

白腐菌降解氯代农药的机理^{*}

邹世春 张展霞

(中山大学化学与化学工程学院, 广州 510275)

摘要 确定了白腐菌在水中的静置培养条件, 探讨了在该条件下白腐菌对水中微量氯代农药的生物降解情况及其降解机理. 实验结果表明, 白腐菌在含有 d 为 0.02% 的葡萄糖、0.03% 的酒石酸铵和适量无机盐的培养液中, 于 35℃, 经 5~7 d 的静置培养可获得良好的菌丝, 并对氯代农药有最大的降解效率 (90% 以上). 对降解的部分中间产物的 GC-MS 分析表明, 不同类氯代农药有不同的降解过程和机理.

关键词 白腐菌, 降解机理, 氯代农药

分类号 X 172

氯代农药 (OCPs) 如六六六 (BHCs) 和滴滴涕 (DDTs) 等是环境中广泛存在的有毒有机污染物, 具有隐蔽性强、难于降解和易于生物积累等特点, 对其在环境介质中的存在和防治一直是人们关注的焦点^[1]. 在 60 年代初到 70 年代, 有关氯代农药生物降解研究主要集中在土壤、海洋环境和水中微生物的生物降解和动植物对这些有机物的代谢方面^[2]. 但在这些研究中仅涉及到单个含氯化合物的降解情况, 且有关氯代农药的降解效率亦少见报道. 本研究发现在合适培养条件下白腐菌可使大部分氯代农药矿化. 通过对部分降解产物的 GC-MS 分析, 探讨了各种不同类氯代化合物可能的降解机理.

1 菌种的培养和分析

1.1 白腐菌的静置培养条件

(1) 实验材料和方法. 白腐菌 *Phanerochaete chrysosporium* Burds (BKM /F-1767), 中科院广州化学研究所提供. 将白腐菌接种到麦芽汁液体培养基中, 于 35℃ 培养 7 d, 用无菌水洗净, 打散成菌丝液.

葡萄糖 (d 0.2%), 酒石酸 (d 0.2%) 溶液. 分别称取 K_2HPO_4 , Na_2HPO_4 和 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 各 10.0, 2.0 和 5.0 g, $CaCl_2$ 和 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 各 1 mg 于 1 L 容量瓶中, 以纯水稀至刻度, 得无机盐混合溶液. $HAc-NaAc$ 缓冲溶液 ($pH=4.0$) 按分析化学手册 (杭州大学出版社) 配制. 氯代农药标液 (1 mg/L), 取 1 mL 100 mg/L 标液于 100 mL 容量瓶中, 以正己烷稀至刻度.

(2) 仪器及其操作条件. 蒸汽蒸馏萃取装置自制^[3]. HP5890II 型气相色谱仪 (GC/ECD) 和 HP5890II 气相色谱 /HP5972 质谱联用仪 (GC/MSD). HP 石英毛细管柱, ϕ 0.25 cm, 长 25 m. 液膜厚度 0.25 μ m.

* 收稿日期: 1997-10-24 邹世春, 男, 32岁, 讲师

GC进样器温度, 270℃, 检测器温度, 290℃, 尾吹气 (N₂), 30 mL/min; 升温程序: 初始温度 90℃, 保持 2 min, 然后以 15℃ /min 升至 150℃, 再以 3℃ /min 升至 250℃, 保持 10 min. 进样量 2 μ L (不分流进样); 压力控制程序 (EPC): 由 5.3 psi 升至 27 psi (45 psi/min), 然后以同样速率降至 5.3 psi, 进样后, 30 s 内不分流, 30 s 后仪器自动打开分流阀分流.

质谱条件: 载气为 He, 10 psi, 检测器温度为 290℃; 其它色谱条件同上.

(3) 实验步骤. 于盛有 30 mL 水的三角瓶中, 加入一定量培养基, 摇匀后于 121℃ 灭菌 20 min, 取出, 稍冷后加入 1 mL 各种氯代农药的混合标液. 将白腐菌菌丝液接种到 30 mL 的培养基中, 于 35℃ 培养 5 d; 同时将未接种的培养基在同样条件下培养作为对照. 上述培养基以 0.5 mL HAc-NaAc 缓冲液调节溶液 pH 为 4 左右, mL 无机盐混合液, 适量葡萄糖和酒石酸铵.

2 结果与讨论

2.1 各种静置培养条件对处理效果的影响 *P. Chrysosporium* (BKM F-1767) 在人工合成培养基中调整期为 0~ 48 h, 对数生长期为 48~ 96 h, 稳定期为 96~ 144 h, 144 h 后为衰退期 (图 1).

实验表明, 添加少量葡萄糖作为辅助碳源可以加快细菌生长、提高处理效果 (图 2), 当培养液中葡萄糖 d 为 0.02% 左右时, 培养 5 d, 可使 DDT 去除效率 $D(\text{DDT})$ 达 90% 以上. 但再增加葡萄糖用量, 作为细菌的另一重要碳源的氯代农药则不起作用, 即细菌对氯代农药的降解效率明显下降.

当培养液中的氮源即酒石酸铵 d 为 0.03% (图 2), 处理 5 d 后, 对 DDT 的去除率在 90% 以上, 再增加用量, 处理效果增加不明显.

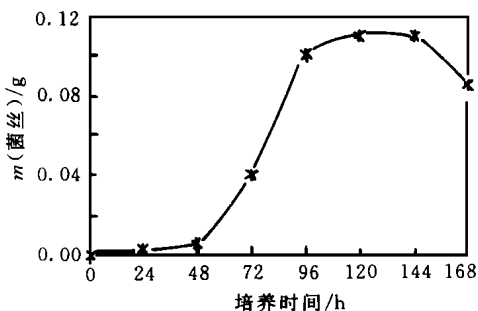


图 1 *P. Chrysosporium* 的生长曲线

Fig. 1 Growing curve of *P. Chrysosporium*

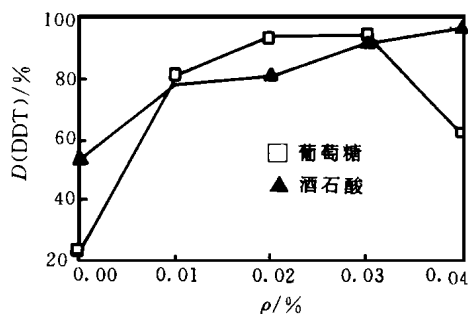


图 2 葡萄糖和酒石酸铵浓度对处理效果的影响

Fig. 2 Effects of concentration of glucose and ammonium tartrate on the treatment efficiency of DDT

白腐菌的生长对酸度极为敏感, 因此酸度对处理效果有很大的影响. 实验表明当 pH 在 3~ 5 的范围内, 菌丝生长良好, 对 DDT 的去除率较高; 若 pH 值低于 3.0 或大于 5.0, 则菌丝生长极慢且处理效果较差, 因此在处理过程中 HAc-NaAc 缓冲液调节溶液 pH 在 3.5~ 5.0 范围内, 可得到最佳的处理效果.

白腐菌的最佳生长温度为 39℃, 低于 30℃ 或高于 45℃ 都将影响处理效果. 为避免氯

代农药的挥发损失, 本研究选择 35°C 作为培养温度. 一般来说, 处理效果与白腐菌生长有关, 本研究处理时间范围为 5~7 d.

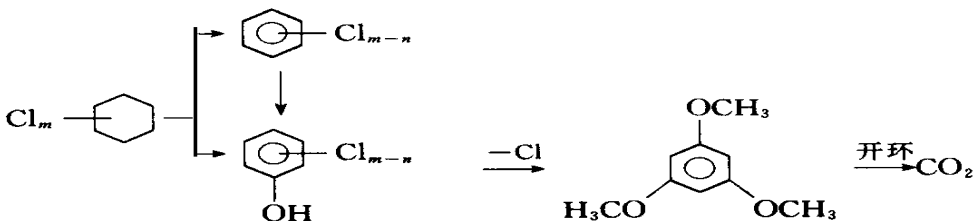
无机盐类是微生物生命活动不可缺少的物质. 白腐菌处理氯代农药和多氯联苯时添加适量无机盐类对这些有机物的去除率影响不大.

2.2 白腐菌对氯代农药降解及机理 Martin^[2]总结了环境介质中一些有机化合物所发生的典型生物降解反应类型, 并从微生物本身和化合物结构出发解释了某些化合物难于发生生物降解的原因. 指出一些氯代物在环境介质中一般难于发生生物降解或降解速度很慢, 因而在动物脂肪内有较高的残留, 其主要原因在于这些物质具有很好的化学稳定性. 通过对降解木素的研究证明, 白腐菌具有能降解木素的独特的活酶系统. 这种活酶系统产生的碳中心自由基可破坏化合物的环状结构. 本实验证明, 白腐菌对氯代农药亦具有极强的生物降解作用.

(1) 对氯代农药的降解. 将未接种和接种的培养基在生化培养箱中培养 7 d 后取出, 分别以蒸汽蒸馏萃取^[3], 取 $2\mu\text{L}$ 萃取液用于色谱分析. 将氯代农药经白腐菌处理前后的色谱图进行对照发现, 氯代农药大多已完全降解.

(2) 白腐菌对氯代农药的降解机理在白腐菌开始降解的 3~7 d 内, 每隔 24 h 取出 3 个样品进行萃取并取 $2\mu\text{L}$ 萃取液用于色谱-质谱分析. 实验发现, 每天所检测到的降解产物的种类是一样的, 只是所得产物的丰度有所不同. 图 3 是经 5 d 的降解后所得的氯代农药的质谱总离子流图. 可见, 除部分 γ -BHC 外, 其它 OCPs 大部分均已得到降解. 通过对降解产物的分析, 可初步推测 OCPs 的生物降解途径.

BHCs 的降解过程: 除部分 γ -BHCs 外, 未检测到其它 BHCs, 这表明 γ -BHC 较难于降解. 少量中间产物如 3, 5-二氯苯酚, 3, 4-二甲氧基苯乙醛和 3, 4, 5-三甲氧基苯甲醇可被检出. 这些中间产物的存在, 说明白腐菌对 BHCs 的降解可能发生如下反应:



DDTs 的降解过程: 从 DDTs 降解的色谱图和质谱总离子流图均可看出, DDTs 系列农药的矿化度很高, 于降解产物中已基本检测不到这些氯化物. 可检测到的少量代谢产物是 4, 4-对二氯苯基羟基乙酸 (DBA) 和 4, 4-对二苯基酮 (DBP). 其可能的降解过程如下:

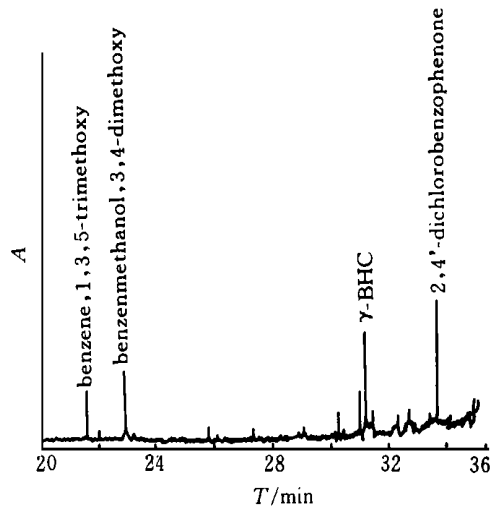
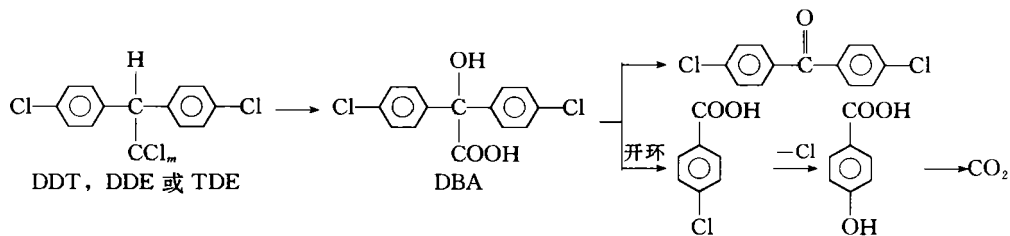


图 3 氯代农药降解产物的质谱总离子流图
Fig. 3 Total ion flow chromatogram of the transitional products of OCPs



从该降解过程中亦可看出,在 1,1 位上的 Cl 原子较之与苯环直接相连的 Cl 原子更易脱离。在接种 10% 白腐菌,培养 3 d 时可检测到较大量的这些中间产物。因此,在 DDT 系列农药的降解过程中,苯环上的脱氯和苯环的开环反应是整个反应的速度决定步骤。

参 考 文 献

- 1 Picer R H *p*, *p'*-DDT adsorption to suspended particulate matter in seawater. *Geochim Cosmochim Acta*, 1974, 38: 1061
- 2 Martin A. Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science*, 1981, 211: 132
- 3 Zou S C, Zhang Z X. Determination of trace OCPs and PCBs in water. *Environmental Monitoring and Assessment*, 1997, 44: 563-568

The Biodegradation of Organochlorinated Pesticides by *P. chrysosporium* Fungi

Zou Shichun* Zhang Zhanxia

Abstract The biodegradation of organochlorinated pesticides (OCPs) by *P. chrysosporium* was carried out under the optimum culture conditions (0.02% glucose, 0.03% ammonium tartrate, pH 3.5~4.0, 35°C) and up to 90% of OCPs was removed. The analytical results for the degraded chemicals showed that a great amount of organochlorine compounds had been converted to CO₂ and H₂O. Some transitional products such as 1,3,5-trimethoxy, 2,4-dichlorobenzophenone and benzoic acid etc. were detected. It indicates that the dechlorination and cleavage of benzene ring are the main degradation processes of OCPs.

Keywords white rot fungi, organochlorinated pesticides (OCPs), biodegradation, mechanism

* School of Chemistry and Chemical Engineering, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China