

微生物在土壤污染中的生物修复作用

王伟霞¹, 李福后¹, 王文锋²

(1. 江苏省海洋生物技术重点建设实验室 淮海工学院 海洋学院, 江苏 连云港 222005; 2. 新乡医学院 生命科学技术系, 河南 新乡 453003)

摘要: 综述了微生物技术修复农药、除草剂、多环芳烃以及重金属等污染土壤的研究进展, 并展望了未来的发展方向。

关键词: 微生物; 土壤; 污染; 生物修复

中图分类号: S 606⁺ 1 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-0009(2010)04-0208-04

近年来, 随着我国经济的不断发展, 环境污染问题日益严重。在环境污染问题中的土壤污染尤为突出。这些污染物主要来自于工业泄漏、农业使用, 以及生活垃圾等, 涉及农药、除草剂、多环芳烃以及重金属等各种有毒物质。

针对土壤污染问题, 传统的物理化学消除方法已经很难有所作为。首先, 我国幅员辽阔, 受污染土壤面积巨大; 其次, 土壤多为多重交叉污染, 导致采用一种物理化学方法很难彻底消除多种有毒物质, 且极易造成二次污染。研究表明, 利用微生物技术修复污染土壤是一种行之有效的办法^[1-4]。微生物资源丰富, 代谢途径多样, 且操作方法相对成熟, 使之具有修复多重污染土壤的巨大潜力。现就微生物技术消除污染土壤中的农药、除草剂、多环芳烃以及重金属等研究进展进行简要概述。

1 微生物修复农药污染土壤

造成土壤污染的农药主要有有机氯农药和有机磷农药两大类。有机氯农药主要包括六六六(HCH)、DDT、氯丹以及七氯等, 是20世纪大规模使用过的高残毒农药, 其毒性大, 难降解, 代谢周期长, 如HCH在土壤中被分解95%所需最长时间约20年, DDT的化学性质同样比较稳定, 虽然已经禁止使用近30年, 环境中仍有大量残留^[5-9]。

有机氯农药具有一定的挥发性和强脂溶性, 能通过食物链在生物体中富集, 对生态系统和人类健康造成危害^[7]。微生物降解在消除有机氯农药过程中占有重点地位, 目前已经分离出多种降解菌株。方玲以HCH作为唯一碳源, 先后得到芽孢杆菌属(*Bacillus*)、无色杆菌属(*Achromobacter*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)等3株

细菌, 其对HCH总量的降解率分别为59.6%、56.9%和56%, 对 β -HCH的降解率分别为55.9%、57.6%和56.9%^[8]。李红权等从DDT污染的土壤中筛选出1株寡养单胞菌属D-1(*Stenotrophomonas* sp.), 其对DDT降解10 d的降解率为69.0%^[9]。

有机氯农药的降解需要多种酶共同参与。Imai等从*P. paucimobilis* UT26中克隆到基因linA, 该基因大小为465 bp, 编码产生16.5 kDa HCH脱氯化氢酶LinA, 将 γ -HCH转化为1, 2, 4-三氯苯^[10]。Sharma等分别从*Sphingobium indicum* B90A、*S. japonicum* UT26和*S. francense* Sp+中克隆到基因linB, 该基因编码产生氯化物水解酶LinB, 将 β -HCH和 δ -HCH转化为PCHL^[11]。

有机磷农药主要包括甲胺磷、甲基 1605、1605、乐果、毒死蜱以及敌敌畏等, 是当今农药中的主要类别, 商品已达150多种, 其对土壤呼吸等生态系统造成重大影响^[12-13]。关于有机磷农药的微生物降解国内外的研究报道较多, 目前已经分离出多种降解菌株, 纯化了多种降解酶, 克隆并表达了众多降解酶基因^[14-15]。中国农科院范云六、伍宁丰等首次在世界上成功研制出“有机磷农药降解酶制剂”, 该系统有机磷降解酶表达量达到6 g/L, 是目前国内外报道的最高有机磷降解酶表达量, 且表达有机磷降解酶的重组毕赤酵母具有良好的安全性, 无抗药性标记, 培养过程中不分泌有毒物质。

2 微生物修复除草剂污染土壤

我国是农业大国, 除草剂在我国得到广泛应用, 主要包括三氮苯类、咪唑啉酮类、磺酰胺类以及三唑嘧啶磺酰胺类等。其中草甘膦、乙草胺和丁草胺是我国使用最多的3种除草剂^[16-17]。除草剂的使用对防治草害、降低劳动力强度以及农业增产增收起着积极的作用, 然而也污染了农业生态环境, 对后茬作物表现出伤害。微生物降解是消除除草剂污染的重要途径, 其主要反应有脱卤、脱烷基、水解、氧化、环羟基化与裂解、硝基还原以及缀合作用等^[18]。

土壤中能够降解草甘膦的微生物广泛存在。研究

第一作者简介: 王伟霞(1977-), 女, 硕士, 讲师, 现从事微生物学以及生物活性物质研究工作。E-mail: weixiawang@163.com。

基金项目: 江苏省海洋生物技术重点建设实验室开放课题资助项目(2007HS010)。

收稿日期: 2009-11-20

表明,草甘膦降解途径主要有两条,C-N 断裂生成氨甲基磷酸(AMPA)和C-P 断裂生成肌氨酸,然后进一步代谢为磷酸、甘氨酸和CO₂等^[19-21]。郑永良等从土壤中筛选到6株草甘膦降解菌,包括2株细菌,4株真菌,真菌HS-04和HS-05均能以草甘膦作为唯一碳源和氮源生长,6d对草甘膦的降解率分别为85%和91%^[21]。石成春研究了曲霉B21降解草甘膦的特性及其动力学模型,发现在pH 6.0、300 mg/L草甘膦和7 g/L葡萄糖组成的共基质底物系统中,草甘膦降解率为97%^[22]。

冯慧敏等对黑土环境中乙草胺的微生物降解特征进行研究,表明微生物活性是影响乙草胺降解的主要因素,且细菌比真菌具有更强的降解能力^[23];真菌对乙草胺有更强的耐受能力,施用乙草胺后的整个培养过程中,土壤真菌标识物磷脂脂肪酸(PLFAs)数量始终低于对照,表明乙草胺对真菌的抑制可能是长期而不可逆的^[24]。另外,乙草胺等除草剂对根瘤菌、AMF等土壤微生物产生较大影响,可能抑制菌根与根瘤的形成^[25]。

丁草胺是一种内吸传导型苯乙酰胺类除草剂,其在土壤中的降解主要是微生物降解所致^[26]。虞云龙等测定了小麦等根围土壤和非根围土壤中丁草胺的降解特征和降解菌变化动态,根围土壤中丁草胺的降解是非根围土壤1.63~2.34倍,表明根围土壤丰富的微生物对丁草胺的降解具有显著的促进作用^[27]。李川等分离出1株茄类镰刀菌(*F. sp. solani*),其对丁草胺具有较强的降解能力,可达97.4%^[28]。楚小强等分离到1株能以丁草胺为唯一碳源和能源生长的施氏假单胞菌BD-1,在接种量为菌浓度OD₄₁₅=0.2, pH 7.0, 30℃条件下,其对丁草胺的降解符合一级动力学特征,主要降解产物为2-氯-2',6'-二乙基乙酰胺和2,6-二乙基苯胺^[29]。

3 微生物修复多环芳烃污染土壤

多环芳烃(PAHs)是指2个或2个以上的苯环以链状、角状或串状排列组成的化合物,是有机质不完全燃烧或高温裂解的副产品,人类活动特别是化石燃料的燃烧是环境中多环芳烃的主要来源^[30]。多环芳烃具有致癌、致畸以及致突变性,能够通过食物链进入人体,对人类健康造成威胁^[31]。

自然界中许多微生物都具有降解多环芳烃的能力,它们主要以两种方式进行代谢:一种是以PAHs为唯一碳源和能源,另一种是与其它有机质共代谢,其中的共代谢作用对于难降解PAHs的彻底分解或矿化起主导作用^[32-33]。

萘是多环芳烃的主要成员,其降解研究对整个家族有重要意义。蔡宝立等从石油工业废水中分离到假单胞菌(*Pseudomonas sp.*)ND24,将其接种到含0.2 g/L萘的灭菌土壤中,14 d后萘去除率为98.2%^[34]。张春杨等从活性污泥中分离到1株假中间苍白杆菌(*Ochrobac-*

trum pseudintermedium)NAP_A, 30℃下,10 d内可将初始质量浓度320 mg/L的萘降解90%±4.5%^[35]。

目前,关于萘降解基因的研究报道较多。蔡宝立等分离到假单胞菌(*Pseudomonas sp.*)ND7、ND8、ND9以及ND10,均含有萘双加氧酶铁硫蛋白大亚基基因nahAc,水杨酸羟化酶基因nahG,儿茶酚1,2-双加氧酶基因nahH和儿茶酚2,3-双加氧酶基因catA,且都具有儿茶酚1,2-双加氧酶和儿茶酚2,3-双加氧酶活力,但不同菌株中这两种酶的比活力不同^[36]。李永君等发现来自工业废水的萘降解细菌含有nahAc,水杨醛脱氢酶基因nahF及其重复基因nahV, nahG及其重复基因nahU, nahH和catA,以及萘趋化蛋白基因nahY,而来自活性污泥的分离株只含有nahAc、nahF、nahG和catA,不含nahY、nahV、nahU和nahH^[37]。Moser等从*Comamonas testosteroni* H菌株中扩增出萘双加氧酶铁氧化还原蛋白基因pahAb,铁硫蛋白大亚基基因pahAc,铁硫蛋白小亚基基因pahAd,且在*E. coli* DH5α中得到表达^[38]。

4 微生物修复重金属污染土壤

随着重金属在冶炼、化工、造纸以及电子等产业的广泛应用,大量的重金属物质进入环境,例如Pb、Cr、Hg、Cd等。这些离子进入人体血液循环系统后可长期存在于体内,使机体的某些代谢途径受阻,对机体造成严重的伤害^[39]。研究表明,微生物可以改变重金属在土壤中的环境化学行为,达到生物修复的目的,其原理主要包括生物吸附和生物转化^[40]。

细胞表面载有负电荷,且存在氨基、羧基、羟基、醛基、硫酸根等多种官能团,可通过静电吸附和络合作用固定重金属离子^[41]。曹德菊等发现,当环境中Cu、Cd浓度较低(≤5 mg/L)时,微生物修复性能良好,去除率可达25%~60%;而当Cu、Cd浓度较高时,修复性能下降,且环境pH值对不同微生物的生物吸附作用产生一定影响^[42]。杜立栋等研究了青霉菌(*Penicillium*)在不同接触时间内对土壤可溶性Pb的富集效果,结果表明土壤Pb离子浓度随青霉菌培养时间的延长而降低^[43]。

微生物对重金属的生物转化作用主要包括氧化与还原,甲基化与去甲基化,溶解作用以及有机络合配位降解转化重金属等^[40]。Hg的生物转化具有代表意义,如Hg²⁺的甲基化, Hg²⁺还原成Hg⁰,甲基Hg和其它有机Hg化合物裂解并还原成Hg⁰。微生物可以利用自身的氧化还原特性及代谢产物,使Cu²⁺还原形成Cu。魏甜甜等发现地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) TT1可在3 mmol/L Cu²⁺环境中生长,30℃下,24 h内可以还原71%的Cu²⁺^[44]。另外,研究发现许多微生物能够把Cr从高毒的六价还原成低毒的三价^[45-46]。

重金属抗性基因是微生物在自然条件或人工诱导下产生的抗重金属毒性的遗传因子,其可以激活和编码

金属硫蛋白、操纵子、金属运输酶和透性酶等, 通过这些物质与重金属结合、形成失活晶体或促进重金属排出体外等机制对重金属进行解毒^[47]。周围等发现巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*) MDS07 对重金属 Cr、Zn、Ni 等具有较高抗性, 研究发现, 该菌株含有 Cr 抗性基因 chrB、Zn 抗性基因 czcD 和 Ni 抗性基因 nccA^[48]。菌株 *Ralstonia eutropha* DKC1 对 Cr 有较高抗性(350 mg/L), 而对其它重金属耐性较低, 其含有一较大质粒, Cr 抗性基因 czcC 位于质粒上, 利用 pET-30a(+)-Vector, czcC 在 *E. coli* BL21 中得到成功表达^[49]。

5 展望

关于微生物修复污染土壤的研究报道较多, 但真正用于实践的并不多见, 且微生物与土壤的相互作用仍有一些基础问题需要解决。进一步筛选和驯化生物修复菌株, 构建菌种库; 加强微生物代谢途径研究, 控制其转化途径; 开展微生物降解酶研究, 促进酶的工业化生产及应用; 强化降解基因的结构与功能研究, 重组构建功能优化的基因工程菌株; 优化组合修复技术, 如动物-微生物、植物-微生物、物化方法-微生物等组合修复。以上几个方面将是今后研究的重点内容。

参考文献

- [1] 顾立锋, 何健, 张明星, 等. DDT 降解细菌 W-1 的分离鉴定及其降解特性研究. 农业环境科学学报[J]. 2007, 26(2): 568-571.
- [2] 陆鹏, 洪源范, 洪青, 等. 遗传稳定型六六六、甲基对硫磷降解基因工程菌的构建及特性研究[J]. 环境科学, 2008, 29(7): 1973-1976.
- [3] 刘怡辰, 曹娟, 高国庆, 等. 蔡降解菌 N19-3 的分离、鉴定和蔡双加氧酶基因的检测[J]. 环境科学研究, 2008, 21(5): 81-85.
- [4] 邓旭, 魏斌, 胡章立. 转基因衣藻对重金属的抗性以及对铜离子的富集[J]. 生物技术, 2007, 17(6): 66-68.
- [5] 游远航, 祁士华, 叶琴, 等. 土壤环境有机氯农药残留的研究进展[J]. 资源环境与工程, 2005, 19(2): 115-119.
- [6] 顾立锋, 何健, 张明星, 等. DDT 降解细菌 W-1 的分离鉴定及其降解特性研究[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(2): 568-571.
- [7] 郭子武, 陈双林, 萧江华. 有机氯农药微生物降解研究进展[J]. 西南林学院学报, 2007, 27(4): 69-75.
- [8] 方玲. 降解有机氯农药的微生物菌株分离筛选及应用效果[J]. 应用生态学报, 2000, 11(2): 249-252.
- [9] 李红权, 李红梅, 蒋继志, 等. 一株 DDT 降解菌的筛选、鉴定及降解特性的初步研究[J]. 微生物学通报, 2008, 35(5): 696-699.
- [10] Imai R, Nagata Y, Fukuda M, et al. Molecular cloning of a *Pseudomonas paucimobilis* gene encoding a 17-kilodalton polypeptide that eliminates HCl molecules from γ -hexachlorocyclohexane[J]. Journal of Bacteriology, 173(21): 6811-6819.
- [11] Shanna P, Raina V, Kumari R, et al. Haloalkane dehalogenase LinB is responsible for β - and γ -hexachlorocyclohexane transformation in *Sphingobium indicum* B90A[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 79(9): 5720-5727.
- [12] 姚杰, 刘铁兵, 程莹, 等. 2 种有机磷农药在环境中的降解转归[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(11): 4648-4649.
- [13] 黄晓梅, 钱翌, 朱建雯. 有机磷农药对土壤呼吸的影响[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(7): 1976-1977.

- [14] 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): 675-680.
- [15] 李福后, 王伟霞. 微生物降解有机磷农药的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(22): 10659-10661.
- [16] 滕春红, 苏少泉. 除草剂在土壤中的微生物降解及污染土壤的生物修复[J]. 农药, 2006, 45(8): 505-507.
- [17] 胡笑彤. 我国农药工业的现状与发展方向[J]. 农药, 1998, 37(6): 7-10.
- [18] 苏少泉. 除草剂在土壤中的降解与使用[J]. 现代农药, 2004, 3(1): 5-8.
- [19] 卢信, 赵炳梓, 张佳宝, 等. 除草剂草甘膦的性质及环境行为综述[J]. 土壤通报, 2005, 36(5): 785-790.
- [20] 朱玉, 于中连, 林敏. 草甘膦生物抗性和生物降解及其转基因研究[J]. 分子植物育种, 2003, 1(4): 435-441.
- [21] 郑永良, 刘德立, 刘世旺. 两株草甘膦降解真菌的分离及其降解效能研究[J]. 黄冈师范学院学报, 2006, 26(3): 28-30.
- [22] 石成春, 郭养浩, 王大奈, 等. 草甘膦微生物降解的动力学研究[J]. 中国环境科学, 2005, 25(3): 361-365.
- [23] 冯慧敏, 何红波, 武叶叶, 等. 黑土环境中乙草胺的微生物降解特征研究[J]. 土壤通报, 2008, 39(2): 379-383.
- [24] 冯慧敏, 何红波, 白震, 等. 乙草胺的微生物降解及其对土壤磷脂脂肪酸特性的影响[J]. 应用生态学报, 2008, 19(7): 1585-1590.
- [25] 杨会青, 孔祥清, 王智慧, 等. 四种除草剂对根瘤菌、AMF 等土壤微生物的影响[J]. 微生物学通报, 2009, 36(4): 511-514.
- [26] 田芹, 周志强, 江树人, 等. 丁草胺在环境中降解行为的研究进展[J]. 农药, 2004, 43(5): 205-208.
- [27] 虞云龙, 陈英旭, 潘学冬. 降解菌 HD 接种和非接种根围土壤中丁草胺的降解动力学研究[J]. 土壤学报, 2002, 39(4): 575-581.
- [28] 李川, 古国榜, 柳松. 丁草胺高效真菌的分离及性能研究[J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(3): 611-614.
- [29] 楚小强, 庞国辉, 方华, 等. 丁草胺降解菌的分离鉴定及降解特性的研究[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(1): 145-150.
- [30] 陶雪琴, 党志, 卢桂宁, 等. 污染土壤中多环芳烃的微生物降解及其机理研究进展[J]. 矿物岩石地球化学通报, 2003, 22(4): 356-360.
- [31] 邹德勋, 骆永明, 腾应, 等. 多环芳烃长期污染土壤的微生物强化修复初步研究[J]. 土壤, 2006, 38(5): 652-656.
- [32] 郑乐, 刘宛, 李培军. 多环芳烃微生物降解基因的研究进展[J]. 生态学杂志, 2007, 26(3): 449-454.
- [33] 刘世荣. 微生物在多环芳烃降解应用中的机理及其研究趋势[J]. 现代商贸工业, 2008, 8: 379-380.
- [34] 蔡宝立, 李永君, 梁靖, 等. 降解蔡的假单胞菌 ND24 菌株的分离和蔡污染土壤的生物修复[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(6): 6-9.
- [35] 张春杨, 彭振兴. 蔡降解菌 NAP_A 的分离、降解性能和分子系统学研究[J]. 生态环境, 2008, 17(1): 109-112.
- [36] 蔡宝立, 丁蕊, 任河山, 等. 蔡降解细菌的分离及其降解和转座基因的分子检测[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(6): 1-6.
- [37] 李永君, 赵化冰, 任河山, 等. 蔡降解细菌的分离及其降解基因的分子检测[J]. 生态学杂志, 2006, 25(7): 738-742.
- [38] Moser R, Stahl U. Insights into the genetic diversity of initial dioxygenases from PAH-degrading bacteria[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 55: 609-618.
- [39] 张汉波, 王力, 沙涛, 等. 从铅锌矿渣中分离的微生物对重金属吸附特性的研究[J]. 微生物学杂志, 2004, 24(5): 34-37.
- [40] 陈范燕. 重金属污染的微生物修复技术[J]. 现代农业科技, 2008, 24: 297-299.

果树核心种质研究进展

卜海东¹, 张冰冰²

(1. 吉林农业大学 园艺学院 吉林 长春 130118; 2. 吉林省农业科学院 果树研究所, 吉林 公主岭 136100)

摘要: 对中国果树核心种质构建面临的困难和现状做了总结, 提出了果树核心种质未来的发展方向。

关键词: 果树; 核心种质

中图分类号: S 66.602 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)04-0211-03

中国果树栽培历史悠久, 已有 4 000 多年的历史。全世界拥有的植物遗传资源 610 万份^[1], 如此大的资源总量无疑会给育种工作带来大的选择困难, 同时也增加了资源保存、评价和利用的难度。在这些资源中往往会有同名异物或同物异名的现象产生, 这样就增加了育种工作的难度, 降低了育种工作的效率。为了更有效的进行果树新品种的选育和果树资源的评价、保存和利用, 构建一个能够代表整个种质资源的核心子集(核心种

质)是十分必要的。核心种质可以为遗传育种工作提供便捷的条件, 可以有利的推进育种工作的进展, 提高整个种质资源的管理和利用水平。目前, 核心种质资源的研究已经应用于小麦^[2]、水稻^[3]、豌豆^[4]、大白菜^[5]、胡萝卜^[6]、油菜^[7]、茶树^[8]、蜡梅^[9]、梅花^[10]等领域, 然而果树核心种质的构建研究却较少。为了满足人类不断增长的物质需求, 加速社会物质文明的进步, 要求果树科研工作者尽快构建完善的果树核心种质。

1 果树核心种质建立的意义

1.1 核心种质的概念

1984 年 Frankel^[11] 首先提出了核心种质(Core Collection)的概念, 后来又与 Brown^[12] 等人完善了这个概念, 即认为核心种质是运用科学的分析方法从某种植物的资源库中挑选出一部分材料, 以最少的资源数量和遗传重复性最大限度的代表整个资源的遗传多样性。

第一作者简介: 卜海东(1983-), 男, 在读硕士, 现从事果树种质资源研究工作。E-mail: buhaidong11@126.com。
通讯作者: 张冰冰(1960-), 女, 博士, 研究员, 现主要从事果树种质资源研究工作。E-mail: zhb4005@163.com。
基金项目: 国家科技基础平台资助项目(2005DK21002-25)。
收稿日期: 2009-11-20

[41] 徐磊辉, 黄巧云, 陈雯莉. 环境重金属污染的细菌修复与检测[J]. 应用与环境生物学报, 2004, 10(2): 256-262.
[42] 曹德菊, 程培. 3种微生物对 Cu Cd 生物吸附效应的研究. 农业环境科学学报, 2004, 23(3): 471-474.
[43] 杜立栋, 王有年, 李奕松 等. 微生物对土壤中铅富集作用的研究[J]. 北京农学院学报, 2008, 23(1): 38-41.
[44] 魏甜甜, 叶甜甜, 程国军 等. 1株抗铜细菌的分离、鉴定及其还原特性的研究[J]. 华中农业大学学报, 2008, 27(3): 387-390.
[45] 程国军, 胡光济, 李友国. 抗铬细菌的分离、鉴定及其铬还原能力[J].

中南民族大学学报, 2008, 27(3): 29-31.
[46] 段学军, 闵航. 一株抗铜细菌的分离鉴定及其抗性基因定位的初步研究[J]. 环境科学学报, 2004, 24(1): 154-158.
[47] 李荣林, 李优琴, 沈寿国, 等. 重金属污染的微生物修复技术[J]. 江苏农业科学, 2005(4): 1-3.
[48] 周围, 李友国, 程国军 等. 1株抗重金属铬细菌的分离、鉴定及抗性基因型的初步研究[J]. 华中农业大学学报, 2008, 27(2): 248-250.
[49] 段学军, 闵航, 吕文平, 等. 真养雷氏菌 DKC1 菌株铜抗性 *czcC* 基因的克隆与表达[J]. 微生物学报, 2004, 44(4): 461-464.

Bioremediation Effect of Microorganisms in Contaminated Soils

WANG Wei-xia¹, LI Fu-hou¹, WANG Wen-feng²

(1. Key Lab of Marine Biotechnology of Jiangsu Province School of Marine Science, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang, Jiangsu 222005; 2. Department of Life Sciences, Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan 453003)

Abstract: Bioremediation effect of microorganisms in contaminated soils was summarized in this text, and the developing trends were discussed.

Key words: microorganism; soil; contamination; bioremediation