

Advances in Microbial Degradation of Organophosphates and Organophosphorus Hydrolase

Jinbin WANG^{1,2}, Furong TAN^{1,2}, Lingxi JIANG^{1,2}, Ligang WANG¹, QI Yang¹, Xueming TANG^{1,2*}

¹Biotech Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai, China

²The Supervision, Inspection and Test Center for Environmental Safety of GM Crops of the MOA, Shanghai, China

Email: wangjinbin2002@yahoo.com.cn

Abstract: Residual organophosphorous pesticides in environment could be degraded or decreased effectively by means of microbial degradation and organophosphorus hydrolase. The advances of the organophosphate biodegradation, including the species of the organophosphorous pesticides-degrading microorganisms, organophosphorus hydrolase, the degradation related genes and the application of organophosphorus hydrolase are reviewed in this paper, it can provide a support for the solution of the pesticides pollution in the environment and pesticide residues in agricultural products.

Keywords: Organophosphates (OPs); microbial degradation; organophosphorus hydrolase; the degradation related gene

有机磷农药降解微生物及其降解酶的研究进展

王金斌^{1,2}, 谭芙蓉^{1,2}, 蒋玲曦^{1,2}, 王利刚¹, 杨奇¹, 唐雪明^{1,2*}

¹上海市农业科学院生物技术研究所, 上海, 中国, 201106

²农业部转基因植物环境安全监督检验测试中心, 上海, 中国, 201106

Email: wangjinbin2002@yahoo.com.cn

摘要: 微生物及其降解酶是环境中有机磷农药的去毒或减毒降解处理的有效方法。文章综述了有机磷农药降解菌的种类、降解酶、编码基因、降解菌与降解酶应用等方面的研究现状及发展方向, 为解决环境中的农药污染和农产品农药残留问题提供帮助。

关键词: 有机磷农药; 微生物降解; 有机磷降解酶; 降解基因

1 引言

有机磷农药(organophosphates, OPs)具有杀虫效率高、防治范围广、成本低等特点, 在保护农作物免收病虫害侵染、提高粮食产量等方面发挥了巨大作用, 大大促进了农业生产, 但同时它们也对人类赖以生存的环境造成了严重的污染, 而且经常导致蔬菜和水果等农产品农药残留超标, 直接危害人们的身体健康^[1]。因此, 迫切需要建立一种有效方法用于治理环境污染以及去除农产品的农药残留。许多研究表明利用微生物及其降解酶对环境中有机磷农药的净化处理是行之有效的, 并已显示出良好的应用前景^[2]。本文主要对有机磷农药降解微生物及其降解酶的研究现状进行综述, 在减少或者消除有机磷农药广泛使用带来的诸多对环境和食物安全的负面影响方面具有重要的

现实意义。

2 降解有机磷农药的微生物

目前人们从土壤、水体底泥、污水处理厂出口的污泥等受有机磷农药污染的环境介质中, 筛选、驯化、富集和分离出许多可降解有机磷农药的微生物。这些微生物包括细菌、真菌、放线菌和藻类, 表1列出了几种主要有机磷农药的降解微生物^[3-20]。其中, 细菌由于其生化的多种适应能力以及易诱发突变菌株, 在降解有机磷农药的微生物中占有重要地位, 因此对细菌的研究较为深入; 真菌因其卓越的降解有机磷农药能力正逐渐引起重视, 但总体上发展不如细菌; 而放线菌和藻类的研究则相对较少。

从表1可以看出, 多种微生物可以降解同一种有机磷农药; 同时, 一种微生物也可降解多种有机磷农

资助信息: 上海市科委基础重点项目(项目编号: 10JC1413800)

药，体现了有机磷农药降解微生物的种类多样性以及某些微生物的功能多样性。但有些微生物只能用于特定种类农药的降解。

Table 1. Categories of the organophosphorous pesticides-degrading microorganisms
表 1.有机磷农药具有降解作用的微生物种类

农药	细菌	真菌	藻类
对硫磷	黄单胞杆菌属、短杆菌属、固氮极毛杆菌属、极瘤细菌属、节杆菌、不动杆菌属	青霉菌、木霉属、曲霉属	小球绿藻属
甲基对硫磷	假单胞菌属、芽孢杆菌属、黄杆菌属、短杆菌属、大比目鱼黄杆菌、产碱菌属、芽孢杆菌		微藻、
马拉硫磷	放射形土壤杆菌、假单胞菌属、节细胞菌属、黄杆菌属、极瘤细菌属	木霉属、曲霉属	
甲胺磷	假单胞菌属、芽孢杆菌属、蜡样芽孢杆菌属、嗜中温假单胞菌属	青霉菌、木霉属、曲霉属、酵母属、黑曲霉	
甲拌磷	假单胞菌属、硫杆菌属		小球绿藻属
苯硫磷	芽孢杆菌属		
敌敌畏	假单胞杆菌属	木霉属	
地虫磷		青霉菌、根霉属	
敌百虫		青霉菌	
乐果	芽孢杆菌属、不动菌属、铜绿假单胞菌	曲霉属、黄曲霉、黑曲霉、聚多曲霉	
久效磷	假单胞菌、黑蓝节杆菌、巨大芽孢杆菌、铜绿假单胞菌		
毒死蜱	微球菌		

3 有机磷农药微生物降解酶

大多数农药的微生物降解途径已经明了，微生物降解作用实质是酶促作用。大部分微生物通过分泌有机磷降解酶，以水解、氧化、脱氢、还原、合成等方式降解农药。可降解有机磷农药的酶的种类及主要作用位点见表2。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。有机磷农药降解酶目前已被公认为是消除农药残留的最有潜力的新方法^[21]。应用有机磷农药降解酶制剂比直接应用产酶的菌剂更有优势，产有机农药降解的天然菌株对农药降解缓慢且对保证菌株的正常生长的环境条件要求严格，而作为酶制剂直接应用时，其农药降解速度快，一般只需数分钟就可使农药80%以上降解，同时由于此酶的酶解条件要求并不严格，有利于其在生产实践中的实际应用。当然，应用有机磷农药降解酶必须解决一个关键性的问题，即如何工业化廉价生产有机磷农药降解酶。有机磷农药降解酶在原始天然菌株中含量太低，难以大量生产、生产成本高昂。近年来随着分子生物学及基因工程的发展，有机磷降解酶的基因工程的研究取得了一定的进展，为其大规模廉价生产奠定了基础。

Table 2. Categories of organophosphorus hydrolases and the target sites
表2. 有机磷农药降解酶的种类和主要作用位点

作用位点	酶的种类	酶的催化作用
P-O-烷基	水解酶	亲核进攻烷氧基。对硫磷、甲胺磷等有机磷农药降解途径
P-O-芳基	水解酶	对硫磷降解途径
O=P-NH ₂	水解酶	甲胺磷水解的主要途
-烷基	氧化酶	包括甲氧基、乙氧基等，有机磷农药降解去毒重要途径
-NO ₂	还原酶	将羟基还原成氨基
C-P	裂解酶	C-C键断裂，有机磷矿化的必经途径
-C-P	磷酸变位酶	分子内重排产生磷酸酯和磷酸烯醇式丙酮酸
苯环	氧化酶	羟基化，苯环开环

4 有机磷农药降解酶编码基因

研究表明，自然环境中的多种微生物可以单独或者通过协同作用降解有机磷农药。在土壤微生物中，许多农药降解基因存在于质粒上。目前已经从不同的微生物中分离到各种有机磷降解基因，表3列出了近年来国内外报道的几种有关有机磷降解基因类型及其定义、来源、同源性等情况。其中，有机磷水解酶OPH(organophosphate hydrolase)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-CN和P-S等),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。

从基因的同源性分析,对硫磷水解酶基因、质粒pcMSI磷酸二酯酶基因、有机磷水解酶基因以及磷酸酯水解酶基因均具有相似的序列,属于同源基因。而从mpd、apdB、oph、hocA、phnE与上述4种基因的序列差别比较大,属于非同源性基因。有机磷酸杀虫剂水解酶基因(oph)与芳香族羟基磷酸盐水解酶基因(apdB)也具有相似的序列,属于同源基因。而有机磷脱水酶基因(opaA)与oph属于非同源性基因,与其他基因的同源性不确定,有待于进一步的研究确定。基因序列的细微差别,所编码的蛋白质降解酶对有机磷农药的降解利用具有选择性,即某一基因序列编码特定的降解酶,对某种结构的有机磷农药具有较高的降解率。

Table 3. The genes of organophosphorus pesticides degradation
表 3. 降解有机磷农药的相关基因

名称	定义	菌株来源	大小 (bp)	同源性	文献 来源
opd	对硫磷水解酶基因	<i>Flavobacterium</i> sp.ATCC27551	1098	同源	[11]
Opd质粒	磷酸二酯酶基因	<i>Pseudomonas</i> <i>diminuta</i> MG	1098	同源	[12]
opdA	磷酸酯水解酶基因	<i>Agrobacterium</i> <i>tume faciens</i>	1240	同源	[13]
mpd	甲基对硫磷水解酶基因	<i>Plesiumonas</i> sp.Stain M6	2191	与opd非同源	[14]
adpB	芳香族羟基磷酸盐水解酶基因	诺卡氏菌B-1	1600	与opd非同源	[15]
oph	有机磷杀虫剂水解酶基因	<i>Arthrobacter</i> sp.B-5	1248	与apdB同源	[16]
opdA	有机磷水解酶基因	<i>Agrobacterium</i> <i>radiobacter</i>	1155	同源	[17]
opdA	有机磷脱水酶基因	<i>Alteromonas</i>	1554	与opd非同源	[3]
hocA	磷酸三酯酶基因	<i>P.monteilli</i> C11	501	与opd非同源	[18]
phnE	二异丙基(氟)磷酸酯降解基因	<i>E.coil</i> K-12 JA221	--	与opd非同源	[19]

5 有机磷降解菌及降解酶的应用

5.1 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^[22]等将假单胞菌WB-1和瓶形酵母菌WY-2组成的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 800mg / 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^[23]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含量比对照下降了82.2%~100%。此外,程国锋^[24]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。Mulbry^[25]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7~10d内可将污水中1500mg / L的蝇毒磷降低到0.1 mg / L。总之,降解菌的制剂已经开始走向实际应用,它可以有效去除土壤、蔬菜、污水中的农药。

4.2 降解酶的应用

(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。

(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,国外现在已经基于OPH开发了光学、电势计和安培计生物传感器,可以快速、敏感、选择性、直接检测有机磷化合物。

(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,以消除有机磷神经毒剂对人体的伤害。

(4) 蔬菜瓜果等农产品农药残留的洗涤消解

有机磷农药降解酶作用于农产品残留农药的有机磷分子,降解后的溶液是无毒的水溶液,对环境不会有二次污染。利用农药降解酶是既安全又彻底去除新鲜蔬菜瓜果等农产品上残留农药的最好办法。

4.3 降解有机磷农药微生物的展望

随着新的降解微生物、降解酶的发现以及现代分子生物技术和基因工程技术的发展,结合当前降解有机磷农药微生物及其降解菌存在的问题,以下几个方面将成为其研究的发展方向:

(1) 微生物生长速率或生长量低是生物修复化学污染过程中急需解决的问题。通过多途径、多方法分离和筛选具有高效降解有机磷农药特性的菌株,构建高效降解菌的种子库;

(2) 在识别降解酶基因的基础上,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、提高降解能力将成为当今环境生物技术的研究热点。

(3) 研究有机磷农药微生物的降解机理、代谢途径以及酶的分子结构,从酶工程学角度提高酶的降解能力,从而制备稳定、高活力的农药降解酶。

(4) 加快有机磷农药降解酶的酶学研究,采用固定化酶方法或者生物酶反应器用于有机磷的降解;

References (参考文献)

- [1] H. Atterby, N. Smith, Q. Chaudhry, D. Stead, Exploiting microbes and plants to clean up pesticide contaminated environments, *Pestic.Outlook* 2002 (13):9-13.
- [2] W.W. Mulbry, The arylalkylphosphatase-encoding gene *adpB* from *Nocardia* sp. strain B-1: cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli*, *Gene* 1992 (121):149-153.
- [3] Bai Wenqin, He Fengqin, Qiu Xinghui. *Advances in biodegradation of organophosphates*[J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2004,10(5):P675-680(Ch).
柏文琴,何凤琴,邱星辉. 有机磷农药生物降解研究进展[J], *应用与环境生物学报*, 2004,10(5),P 675-680.
- [4] Z. Cui, S. Li, G. Fu, Isolation of methyl parathion-degrading strain M6 and cloning of the methyl parathion hydrolase gene, *Appl.Environ. Microbiol.* 2001 (67):4922-4925.
- [5] I. Horne, T.D. Sutherland, R.L. Harcourt, R.J. Russell, J.G.Oakeshott, Identification of an *opd* (organophosphate degradation) gene in an *Agrobacterium* isolate, *Appl. Environ.Microbiol.* 2002 (68):3371-3376.
- [6] H. Irene, T.D. Sutherland, J.G. Oakeshott, R.J. Russell, Cloning and expression of the phosphotriesterase gene *hocA* from *Pseudomonas monteilii* C11, *Microbiology* 2002 (148) 2687-2695.
- [7] K. Ohshiro, T. Kakuta, N. Nikaidou, T. Watanabe, T. Uchiyama, Molecular cloning and nucleotide sequencing of organophosphorus insecticide hydrolase gene from *Arthrobacter* sp. strain B-5, *J. Biosci.Bioeng.* 1999 (87):531-534.
- [8] D.R. Richard, K. Irina, M. Ashok, C. Wilfred, Biodegradation of organophosphorus pesticides by surface-expressed organophosphorus hydrolase, *Nat. Biotechnol.* 1997 (15) 984-987.
- [9] N.F. Wu, M.J. Deng, X.Y. Chu, G.Y. Liang, B. Yao, Y.L. Fan, Isolation, purification and characterization of a new organophosphorus hydrolase OPHC2, *Chin. Sci. Bull.* 2004 (49) 268-272.
- [10] Tejomye S. Bhalerao, Pravin R. Puranik. Microbial degradation of monocrotophos by *Aspergillus oryzae*[J]. *International Bio-deterioration & Biodegradation* ,2009 (63):503-508.
- [11] Mulbry WW, Kams J S. Parathion hydrolase specified by *Lhe flavobacterium opd* gene: relationship between the gene and protein[J]. *Bacteriol*, 1989, 171(12):6740-6746.
- [12] Mcdaniel C S, Harper I L, Wild J R. Cloning and sequencing of a plasmid? Brone gene(*opd*) encoding a phosphotriesterase[J]. *Bacteriol*, 1988, 17(5):2306-2311.
- [13] Irene Horne, Tara D. Identification of an *opd* (Organophosphate Degradation) gene in an *Agrobacterium* isolate[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(7):3371-3376.
- [14] Cui Z L, Li S P, Fu G P. Isolation of methyl-parathion-degrading strain M6 and cloning of the methylparathion hydrolase gene[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(10):4922-4925.
- [15] Mulbry W W, Kams J S. Purification and characterization of three parathion hydrolases from Gram-negative bacterial strains[J]. *Appl Environ Micro-biol*, 1989, 55:289.
- [16] Ohshiro K, Ono T, Hoshino T, Uchiyama T. Characterization of isofenphos hydrolases from *Arthrobacter* sp. strain B-5[J]. *Ferment Bioeng*, 1997, 83:238-245.
- [17] Irene Horne, Tara D. Identification of an *opd* (Organophosphate degradation) gene in an *Agrobacterium* isolate[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(7):3371-3376.
- [18] Horne I, Harcourt R I, Sutherland T D, Russell R J, Oakeshoot J G. Isolation of a *Pseudomonas monteilii* strain with an *ovel* phosphotriesterase[J]. *FEM S Microbiol Lett*, 2002, 206(1):51-55.
- [19] Ilya Elashvili, Joseph J Defrankr, Valeria C Culotta. *PhnE* and *glpT* gene chance utilization of organophosphates in *Escherichia coli* K12? [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 67(7):2601-2608.
- [20] Liu Yuhuan, Zhong Yingchang. Purification and properties of degrading enzyme of organophosphorus pesticides from *aspergillus ornatius* Z58 [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2000, 40(4):P430-434.
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), P430-434.
- [21] Wu Ningfeng, Liang Guoyi, Deng Minjie. The development of the research on genetic engineering of organophosphorus Acid Hydrolase[J]. *Biotechnology bulletin*, 2003, 5:P9-12(Ch).
伍宁丰, 梁果义, 邓敏捷, 有机磷农药降解酶及其基因工程研究进展[J], *生物技术通报*, 2003, (5), P9-12.
- [22] Cao Zhifang, Wang Yinshan. Biodegradation of methamidophos by microbes. *Adv Environ Sci*, 1996, 4(6):P32-41(Ch).
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):P32-41.
- [23] Li Shunpeng, Shen Biao, Wei Shelin. Ecological effect of bacterium to degrade parathion methyl(PM) and its application. *Acta Pedol Sin*, 1996, 33(4):P380-384(Ch).
李顺鹏, 沈标, 魏社林, 甲基对硫磷降解菌的生态效应及应用[J], *土壤学报*, 1996, 33(4):P380-384.
- [24] Cheng Guofeng, Li Shunpeng, Shen Biao. Microbial degradation of residual pesticides in vegetable. *Chin J Appl Environ Biol*, 1998, 4(1):P81-84(Ch).
程国锋, 李顺鹏, 沈标, 微生物降解蔬菜残留农药研究[J], *应用与环境生物学报*, 1998, 4(1):P81-84.
- [25] Mulbry WW, Delvalle PL, Kams JS. Biodegradation of the organophosphate insecticides coumaphos in highly contaminated soils and in liquid wastes. *Pestic Sci*, 1996, 48(2):149-155.