

土壤中 γ -666的微生物代谢产物初步研究

谢思琴 张水铭 顾宗濂 吴留松

(中国科学院南京土壤研究所)

许多学者曾报导某些昆虫、植物、合成培养基中的微生物和动物很容易把林丹(γ -666)降解成多种产物[1]。但关于林丹在土壤微生物群体和土壤分离菌作用下的降解产物研究得不多。Yule等曾报导了在水渗透的土壤和保水处理的土壤中,在好气条件下林丹缓慢分解为 γ -五氯环己烯。并从中分离到二株降解菌(均为芽孢杆菌)[2]。Tsukano等在林丹处理的渍水水稻土中发现了 γ -四氯环己烯[3]。Mathur等用林丹处理的渍水砂壤土、矿质土、腐殖土以及好气湿润条件下的矿质土和腐殖土经培养后,测出了林丹的分解产物,主要是 γ -五氯环己烯,此外还有三氯苯、四氯苯、五氯苯、四氯环己烯和少量的二氯苯[1,4]。

顾宗濂等曾对辽宁省兴城县等地果园土壤及江苏省海门县麦地土壤微生物群体降解 γ -666的作用,在

实验室进行了研究。指出提高旱地土壤湿度,促进土壤中微生物活动,可提高微生物群体降解 γ -666的效果。土样经56天培养,其降解率可达100%[5]。为进一步了解上述土壤中微生物群体以及混合分离菌对 γ -666的代谢产物,我们继续进行了试验研究。

一、材料和方法

(一)土壤培养 取辽宁省兴城县等地果园土壤及江苏省海门县麦地土壤[5],风干过筛,每份称土样100克装入500毫升三角瓶中,每克土加35微克 γ -666,土样含水率调至30%,塞上棉花塞。另取一份作灭菌对照,高压灭菌连续三次,每次一小时。将处理后的土样置于25—28℃下培养八周。在培养过程中,使土样含水率保持在30%左右。

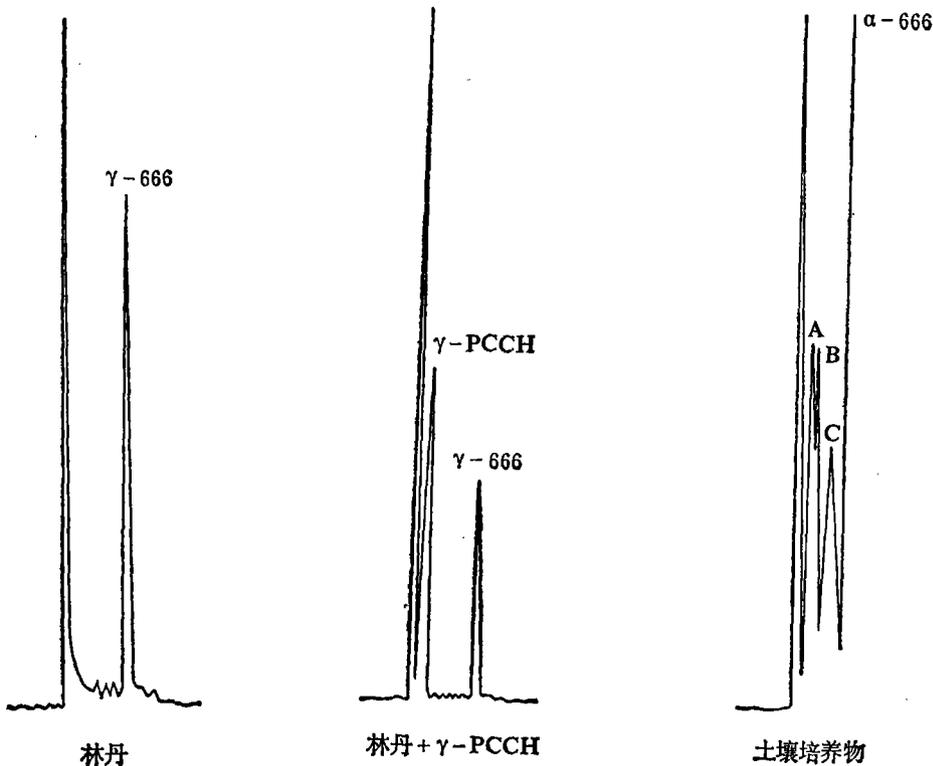


图1 林丹、 γ -五氯环己烯(γ -PCCH)标准品和林丹处理的土壤培养物分别在柱温215℃下所测得的气相色谱

(二)分离菌混合接种培养 从具有降解 γ -666 能力的土壤中分离到的 8 株好气细菌,混合接种于含 0.1% 葡萄糖的饱和 γ -666 的无机盐培养基中,28℃ 下摇瓶培养 20 小时,离心收集细胞,然后用 pH 7 的饱和 γ -666 的磷酸盐缓冲液稀释细胞,用光电比色计(波长 545 毫微米)比色,当细胞悬液的透光度达到 4 时,再置于 28℃ 下摇瓶培养 60 小时。

(三)样品制备 将土壤培养物及分离菌混合接种的培养物,分别依次用 150、100、100 毫升的 1:1 戊烷:丙酮混合溶剂提取三次,每次用往复式振荡器振荡 2 小时(混合菌培养物每次只需振荡 10 分钟),将获得的戊烷、丙酮混合提取液用三倍体积的 1% 氯化钠溶液提取三次,保留戊烷层,再用 150 毫升戊烷提取水相三次,把所得到的戊烷提取液合并,通过无水 Na_2SO_4 干燥,用 K-D 浓缩仪将提取液蒸馏浓缩至近 10 毫升,用容量瓶定容至 10 毫升,然后把浓缩液放在 20 克弗罗里土(含水 3%)做成的柱上层析,依次用 100 毫升戊烷、250 毫升 6% 的乙醚/戊烷、100 毫升乙醚洗脱,分别收集 100、250、110 毫升左右,再将这三个组分分别用 K-D 浓缩仪蒸馏浓缩到近 50 毫升,定容至 50 毫升。取上述三种浓缩液各 5 毫升分别于三只指形管内,让其自然蒸发至干,用 0.2 毫升戊烷稀释溶解,

在硅胶 G 制成的薄板上点样,用体积比为 1:1 的丙酮:乙烷作展开剂进行层析分离。按照不同的展开距离分段,分别用刮刀刮下,再用适量的石油醚提取,供气相色谱仪分析。

(四)气相色谱测定条件 仪器为 GC-5A 型配有电子捕获鉴定器的气相色谱仪。色谱条件为 2% QF-1 和 1.5% OV-17 混合液涂于 Chromosorb W(AW-DMCS)60-100 目的担体上,玻璃柱长 2 米、内径 3 毫米,载气流(N)60 毫升/分,柱温 215℃ 和 170℃,气化温度为 250℃,鉴定器温度为 250℃,进样量为 1 微升。

标准 γ -五氯环己烯(γ -PCCH)是本实验室按 Karapally 等[6]提出的方法制备的。其它标准氯苯和 666 的四种异构体都是国产商品制剂。

二、结果和讨论

土壤培养物的提取液,经薄层层析分离,再用气相色谱仪分析,在柱温 215℃ 下测定时,色相色谱图上出现三个未鉴定出的物质(A、B、C)(图 1)。由于这三个峰分离得不够清楚,降低柱温至 170℃,从而使这三个峰明显地分离开(图 2)。根据色谱峰的保留值定性,本试验在柱温 170℃ 下所测得的几种标准化合物在气相色谱图上的保留时间为:间-二氯苯 10 秒 8,邻-二氯苯 14 秒 4,1,3,5-三氯苯 21 秒 6,1,2,4-三氯苯 27 秒 6,1,2,3-三氯苯 37 秒 2,1,2,4,5-四氯苯 1 分 1 秒 2, γ -五氯环己烯(γ -PCCH) 1 分 57 秒 6, α -666 5 分 54 秒。土壤培养物提取液出现的第一个峰——A 峰的保留时间也为 1 分 57 秒 6,与 γ -五氯环己烯标准品的保留值相同(图 1、2),因而认为 A 物质应属 γ -五氯环己烯。据文献报导,林丹在土壤中的微生物代谢产物,除早先发现的 γ -五氯环己烯[2]以外,以后还发现有四氯环己烯和几种氯苯[1,4]。本试验所发现的另外二个峰——B 峰的保留时间为 2 分 26 秒 4、C 峰为 4 分 13 秒 2,对照现有的几种标准化合物色谱峰的保留值,没有一个峰是与上述几种标准氯苯类化合物色谱峰的保留时间相同。它们的位置处于 γ -五氯环己烯之后, α -666 之前,而上述诸氯苯化合物的位置处于 γ -五氯环己烯之前。因此究竟属于哪一种化合物,有待进一步研究。

1975 年 Mathur 等报导,林丹的降解产物主要在第二组分中,即 6% 乙醚/戊烷洗脱弗罗里土柱得到的洗脱液中[4]。1977 年他们又报导,林丹的降解产物主要是在第一组分中,即戊烷洗脱液中[1]。本试验发现的三种新物质均在戊烷洗脱液中,6% 乙醚/戊烷洗脱液和乙醚的洗脱液中均未发现林丹的任何降解产物。

顾宗濂等 1980 年所做的研究表明, γ -666 在土壤

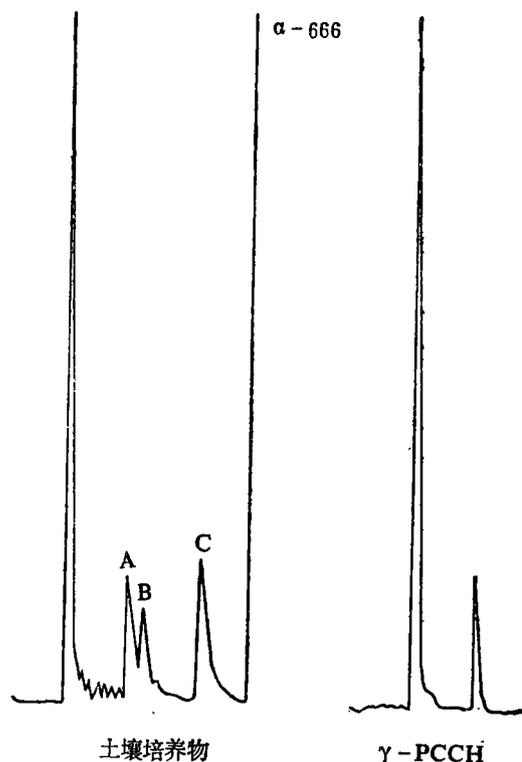


图 2 林丹处理后的土壤培养物和 γ -五氯环己烯(γ -PCCH)在柱温 170℃ 下所测得的气相色谱

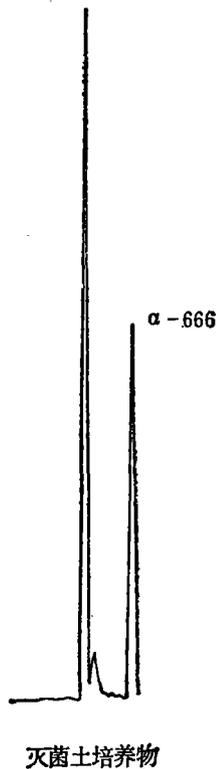


图3 林丹处理的灭菌土培养物在柱温215℃下所测得的气相色谱

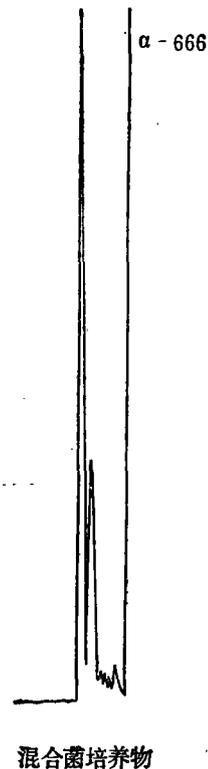


图4 8株好气分离菌加林丹培养物在柱温215℃下所测得的气相色谱

中的降解主要与微生物的作用有关[5]。本试验用林丹处理的土壤在好气条件下，培养八周后发现了三种新物质(图1、2)；而同时用林丹处理的灭菌土壤中，除了发现有极小的 γ -五氯环己烯峰(为供试土样中原来所含有)外，其它均不存在(图3)。这一结果说明B和C两种物质不是土壤中的其它物质，而是林丹的代谢物，这也进一步证实了Mathur等的研究[4]，表明这些新的化合物确实是通过非灭菌土壤内微生物降解过程形成的代谢产物。同时，用8株分离细菌加林丹的混合培养物所获得的分析结果也表明了某些土壤微生物能降解 γ -666为 γ -五氯环己烯(图4)。这一结果与早先Yule等[2]用土壤分离的二株芽孢杆菌(*Bacillus*)所做的降解 γ -666试验结果一致。

参考文献

- [1] Mathur, S. H. and Saha, J. G., Bull. Environ. Contam. Toxic, 17: 424, 1977.
- [2] Yule, W. N., Chiba, M. and Morley, H. V., J. Agr. Food Chem., 15: 1000, 1967.
- [3] Tsukano, Y. and Kobayashi, A., Agr. Biol. Chem., 36: 166, 1972.
- [4] Mathur, S. H. and Saha, J.G. Soil Science, 120: 301, 1975.
- [5] 顾宗源、谢思琴、张水铭，旱地加水可促进微生物对 γ -666的降解。土壤学报，18(3):273—280, 1981.
- [6] Karapally, J. C., Saha, J. G. and Lee, Y. W., J. Agr. Food Chem., 21:811,1973.