

麦草畏除草剂厌氧降解可生化性测定

顾继东¹, 程树培², 顾继光³ (1. 香港大学生态学及分类学系环境毒理实验室, 香港 E-mail: jdgu@hkucc.hku.hk; 2. 南京大学环境科学系污染控制与资源化研究国家重点试验室, 210093 南京; 3. 沈阳农业大学土壤与环境学院, 110161 沈阳)

摘要: 苯环由¹⁴C 标记合成的麦草畏除草剂, 厌氧降解反应至第 7 天, 转化率达 64 %, 有¹⁴C 标记的 CO₂ 产生; 第 16 天, 转化率达 91 %, 出现一种主要的中间代谢产物, 有 CH₄ 产生; 第 27 天, 转化率达 95 %, 仍然只有一种主要的中间代谢产物. 麦草畏苯环的断裂量仅占总量的 2.96 %, 转化成 CO₂ 的为 0.74 %, 转化成 CH₄ 的为 0.11 %. 在降解 27d 中, 主要中间代谢产物是 3,6-二氯水杨酸, 占麦草畏总量的 92.04 %. 3,6-二氯水杨酸的苯环没有被打开, 可生化性极低, 仍然继续污染环境. 研究结果为控制麦草畏对人体健康危害, 进行生物修复工程, 提供了重要的参考依据.

关键词: 麦草畏; 除草剂; 厌氧降解; 可生化性; 生物修复

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2001)04-03-0111

Degradation of the Herbicide Dicamba under Strictly Anaerobic Conditions

Gu Jidong¹, Cheng Shupe², Gu Jiguang³ (1. Laboratory of Environmental Toxicology, Department of Ecology & Biodiversity, The University of Hong Kong, Hong Kong, China; 2. The National Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, Department of Environmental Science, Nanjing University, Nanjing 210093, China; 3. College of Land and Soil Environment, Shengyang Agricultural University, Shengyang 110161, China)

Abstract: Degradation of the herbicide dicamba was assayed under methane-producing condition using a coastal wetland soil as an inoculum. Benzene ring ¹⁴C labeled dicamba was employed and degradative process proceeds through demethoxylation yielding 3,6-dichlorosalicylic acid as the predominant intermediate. The data showed that the degradation rate of dicamba by the enrichment culture achieved 64 %, 91 % and 95 % after 7, 16 and 27 days of incubation, respectively; only small quantities of CO₂ (0.74 %) and CH₄ (0.11 %) were recovered with insignificant radioactivity. The benzene ring of dicamba was not cleaved to a significant extent. Future cleaning up of dicamba contaminated environment may require an effective bioremediation techniques.

Key words: dicamba; herbicide; anaerobic degradation; metabolism; bioremediation

麦草畏除草剂(3,6-二氯-2-甲基-水杨酸, 简称麦草畏)是一种结构稳定的氯代芳烃化合物, 可诱发人体致癌, 是国内外长期关注和重点研究的一类污染物. 已发现麦草畏等氯代芳烃污染物广泛存在于环境中^[1,2]. 研究中采用的厌氧菌群, 是以麦草畏为唯一碳源, 进行驯化, 经 8 次转接富集培养的混合菌. 用高压液相色谱测定产生的 CH₄ 浓度, 用液体闪烁计数器测定苯环上¹⁴C 原子转化成 CO₂ 的强度和麦草畏自身的¹⁴C 强度, 用高压气相色谱测定主要中间产物和麦草畏的降解转化效率. 研究中发现

麦草畏的降解转化主产物不是来源于苯环断裂. 即使反应 27d 以上, 麦草畏的主要中间代谢产物仍是 3,6-二氯水杨酸(3,6-dichlorosalicylic acid), 其苯环没有被打开. 水杨酸的衍生物, 可对动物牙齿细胞的生长和肝脏细胞的正常功能造成危害^[3,4].

1 材料与方法

1.1 厌氧菌群的驯化与富集^[5]

作者简介: 顾继东(1962~), 男, 美国哈佛大学博士, 现任香港大学生态学及分类学系 A.Prof.
收稿日期: 2000-10-10

从 SCV 沿海滩涂的湿地中采集水面下的底泥泥浆,厌氧条件下转运,分离,驯化,富集培养其中的厌氧菌.以 93 mmol/L 的麦草畏作为唯一碳源驯化培养.共经 8 次转接驯化富集,每次以 20 %菌液转入新培养液.用于降解研究时的麦草畏浓度为 85 μ mol/L,250 $^{\circ}$ C 避光培养.厌氧操作与培养反应箱为美国 Coylab Products 公司产品.

1.2 液体培养基与反应液

KH₂PO₄ (0.27g), K₂HPO₄ (0.35g), NH₄Cl(0.53g), MgCl₂·6H₂O(0.10g), CaCl₂·2H₂O(0.073g), FeCl₂·H₂O(0.20g), 1 ml 微量元素原液,1 ml 的 0.1 %刃天青氧化还原指示剂,溶至 1 L 无离子 H₂O 中,高温灭菌冷却后加入 1.2g 的 NaHCO₃ 和 1.2g 的 Na₂S,调 pH 至 7.2,通入 N₂,去除其中的溶解氧 (DO).驯化反应之前,定量加入麦草畏,作为唯一碳源和降解的目标污染物.麦草畏的苯环用¹⁴C 标记,由美国 Baxter Healthcare 公司合成,纯度 98.7 %,放射性强度 0.25 μ Ci.

1.3 转化率及中间产物测定

用高压液相色谱 (HPLC) 测定麦草畏的降解转化率和中间代谢产物.1.0 ml 样品与色谱纯甲醇以 1:1 混合,14000r/min 离心 10 min,上清液经 0.2 μ m 微孔过滤器进样,用 25cm 长,5 μ m 孔径的 LC-18-DB Supercoil 柱子分离样品,流动相流速 1 ml/min,流动相为,甲醇:水:乙晴:乙酸 = 60:39.5:0.5:65, $\lambda_{\max}$ = 271 nm.

1.4 甲烷产量分析

用气相色谱测定麦草畏厌氧降解过程中的 CH₄ 产量.取 50 μ l 样品气体,注入气相色谱仪中,气注温度 500 $^{\circ}$ C,监测器温度 1500 $^{\circ}$ C,载气为高纯氦气,流速 20 ml/min, Porapak, 柱子 1.8 m, 80 至 100 目孔径.

1.5 产生 CO₂ 气体和麦草畏的¹⁴C 强度测定

测定麦草畏降解过程中 CO₂ 的产量,用液体闪烁计数器 (美国产品,型号 Bechman LS 113).样品产生的 CO₂ 先经 NaOH 吸收,再经 H₂SO₄ 处理后,由乙-羟基乙胺中和,于 8 ml 的

闪烁剂中测定其¹⁴C 强度.闪烁剂由 ppo, popop, 甲苯和乙醇混合而成.测定温度 45 $^{\circ}$ C, 转盘转速 6r/min,测定周期 2h.

2 结果与讨论

2.1 麦草畏转化率分析

从表 1 看出,麦草畏的转化率在前 7 天已达 64 %,之后逐步上升.反应第 27 天达 95 %.麦草畏转化率随厌氧降解时间的延长而上升.

表 1 麦草畏厌氧降解转化率,CO₂和 CH₄ 产量的测定

反应 时间	麦草畏转化率		¹⁴ C 强度 $\times 10^4$ / DPM $\cdot$ ml ⁻¹		CH ₄
	浓度	转化率	CO ₂	麦草畏	产量
	/ μ mol	/ %	净上升值	净下降值	/ μ mol
0	85.00	0	0	0	0.00
7	30.60	64	1	8	0.00
16	7.65	91	10	42	0.05
27	4.25	95	14	56	0.09

2.2 麦草畏的苯环开环率分析

麦草畏苯环中¹⁴C 的本底起始值是 1889 $\times$ 10 DPM/ml (DPM: disintegrations per minute, 每分钟衰变数),厌氧降解反应到第 27 天,麦草畏的净下降值为 56 $\times$ 10 DPM/ml (见表 1),仅是起始值的 2.96 %,表明仍有 97.04 %麦草畏的苯环没有断开.

2.3 CO₂ 产量分析

自反应的第 7 天开始,用液体闪烁计数器测得已有 CO₂ 产生.CO₂ 是来自苯环上碳原子的降解,因为麦草畏苯环的羧基侧链和甲基侧链上的碳原子没有用¹⁴C 标记.反应第 7 天,产生 1 个 ($\times 10$ DPM/ml) 单位的 CO₂,而表 1 中显示的麦草畏净下降值为 8 个单位,表明断开的苯环中的¹⁴C,只有 12.5 %转化成 CO₂.反应到第 16 天,CO₂ 中的¹⁴C 占麦草畏净下降值的 23.81 %;反应第 27 天,占 25 %.表明经厌氧降解断开的苯环中的¹⁴C,随反应时间的延长,转化成 CO₂ 的比例上升.反应第 27 天,产生的 CO₂ 量为 14 ($\times 10$ DPM/ml),仅是苯环总开环率 2.96 % (56 $\times 10$ DPM/ml) 的 1/4,是麦草畏总量的 0.74 %.

2.4 CH₄ 产量分析

甲烷化反应自反应的第 16d 开始,到反应的第 27d,产生的 CH₄ 浓度达最高水平为 0.09μmol,是 麦草畏总量 85μmol 的 0.11 %.

2.5 主要的中间代谢产物

HPLC 测定麦草畏厌氧降解反应第 27d 的转化率高达 95 %,而液体闪烁计数器测定仅有 2.96 %.这 92.04 %的差距,是被厌氧降解反应后苯环又没有被打开的麦草畏的转化产物,是脱甲基之后产生的 3,6-二氯水杨酸.与文献[6 ~ 9]相符.麦草畏厌氧降解脱甲基反应过程十分迅速,在反应前 7 天可达 69 %,反应 20d 可达 80 %,本研究中反应 27d 可达草畏总量的 92.04 %.麦草畏厌氧降解的主要中间代谢产物测定结果见图 1.从图 1 看出,反应起始时(a),只有 6.09 min 的唯一峰值,它是麦草畏的起始浓度值;反应至第 16 天(b),麦草畏的 6.09 min 峰值明显降低,在 4.08 min 出现了 1 种主要的中间代谢产物的峰值;反应至第 27 天(c),麦草畏几乎被完全降解转化,而主要的中间代谢产物仍然只有 1 种,在 4.08 min 的峰值继续增加.

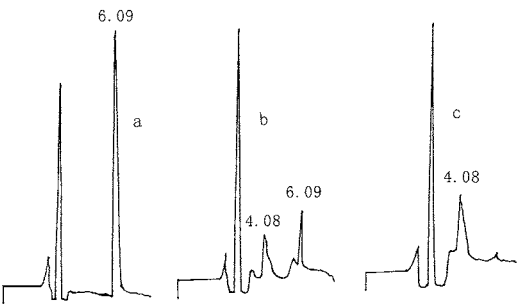


图 1 HPLC 测定麦草畏厌氧降解主要中间代谢产物
Fig.1 Predominant intermediates measured by HPLC from herbicide dicamba

2.6 主要反应历程分析

反应起始 0d,100 %麦草畏 → 反应 7d,总转化率达 64 %,其中 0.42 %苯环断裂,产生 CO₂ → 反应 16d,总转化率达 91 %,其中 2.17 %苯环断裂,产生 CO₂ 和 CH₄ → 反应 27d,总转化率达 95 %,其中 2.96 %苯环断裂,产生 CO₂ 和

CH₄.麦草畏的厌氧降解的主要反应历程,与厌氧降解其他有机污染物的基本反应历程一致,即大分子污染物降解转化成小分子或较小分子阶段 → 酸化阶段 → 产甲烷阶段.

3 结语

(1)麦草畏除草剂在厌氧降解过程中,27d 内转化率可达 95 %,主要来自脱甲基过程.

(2)主要中间代谢产物是 3,6-二氯水杨酸,可占麦草畏总量的 92.04 %.

(3)苯环断裂最高水平达总量 2.96 %.其余 97.04 %中,有 92.04 %侧链转化成主要中间代谢产物,5 %为完整的麦草畏分子.

(4)厌氧降解 27d,麦草畏苯环中 0.74 %的 ¹⁴C 原子转化生成 CO₂.

(5)麦草畏碳原子转化产生的甲烷量,最高可达麦草畏碳原子总量的 0.11 %.

(6)厌氧降解 27d 之后,仍然有占麦草畏总量 92.04 %的 3,6-二氯水杨酸中间产物继续污染环境.

根据麦草畏难以被厌氧彻底降解矿化的特征,应当严格控制麦草畏的污染,在生物修复中需要提倡以好氧为主的优化工艺,以加速麦草畏的彻底矿化降解.

参考文献:

1 Smith A E. Transformation of dicamba in Regina heavy clay. J. Agric. Food Chem., 1973, **21**:708 ~ 710.
2 Grover R. Mobility of dicamba, picloram and 2,4-D in soil columns. Weed Sci., 1977, **25**:159 ~ 162.
3 Murray P E, Lumley P J, Ross H F, Smith A J. Tooth slice organ culture for cytotoxicity assessment of dental materials. Biomaterials, 2000, **21**:1711 ~ 1721.
4 Mellick G D, Roberts M S. Structure-hepatic disposition relationships for phenolic compounds. Toxicol. Appl. Pharmacol., 1999, **158**:50 ~ 60.
5 Boyd S A, Shelton D R, Berry D, Tiedje J M. Anaerobic biodegradation of phenolic compounds in digested sludge. Appl. Environ. Microbiol., 1983, **46**:50 ~ 54.
6 Taraban R H, Berry D F, Berry D A et al. Degradation of dicamba by an anaerobic consortium enriched from wetland soil. Appl. Environ. Microbiol., 1993, **59**: 2332 ~ 2334.
7 Milligan P W, Haggblom M M. Biodegradation and biotransformation of dicamba under different reducing conditions. Environ. Sci. Technol., 1999, **33**:1224 ~ 1229.
8 Pavel E W, Lopez A R, Berry D F et al. Anaerobic degradation of dicamba and metribuzin in riparian wetland soils. Water Res., 1999, **33**: 87 ~ 94.
9 Yang J, Wang X Z, Hage D S, Herman P L, Weeks D P. Analysis of dicamba degradation by *Pseudomonas maltophilia* using high performance capillary electrophoresis. Anal. Biochem., 1994, **219**: 37 ~ 42.