淤泥优势菌对手性农药 2 ,4-滴丙酸甲酯的对映体选择性降解

马云 , 徐超 , 陈胜文 , 文岳中 ,刘维屏*
(浙江大学环境科学研究所 ,杭州 310029)

摘要 :考察了手性农药 2 ,4-滴丙酸甲酯(DCPP M) 生物降解过程中的对映体选择性 ,通过驯化、培养分离了 1 株对其具有降解能力的菌株 DP ,并且运用手性毛细管气相色谱测定了 DCPP M 在降解过程中的对映体分数(EF) , 评价了 DCPP M 在水相中的对映体选择性生物降解 .研究表明在菌株 DP 接种过的介质中 ,2 个对映异构体均被迅速降解 ,但是 *R* 型 DCPP M 的逸散速度明显快于相对应的 *S* 型 ;EF 值发生了显著的偏离 ,从一开始的 0. 5 变化到最后的 1 .证实了该菌种对 DCPP M 的降解存在着对映体选择性 .

关键词 :2 ,4-滴丙酸甲酯 ;对映体选择 ;生物降解 ;淤泥
中图分类号 : X172 文献标识码 : A 文章编号 :0250-3301(2005) 04-0152-04

Enantioselective Degradation of 2 , 4-Dichlorprop Methyl Ester by Sediment Bacteria

MA Yun , XU Chao , CHEN Sheng-wen , WEN Yue-zhong , LIU Wei-ping
(Institute of Environmental Science , Zhengjiang University , Hangzhou 310029 , China)

Abstract : Enantioselective Degradation of 2 ,4-Dichlorprop methyl ester was studied by sediment bacteria . One DCPP M-degrading bacteria stain was isolated from contaminated sediments . The EF values were determined by chiral GC . The enantioselectivity of DCPP M biodegradation in aquatic phases were evaluated . Incubation with DCPP M-degrading bacteria show that the *R* enantiomer was preferentially degraded over the corresponding *S* enantiomer of DCPP M . The EF values show a much higher deviation . It indicate that the microbial degradation of DCPP M was enantioselectivety .

Key words : dichlorprop methyl ester ; enantioselectivity ; biodegration ; sediment

世界上使用的农药中有 25 %是具有手性中心的分子[1] ,它们都含有多个光学异构体或对映体 .它们所包含的对映体之间除旋光性不同外具有相同的物理化学性质 ,但是它们潜在的生物效应如毒性、致癌性、致突变性和致内分泌紊乱性等大都具有对映体选择性[2] .尽管预知不同对映体可能具有完全不同的生物活性 ,但目前生产和使用的大部分手性化学物质仍为外消旋体[3 ,4] .在研究手性污染物的环境行为及生态效应时 ,一直以来 ,大量的环境研究都把外消旋体污染物视为单一化合物 .几乎所有的环境法规也把手性化合物当成单一化合物[5] .因为对映体纯与外消旋体可能存在不同的生物和毒理性质 ,所以弄清单个对映体的环境行为 ,在对映体水平上研究手性污染物的环境行为是非常重要的 .

1991 年 Faller 等人[6]运用衍生化 β环糊精手性毛细管气相色谱测定了北海海水中 α六六六的对映体浓度比值 ,从而首次证实了手性污染物在环境中的对映体选择性降解 .近 10 多年来 ,手性化合物的色谱拆分技术迅速发展 ,为在对映体水平上研究手性污染物的环境行为奠定了技术基础 .目前我国在环境手性污染物的研究方面尚属空白 .国际上在这方面的研究也不是很深入 ,在分子水平上对手性污染物对映体选择性降解的机理还不是很清楚 .

本文研究了淤泥菌株对 DCPP M 对映体选择性生物降解过程中的异构体选择性 ,从而更好的了解对映体选择性的机理和生态毒理 .

1 材料和方法

1. 1 实验材料

2 ,4-滴丙酸(DCPP) 的结构式中含有 1 个手性碳 ,所以它包含了一对对映异构体 .但是它的除草活性主要集中在 *R*-对映体上 ,而 *S*-对映体的活性则很小 .由于 DCPP 的沸点超出了所使用手性柱的最高限温 ,所以对其进行酯化处理[7]得到了 2 ,4-滴丙

收稿日期 :2004-10-16 ;修订日期 :2004-11-24
基金项目 :国家自然科学基金资助项目(30270767) ,国家杰出青年基金资助项目(20225721)
作者简介 :马云(1977 ~) , 女 ,博士研究生 ,主要从事污染控制化学研究 .
* 通讯联系人

酸甲酯(DCPP M) (图 1) .包括 DCPP 在内的对映异构体具有不同的生物活性,对映体选择性降解可能会完全改变某个污染物的环境风险[8].

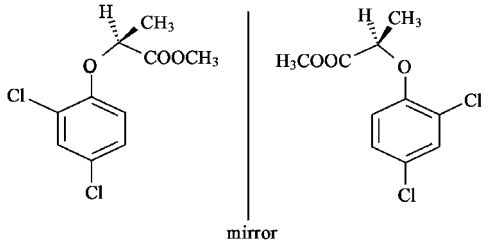

图 1　2,4-滴丙酸甲酯对映异构体结构式

Fig.1　The enantiomers of dichlorprop methyl ester

外消旋 2,4-滴丙酸甲酯(*rac*-DCPP M) 、*R*-2,4-滴丙酸甲酯(*R*-DCPP M) 由本所有机合成室合成,经质谱和 NMR 验证;乙酸乙酯:分析纯,杭州大方化学试剂厂;无水硫酸钠:分析纯,上海试剂总厂.

1.2　实验仪器

Shimadzu 2010 气相色谱仪, AOC-20s + i 自动进样器, ^{63}Ni 电子捕获检测器和 Gcsolution 气相色谱工作站软件;振荡恒温培养箱,太仓市实验设备厂;Spectrumlab 22pc 可见分光光度计,上海棱光技术有限公司.

1.3 菌种的驯化和筛选分离

活性污泥取自绍兴污水处理厂,经过 2 个月的连续驯化、反复培养、分离,得到 1 株能以 DCPP M 为唯一碳源的无机盐培养基中生长良好的菌株,命名为 DP.

1.4 生物降解实验

通过菌株 DP 降解 DCPP M 来测定生物降解过程中的对映体选择性.每 L 生物降解实验所用的矿物盐溶液包含以下成分:12.5 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 2 g KH_2PO_4, 0.4 g $(NH_4)_2SO_4$, 0.1 g $MgSO_4$, 微量 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, H_3BO_3, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, $ZnCl_2$, NH_4VO_3, $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, $NiSO_4 \cdot 6H_2O$, H_2SO_4. 然后用 NaOH 溶液调节 pH 至 7.0.在溶液中加入 DCPP M 使其初始浓度分别为 5 mg·L^{-1}、10 mg·L^{-1}和 15 mg·L^{-1}.在 500 mL 的三角烧瓶中分别加入 200 mL 的农药溶液,然后在每个烧瓶中分别再加入 10 mL 的菌种浓缩液,初始菌种群密度为 1×10^{10} CFU/mL.同时设相同的无接种样品作为空白对照.所有的样品机械振荡(30 ℃,150 r/ mim) 来保持样品的充分混合.每间隔一定时间取样进行 GC 分析,并且在 546 nm 处测定菌密度,每次取 3 个平行样品.

1.5　样品前处理

取样前在 10 mL 具盖试管中加入 4g 无水硫酸钠和 4 mL 乙酸乙酯,然后将 1 mL 样品加入试管中,在振荡器上机械振荡 1 h,再静置 1 min 后倒入 1.5 mL 自动进样瓶中,最后进行气相色谱分析.

1.6　手性色谱分离和分析

瑞士 BGB-172 手性毛细管气相色谱柱(柱长 30 m,内径 0.25 mm,液膜厚度 0.25 μm,填料 20 % 三-丁基二甲基硅烷基-β环糊精溶解 15 %二苯基和 85 %二甲基聚硅氧烷) ;载气为高纯氦气,流量为 1.2 mL/ min;补充气为高纯氮气,流量为 50 mL/ min;进样量 1 μL,分流比 30∶1;进样器温度 200 ℃;检测器温度 230 ℃;柱箱程序升温:初温 140 ℃,保持 50 min, 升温速率 3 ℃/ min,终温 220 ℃,保持 10 min.

2　结果与讨论

2.1　手性色谱分离

在所使用的色谱条件下,经 BGB-172 手性毛细管气相色谱柱可使 2,4-滴丙酸甲酯的一对对映异构体基本上达到基线分离(见图 2) ,峰 1 的保留时间为 44.418 min,峰 2 的保留时间为 45.112 min.在同样色谱条件下, *R*-2,4-滴丙酸甲酯为一单峰,保留时间为 45.126 min.在外消旋 2,4-滴丙酸甲酯中加入少量 *R* 型 2,4-滴丙酸甲酯进行手性色谱分离,从色谱图可以断定 *S*-DCPP M 要比 *R* 型的先流出.

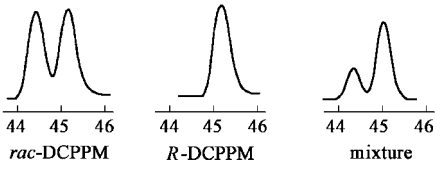

图 2　(*rac*)-DCPP M、*R*-DCPP M 和(*rac*)-DCPP M + *R*-DCPP M 的手性色谱分离图

Fig.2　Chiral gas chromatograms of methylated racemic, *R*-and *R* + racemic DCPP

2.2　对映体选择性生物降解

可以通过 DCPP M 2 个对映异构体组分的改变来描述其生物降解过程中的对映体选择性.在菌株 DP 接种过的介质中,2 个对映异构体均被迅速降解,但是 *R* 型 DCPP M 的逸散速度明显快于相对应的 *S* 型(图 3) .在 546 nm 处测定菌密度发现在取样过程中菌株一直处于生长期,菌密度值一直呈现上升的趋势,而且所取的浓度范围内初始浓度的大小对其没有什么影响(图 4) .

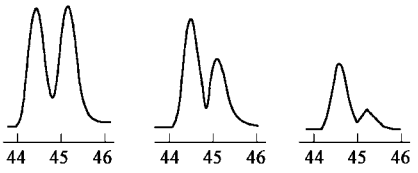

图 3 DCPPM微生物降解过程中的的手性气相色谱图

Fig.3 Chiral GC spectra of samples at various times

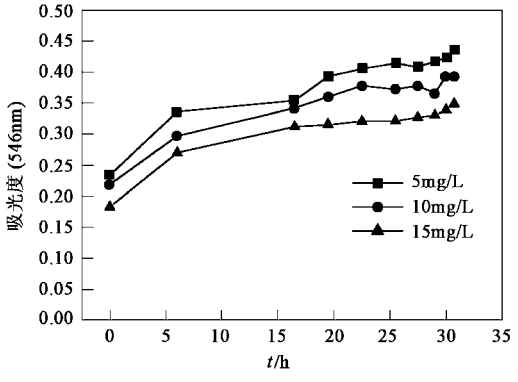

图 4 DCPPM微生物降解过程中的菌密度变化

Fig.4 Optical density at 546 nm of samples at various times

图 5 给出了降解过程中 *rac*-DCPPM 的残留情况,在所取的浓度范围内,初始浓度的变化对整个过程几乎没有影响,3 个浓度下的降解趋势基本相同.前 15h 降解较慢,这可能是微生物从较低浓度转化到足够数量这个过程所需要的时间[3].

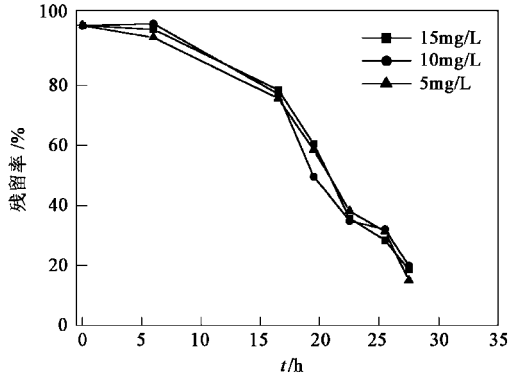

图 5 微生物降解过程中 DCPPM的残留量

Fig.5 Residues of samples at various times

一般都用手性化合物的对映体比率(ER = *S*-DCPPM/ *R*-DCPPM)变化来描述对映体选择性降解的程度,Harner 等提出在环境化学领域用对映体分数[EF = *S*-DCPPM/(*S*-DCPPM + *R*-DCPPM)]来描述更具意义,他们认为使用 ER 这种表达方式具有一定的局限性,特别是在用图表表示时,用 ER 值表示的数据可能会使人产生误解.根据其定义方法,ER 值的变化范围是从 0 到无穷大.因此,当 ER 值一旦到达无穷大其用图形表示的形式就是相同的.而且它在大于 1 和小于 1 的 2 个方向变化单位值也是不相同的,因此用数学表达时可能会更加复杂.而 EF 值的变化范围在 0 到 1.0 之间,EF = 0.5 表示外消旋体.它在大于 0.5 和小于 0.5 的 2 个方向变化的单位值是相同的[4].因此就采用了 EF 这个单位来描述降解过程的对映体选择性,如图 6 所示.从图 6 可知在所取的浓度范围内,初始浓度的变化对 EF 值的变化几乎没有影响:整个降解过程中 DCPPM 的 EF 值相对于 0.5 发生了很大的偏离,从一开始的 0.5 左右直到最后的 1.0; *R*-DCPPM 的降解速率明显快于相对应的 *S* 型,到 30h 以后基本上就只剩下 *S*-DCPPM 了.目前关于对映体选择性降解的机理还没有很成熟的理论,一般认为这是由于在 *R*-DCPPM 和 *S*-DCPPM 的降解过程中分别存在着特定的分解代谢酶,从而引起了它们降解速率的差异.

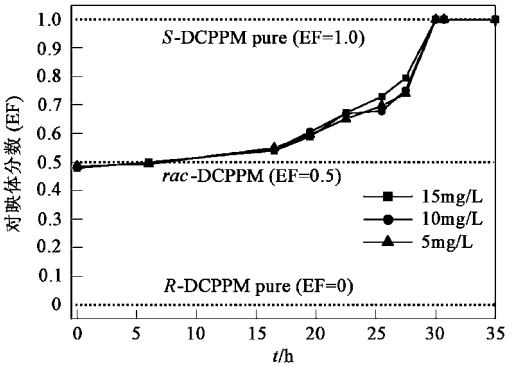

图 6 DCPPM微生物降解过程中的 EF变化

Fig.6 EF values of samples at various times

3 结论

对映体选择性可能极大的影响手性农药在非靶标环境中的生态毒理效应.由于对映体的选择性生物降解,特定的对映体可在地面水生生态系统这样的非靶标环境中得到富集.通过非手性分析得到的农药浓度所指示的可能与实际的生态毒理学效应并不相符.同时也表明从经济和效益的目的出发,即使使用对映体纯的农药也不一定能产生预期的环境效应.很多研究都发现[3,9],对映体选择性生物降解可能具有环境特定性,应该在不同的环境条件下进行研究.

参考文献:

[1] Williams A. Opportunities for Chiral Agrochemicals[J]. Pestic. Sci., 1996, **46**:3~9.

[2] 乔依.手性农药[J].农药世界,1998, **20**(4):1~5.

[3] Lewis D L, Garrison A W, Wommack K E. Influence of environment changes on degradation of chiral pollutants in soils[J]. Nature, 1999, **401**:898~901.

[4] Harner T, Wiberg K, Norstrom R. Enantiomer fractions are preferred to enantiomer ratios for describing chiral signatures in environmental analysis[J]. Environ. Sci. Technol., 2000, **4**(1):218~223.

[5] Armstrong D W, Reid G L, Hilton M L. Relevance of Enantiomeric Separations in Environmental Science[J]. Environ. Pollut., 1993, **79**(1):51~56.

[6] Faller J, Huhnerfuss H, Konig W A. Do marine bacteria degrade- Hexachlorocyclohexane stereoselectivity?[J] Environ. Sci. Technol., 1991, **25**(2):676~678.

[7] 文岳中, 蔡喜运, 马云, 刘维屏.衍生化-手性毛细管色谱分离和测定水中的 2,4-滴丙酸[J].分析化学,2004, **32**(11):1492~1494.

[8] Buser H R, Muller M D. Occurrence and transformation reactions of chiral and achiral phenoxyalkanoic acid herbicides in Lakes and Rivers in Switzerland[J]. Environ. Sci. Technol., 1998, **32**(3):626~633.

[9] Buser H R, Muller M D, Poiger T, Balmer M E. Environment behavior of the chiral acetamide pesticide metalaxyl: enantioselective degradation and chiral stability in soil[J]. Environ. Sci. Technol., 2002, **36**(2): 221~226.

《环境科学》征稿简则

1. 来稿报道成果要有创新性,论点明确,文字精炼,数据可靠。全文不超过 8000 字(含图、表、中英文摘要及参考文献)。国家自然科学基金项目、国家科技攻关项目、国际合作项目或其它项目请在来稿中注明(在首页以脚注表示)。来稿请用 A4 纸激光打印(一式 3 份),寄至本刊编辑部。稿件往来一般通过本刊编辑部,请不要寄给个人,以免耽搁或丢失。

2. 稿件请按 GB 7713-87《科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式》的规定撰写。论文各部分的排列顺序为:题目;作者姓名;作者工作单位、地址、邮政编码;中文摘要;关键词;中图分类号;英文题目;作者姓名及单位的英译名;英文摘要;关键词;正文;致谢;参考文献。

3. 论文题目应简练并准确反映论文内容,一般不超过 20 字,少用副标题。

4. 中文摘要不少于 300 字,以第 3 人称写。摘要内容包括研究工作的目的、方法、结果(包括主要数据)和结论,重点是结果和结论。英文摘要与中文对应,注意人称、时态和语言习惯,以便准确表达内容。

5. 前言包括国内外前人相关工作(引文即可)和本工作的目的、特点和意义等。科普知识不必赘述。

6. 文中图表应力求精简,同一内容不得用图表重复表达,要有中英文对照题目。图应大小一致,曲线粗于图框,图中所有字母、文字字号大小要统一。表用三线表。图表中术语、符号、单位等应与正文一致。

7. 计量单位使用《中华人民共和国法定计量单位》(SI)。论文中物理计量单位用字母符号表示,如 mg(毫克),m(米),h(小时)等。科技名词术语用国内通用写法,作者译的新名词术语,文中第一次出现时需注明原文。

8. 文中各级标题采用 1,1.1,1.1.1 的形式,左起顶格书写,3 级以下标题可用(1),(2)……表示,后缩 2 格书写。

9. 文中外文字母、符号应标明其大小写,正斜体。生物的拉丁学名为斜体。缩略语首次出现时应给出中文全称,括号内给出英文全称和缩略语。

10. 未公开发表资料不列入参考文献,可在出现页以脚注表示。文献按文中出现的先后次序编排,常见文献书写格式为:

期刊:作者(外文也要姓列名前).论文名[J].期刊名,年,卷(期):起页~止页.

图书:作者.书名[M].版次(第一版不标注).出版地:出版社,年.起页~止页.

会议文集:作者.论文名[A].见(In):编者.文集名[C].出版地:出版社(单位),年.起页~止页.

学位论文:作者.论文名[D].出版地:出版单位,出版年.

报告:作者.论文名[R].出版地.出版单位,出版年.

专利:专利所有者.专利题名[P].专利国别:专利号,出版日期.

11. 来稿文责自负,切勿一稿多投。编辑对来稿可作文字上和编辑技术上的修改和删节。在 3 个月内未收到本刊选用通知,可来电询问。对未刊稿件一般不退,请作者自留底稿。

12. 来稿请附作者单位详细地址,邮编,电话号码,电子邮箱,寄至北京市 2871 信箱《环境科学》编辑部。邮编:100085;电话:010-62941102,010-62849343;传真:010-62849343;E-mail:hjkx@mail.rcees.ac.cn