光生电子空穴,光生空穴与 H_2O 、 OH^- 作用产生强氧化性的 $\cdot\text{OH}$,无选择性地 将 污 染 物 完 全 降 解 为 H_2O 、 CO_2 、 PO_4^{3-} 等,无 2 次污染。 TiO_2 具有光化学性质稳定、无毒、价廉等优点而被广泛应用,徐悦华等^[12]以纳米 TiO_2 作催化剂的光催化法处理有机磷农药模拟废水和实际应用的有机磷农药的可行性,为农药污染的防治提供了科学方法依据和理论依据。实验表明,用测定不同时间 PO_4^{3-} 的浓度来衡量有机磷的降解率,并以此来衡量有机磷农药及其中间产物降解的程度是合理的。光催化降解甲胺磷和水胺硫磷的结果,显示了有机磷农药的降解率与其结构有关,实际应用的有机磷农药也可用光催化降解。苏茜等^[13]综述了 TiO_2 光催化降解有机磷农药的机理和多种影响因素。通常情况下,分散的越好,受紫外线照射的面积越大,产生的电子空穴越多,同时空穴迁移到粉体粒子表面的越多,光催化活性就越高。而且在强碱性及强酸性条件下对催化降解有利;有机磷农药降解率随 TiO_2 用量增加而增大,但超过最佳值后,降解率反而下降;只有在光照、光催化剂和氧气同时存在的条件下才能降解为无机磷。无氧气存在时,有机磷农药不能被光催化降解;当空气通入量增大时,光降解率急剧增加;反应液中加入微量的 Fe^{3+} 可以提高降解率,但超过最佳值后,又逐渐下降。在 TiO_2 中掺杂少量的某些金属离子,由于这些离子存在多化合价,可成为光生电子空穴对的浅势捕获阱,延长电子与空穴的复合时间,从而提高光催化性。

2 有机磷降解菌及降解酶的应用

2.1 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^[14]等将假单胞菌 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^[15]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 等将甲基对硫磷矿化菌株假单胞菌 (*P. sp.*) A3 固定在硅藻钠珠中,在约 48 h 内降解 99% 的 1 Mm 的甲基对硫磷,没有任何中间代谢物积累。Mulbry^[16]等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 0.1 mg/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。

2.2 降解酶的应用

2.2.1 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(organophosphate hydrolase) 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。

OPH 固定在聚合尿烷 (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^[17]。一种新型的 OPH 催化剂形式,叫纳米复合物蛋白-硅酮聚合体,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^[18]。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^[19]。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。

2.2.2 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、电势计和安培计生物传感器^[20-22],可以快速、敏感、选择性、直接检测有机磷化合物。

2.2.3 有机磷中毒的解毒剂或预防剂

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。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(DFEP)。另外,用红血细胞载体(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^[23]。

3 展 望

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。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。在以后的发展中,开发和利用有机磷农药高效降解菌,建立高效降解菌的种子库;在识别降解酶基因的基础上,对降解菌基因进行克隆与表达,构建工程菌,提高降解能力,制备降解酶;研究有机磷农药微生物的降解机理、代谢途径等是未来研究的发展方向。

参考文献:

[1] Laudio Colosio, Emanuela Corsini, Wilma Barcellini, et al. Immune parameters in biological monitoring of pesticide exposure: current knowledge and perspectives [J]. *Toxicology Lett*, 1999, 108: 285-295.

[2] 方剑锋,曾鑫年,熊忠华,等. 过氧化氢降解有机磷农药的研究[J]. *华南农业大学学报*, 2004, 25(1): 44-47.

[3] 吴勇勇,吴运军,等. 过碳酸钠对有机磷农药的降解效果[J]. *安庆师范学院学报*, 2001, 7(1): 34-36.

[4] 汪东风,罗轶,等. 铈配合物对有机磷农药的降解作用[J].

中国海洋大学学报, 2004, 34(4): 577-581.

[5] 郑天凌,鄢庆彬,林良牧,等. 海洋微生物对甲胺磷农药的降解作用[J]. *台湾海峡*, 1999, 8(1): 95-99.

[6] 张瑞福,吴旭平,樊奔,等. 污染土壤中有有机磷农药降解菌的分离及其多样性[J]. *生态学报*, 2005, 25(6): 1502-1508.

[7] 张瑞福,戴青华,何健,等. 七株有机磷农药降解菌的降解特性比较[J]. *中国环境科学*, 2004, 4(5): 584-587.

[8] 王永杰,李顺鹏,沈标,等. 有机磷农药降解菌的紫外诱变育种[J]. *应用环境生物学报*, 1999, 5(6): 635-637.

[9] Munnecke Irene Horne. *Applied and environmental microbiology*, 2002, 68(7): 3371-3376.

[10] 闫艳春,姚良同,等. 工程菌及其固定化细胞对有机磷农药的降解[J]. *中国环境科学*, 2001, 21(5): 412-416.

[11] 刘玉焕,钟英长. 华丽曲霉 Z58 有机磷农药降解酶的纯化和性质[J]. *微生物学报*, 2000, 40(4): 430-434.

[12] 徐悦华,古国榜,伍志锋,等. 纳米 TiO₂ 光催化降解有机磷农药的研究[J]. *土壤与环境*, 2001, 10(3): 173-175.

[13] 苏茜,张勇. 二氧化钛光催化降解有机磷农药的机理和影响因素[J]. *广州化学*, 2005, 30(1): 52-57.

[14] 曹志方,王银善. 甲胺磷农药的微生物降解[J]. *环境科学进展*, 1996, 4(6): 32-41.

[15] 李顺鹏,沈标,魏社林,等. 甲基对硫磷降解菌的生态效应及应用[J]. *土壤学报*, 1996, 33(4): 380-384.

[16] Mulbry WW, Delvalle PL, Karns J S. Biodegradation of the organophosphate insecticides coumaphos in highly contaminated soils and in liquid wastes [J]. *Pestic Sci*, 1996, 48(2): 149-155.

[17] LeJeune KE, Mesiano AJ, Bower SB, et al. Dramatically stabilized phosphotriesterase - polymers for nerve agent degradation[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1997, 54(2): 105-114.

[18] Richins RD, Mulchandani A, Chen W. Expression, immobilization and enzymatic characterization and cellulose binding domain organophosphorus hydrolase fusion enzymes [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2000, 69(6): 591-597.

[19] Gill L, Ballesteros A. Degradation of organophosphorous nerve agents by enzyme - polymer nanocomposites: efficient biocatalytic material for personal protection and large - scale detoxification[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2000, 70(4): 400-410.

[20] Mulchandani A, Pan S, Chen W. Fiber - optic enzyme biosensor for direct determination of organophosphate nerve agents [J]. *Biotechnol Prog*, 1999, 15(1): 130-134.

[21] Mulchandani P, Mulchandani A, Kaneva I, et al. Biosensor for direct determination of organophosphate nerve agents 1: potentiometric enzyme electrode[J]. *Biosens Bioelectron*, 1999, 14(1): 77-85.

[22] Wang J, Krause R, Block K, et al. Flow injection amperometric detection of OP nerve agents based on an organophosphorus - hydrolase biosensor detector [J]. *Biosens Bioelectron*, 2003, 18(2-3): 255-260.

[23] DiSioudi BD, Miller CE, Lai KH, et al. Rational design of organophosphorus hydrolase for altered substrate specificities[J]. *Chem Biol Interact*, 1999: 119-120, 211-223.