

DDT在污水库底泥中净化机理的研究*

施国涵 孙安强 陈兴吴 马瑞霞

(中国科学院环境化学研究所)

摘 要

通过定期测定自然污水库底泥内DDT的含量,和室内微生物降解代谢试验,证明:DDT在污水库底泥中含量逐渐减少,主要是由于底泥微生物降解作用的结果。从底泥中分离出来的枯草芽孢杆菌不仅可以降解DDT生成DDD,而且可降解DDD生成DDA和DDM。并通过试验,证明枯草芽孢杆菌降解的作用是一种酶促反应,这种酶的活性部位是在细胞膜部分。这些结果说明了污水库净化的原因。因此,在库内充分发挥底泥微生物的降解作用是消除污染,提高环境质量的一项有效措施。

有机氯农药DDT自问世以来,在防治农林、卫生害虫保证农林生产和人们健康方面起过重要作用。国际上自环境污染问题提出后,发达的国家已先后禁用。我国虽也绝大部分禁用、少量限制使用,但它在环境中的归缩,包括降解代谢作用,仍需了解和研究。为了提高环境质量,我们进行了污水库底泥净化DDT机理的研究,以便给消除污染提供参考。

DDT在耕地土壤中残留时间较长,但Hill(1967)、Guenzi(1967)、Castro(1974)等不断报道DDT在嫌气的淤泥下降解较快。Kearney等(1969)更明确指出,在土壤中消除DDT的污染,主要是浸水的条件。为了研究微生物可以降解DDT的作用,很多学者从啮齿动物(鼠类)、昆虫的排泄物中,以及土壤中分离出不同的微生物,试验其对DDT的降解作用,Wedemeyer(1967)、Patil(1970)等研究了不同微生物对DDT的降解作用。最近苏联学者Головлева(1980)的研究有显著成效。她试验了铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa* 640x)可将DDT降解成DDD及DDM等。国内尚未见到这方面的研究报道。

本项研究工作是为了提高污水库底泥净化排放农药废水的水质作用为目的。由测定自然条件下底泥中DDT逐渐消失的现象开始,然后由底泥中分离筛选出可降解DDT的降解菌——枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),进一步试验此菌对DDT以及其降解产物DDD的降解能力,和枯草芽孢杆菌活性部位的试验等。通过上述研究明确了在嫌气条件下底泥微生物是可以将DDT降解成简单的有机化合物。为充分利用污水库降解毒物和消除DDT的污染提供了参考。

一、实 验 方 法

1. 底泥样品的采集、分析和降解试验

1982年4、5、6月在天津汉沽地区污水库内多点采集了底泥样品,风干后,测定其中DDT

* 此项研究工作是在戴广茂教授领导下进行的。武汉病毒所简浩然所长审阅文稿。
在采集样品中得到中国科学院动物所高玉荣、许木启等同志大力协助,对以上同志,特致谢忱。

的含量。室内底泥中DDT的降解试验,是将各点采集的底泥样品置于容器内搅拌混匀后,从中任意取出土壤,称取60克湿土盛于200毫升三角瓶内,加入定量的工业DDT丙酮溶液(折干土重14毫克/公斤),再加入120毫升自来水混匀后,冲 N_2 盖紧,在定温25℃下静置培养,于不同时间内,取土壤样品测定DDT含量。

2. 降解菌的筛选

取混合底泥10克(湿重)加入100毫升水搅拌均匀后,静置取上清液1毫升,稀释 10^{-3} ,再从稀释液中取1毫升,放入灭菌后装有培养液的克氏瓶内,再加入工业DDT(100, 400毫克/公斤)丙酮溶液,用橡皮塞塞紧,置30℃培养,7天后待菌体生长后,不断纯化,并鉴定为枯草芽孢杆菌¹⁾。

3. 枯草芽孢杆菌对DDT、DDD降解能力的试验

在培养液内接种枯草芽孢杆菌1管,再加入一定量的P·P'-DDT或P·P'-DDD,置于30℃定温条件下,不同时间测定其P·P'-DDT或P·P'-DDD的含量。

4. 样品中DDT、DDD的萃取和含量的测定

按底泥微生物对六六六降解中的方法:即样品中加入(石油醚:丙酮=1:1)混合溶剂于索氏提取器中浸泡16小时后加热迴流萃取4小时,加入2%硫酸钠水溶液,振摇静置后,弃去水层,石油醚层用浓硫酸净化,K-D浓缩器浓缩后,待气谱测定(施国涵,1984)。

5. 代谢物的鉴定

降解产物用薄层(按已知标准样品的 R_f 值定性)、气相色谱(使用国产SP-501色谱仪,电子捕获检测器。玻璃柱长1.5米,内径3毫米,固定液1.5%OV-17、1.95%QF-1,担体Chromosorb W酸洗硅烷化。柱温195℃、检测温度250℃、汽化温度225℃,载气高纯氮,流速60毫升/分)按标准样品保留时间定性。及用质谱(JMS-D300S型色、质谱仪),根据分子离子峰的质量数 m/e 定性。

6. 细胞膜的制备及对DDT的降解

枯草芽孢杆菌的膜部分和上清液的分离是用Heritage(1977)的方法。菌体溶于0.07M磷酸盐缓冲液内,pH7.0,先经过超声波细胞破碎器将细胞破碎,再将此混合液在超速冰冻离心机0℃,30,000xg离心30分钟,将上述上清液与膜部分分离后,再进行对DDT的降解作用,即取一定量的上清液和膜部分,分别加入1毫克/公斤DDT,最后加入磷酸缓冲液使总容积为20毫升,30℃培养24小时,提取、分析测定均按上述方法。

二、实验结果

1. 底泥中DDT的自然净化作用

汉沽污水库处于天津汉沽区南约10公里处一个低洼地,靠蓟运河边,污水库堤高3米,面积约为4,600亩,蓄水量为560万立方米,平均蓄水深度为2米,1977年开始经管道输入汉沽工业废水,包括天津化工厂的有机氯农药废水,每日排入量约2万立方米,源源流入库内,每年蓄水量汛期才开闸放水,流入渤海。

1) 此菌种为中国科学院微生物所帮助鉴定,特此致谢。

污水库内含农药废水从排放口进入后,大部分吸附于底泥内。在自然条件下 5、6 两个月的样品中 DDT 含量与 4 月份相比,不论在进水口处或出水口处均较低,据室内温度与降解率试验与 4 月份自然气温情况,可能是由于 4 月份气温较低影响降解的缘故。5、6 月气温逐渐上升,微生物活动能力增强,降解能力亦增强。虽然污水仍不断进入,而含量却减少了。5 月与 4 月相比消失率为 66—78%, 6 月与 4 月相比消失率为 90—94% (表 1)。

表 1 污水库底泥中 DDT 的自然消失

Table 1 Disappearance of DDT in sewage sludge of wastewater reservoir

采集时间 (年、月、日)	进 水 口 处 DDT		出 水 口 处 DDT	
	浓度 (或含量) (mg/kg)	消失 (%)	浓度 (或含量) (mg/kg)	消失 (%)
1982.4.16	2.03		0.72	
5.24	0.68	66	0.16	78
6.23	0.20	90	0.04	94

2. 模拟条件下底泥微生物对 DDT 的降解作用

在自然污水库底泥中含有大量的有机质 (施国涵, 1984), 即有丰富的碳水化合物, 这就提供了微生物活动所必需的营养条件; 同时在 2 米深水下, 又是较嫌气的环境, 因此是嫌气细菌活动适宜的场所。

模拟试验是将底泥处于 25℃、浸水, 充氮后的嫌气条件下进行。不同间隔时间取样测定 DDT 和 DDD 的含量。以灭菌的底泥样品为对照。试验结果: 5 天可降解 DDT 62%, 20 天可降解 95%, 35 天可降解达 99%。在 DDT 降解过程中, DDT 含量不断减少, Eh 值也在不断降低, 降解产物 DDD 不断增高, 经 20 天后 DDD 含量最高达 7.59 毫克/公斤, 占 DDT 原量的 56%; 灭菌底泥中 DDT 含量基本无变化 (表 2)。这一结果说明底泥微生物在嫌气条件下将

表 2 底泥微生物对 DDT 的降解 (25℃、嫌气条件下)

Table 2 Degradation of DDT by microorganisms in the sewage sludge under anaerobic (25℃)

培育时间 (天)	DDT		DDD	DDD/DDT	对照*	Eh
	浓度 (或含量) (mg/kg)	降解 (%)	浓度 (或含量) (mg/kg)	%	浓度 (或含量) (mg/kg)	(mp)
当日	13.56		0.73	5.4	10.51	+99.1
5	5.16	61.9	2.14	15.8	—	-29.6
10	3.21	76.3	5.68	41.8	9.54	-31.6
20	0.68	94.3	7.59	56.0	9.10	-65.9
35	0.15	98.9	2.33	17.0	9.10	-75.5
70	0.12	99.1	1.60	12.0	—	-89.9

* 由于高压灭菌而使 DDT 浓度降低。

DDT 还原脱氯作用生成 DDD。同时出现了 DDD 在 20 天后含量也逐渐下降。Guenzi (1977) 报道在嫌气条件下 (30℃) 经过 4 周有 29% DDT 转化成 DDD, 我们的试验中是在 25℃ 经 20 天后就有 56% DDT 转化成 DDD (表 2)。由此初步说明, 我国北方地区的底泥微生物对 DDT 有

较强的降解能力。DDT对哺乳动物(鼠)的口服毒性(LD_{50} 为150—200毫克/公斤),DDD对哺乳动物(鼠)的口服毒性(LD_{50} 为400—3400毫克/公斤),这说明底泥微生物在降解DDT的同时也减低了毒性。

3. 枯草芽孢杆菌对DDT的降解代谢作用

为进一步证实污水库底泥微生物对DDT的降解作用,我们从底泥中筛选2株可降解DDT的菌株,其中一株经鉴定为枯草芽孢杆菌。进行降解速率和降解产物的试验。

1) 枯草芽孢杆菌的主要特征 格兰氏阳性。单细胞,杆状有机体,短链,大小为 $0.5 \times 1.4 \sim 2.8$ 微米,形成椭圆形芽孢。细胞壁为无聚- β -羟基丁酸盐。在洋菜培养基上菌落近圆形,微凸起,边缘呈小波状,有皱无光,不透明乳白色,3.5毫米大小。淀粉水解阳性,硝酸盐还原到亚硝酸盐,能利用木糖、阿拉伯糖、甘露醇,可使葡萄糖发酵。

2) 降解作用 将含有枯草芽孢杆菌的培养液中加入一定量DDT,孵育(30°C),经不同时间后测定其含量。5天后DDT降解50%,其中占原始DDT的10—24%转化为DDD;9天后可降解DDT80—95%,有44—56%转化为DDD(图1)。

对照即灭菌的培养液中DDT当日含量为3.98毫克/公斤,5天和9天后分别为3.96和3.84毫克/公斤。以上结果与上述具有活性微生物的底泥降解DDT的情况基本一致。由此说明筛选的菌株是降解DDT的优势菌株。

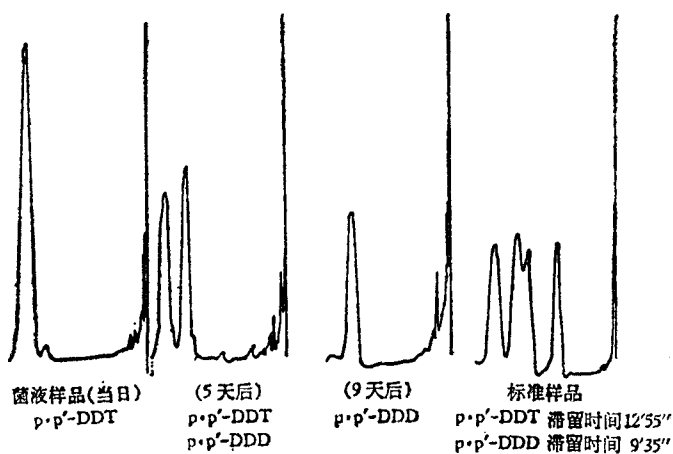


图1 枯草芽孢杆菌对DDT的降解
Fig.1 Degradation of DDT by *Bacillus subtilis*

这些试验结果与 chacko (1966) 首次报告的土壤微生物 *Actinomycetes* 可降解 DDT, 及最近苏联学者 Головлева (1980) 报告的 *Pseudomonas aeruginosa* 640x 可降 DDT 转化成 DDD 也相一致。

3) 降解产物 枯草芽孢杆菌对 DDT 的降解作用所形成的降解产物为 DDD, 根据色谱图上已知标准样品 $P \cdot P'$ -DDD 的保留时间, 可认为降解产物为 $P \cdot P'$ -DDD (图1)。再进行质谱鉴定, 分子离子峰为 $M^+ = 318$, 可确定其降解产物为 $P \cdot P'$ -DDD (图2)。

4. 枯草芽孢杆菌对 $P \cdot P'$ -DDD 的降解

1) 枯草芽孢杆菌对 DDD 的降解 枯草芽孢杆菌不仅能降解 DDT, 而且还能进一步将

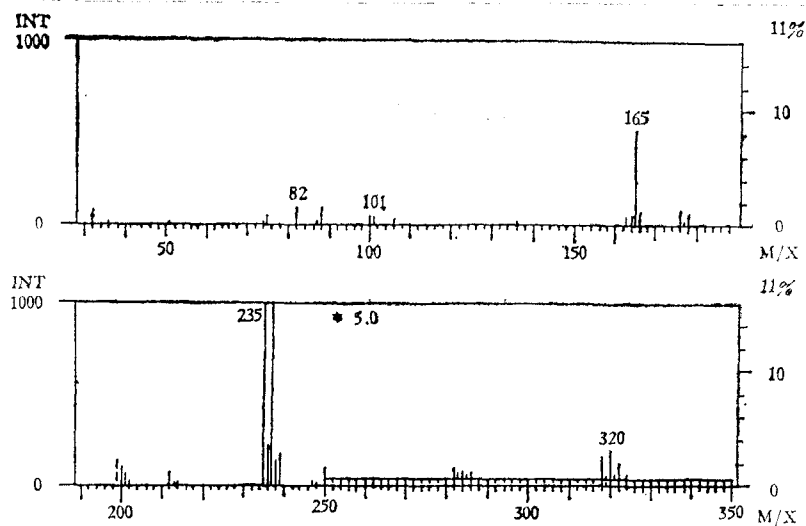


图 2 枯草芽孢杆菌降解DDT的产物DDD质谱图
Fig. 2 Mass spectrum of degradation product of DDT as DDD by *Bacillus subtilis*

DDD继续降解。

试验将枯草芽孢杆菌孵育在含 DDD 的培养液中，置于30℃条件下，9天后测得降解DDD35%，24天约可降解92%，以灭菌为对照试验，9天后DDD含量基本未变（表3）。

表 3 枯草芽孢杆菌对P·P'-DDD的降解(30℃)

Table 3 Degradation of DDD by *Bacillus subtilis* (at 30℃)

培养时间 (天)	DDD		对照 (ppm)
	浓度(ppm)	降解(%)	浓度
当日	1.52		1.52
4	1.09	28.3	1.50
9	0.99	34.9	1.50
18	0.49	72.4	—
24	0.13	91.4	—

2) 降解产物 枯草芽孢杆菌对DDD的进一步降解，DDD的降解产物中，根据气相色谱标准样品P·P'-DDM的保留时间（图3），以及薄层中已知标样DDA、DDM的 R_f 值，初步确定DDD的降解产物为DDA和DDM（图4）。

其方法是将枯草芽孢杆菌孵育二个月后降解DDD的大量培养液，提取浓缩成1毫升，用不同展开剂展开，在薄层上出现了五个代谢产物，有二个代谢物的 R_f 值分别与标准的DDA和DDM R_f 值相同（表4、图4）。

枯草芽孢杆菌不仅可以降解DDT，也能降解DDD，这种情况与Tu(1968)等用艾氏剂处理土壤所分离出来的木霉菌 *Trichoderma* 也能够降解狄氏剂的情况很相似。这是由于代谢作用不主要建立在微生物的种类上而是决定于环境条件，因此同种微生物可以代谢不同农药。

注：DDA，DDM的标准样品系四川农药所提供，

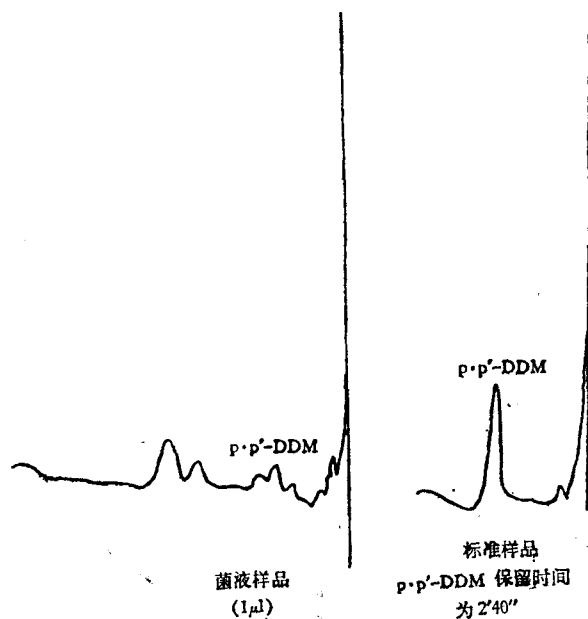


图 3 枯草芽孢杆菌降解DDD的产物
Fig.3 Degradation product of DDD by *Bacillus subtilis*

展开剂:
石油醚:氯仿=9:1V/V

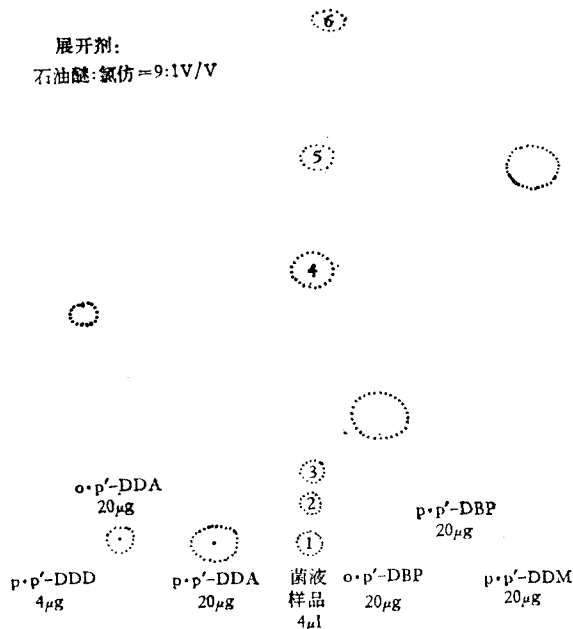


图 4 DDD及其代谢物在薄层上的图谱
Fig.4 TLC of DDD and its metabolites

5. 枯草芽孢杆菌的活性部位

我们用枯草芽孢杆菌的细胞膜部分和上清液分别进行DDT的试验, 试验结果说明枯草芽孢杆菌降解代谢DDT酶的活性位置是在细胞膜部分(表5)。与 French (1970) 用 *Escheric-*

hla coli 试验结果相一致。

6. 枯草芽孢杆菌对DDT降解代谢途径的探讨

枯草芽孢杆菌虽不以DDT为碳源, 但它可转化 DDT生成 DDD、DDA、DDM 等以及二个未知代谢物, 据我们试验结果, 枯草芽孢杆菌对DDT的代谢途径为

表 4 DDD降解产物在薄层上不同展开剂中的Rf值

Table 4 Rf values of degradation product of DDD with different solvent system on TLC

代谢产物	标准样品	展 开 系 统	
		hexane:Acetone = 8:2v/v	petroleum ether:chloroform = 9:1 v/v
1.	P·P'-DDA	0.063	0.0
2.	O·P'-DDA	0.22	0.08
3.			0.10
4.	P·P'-DDD	0.72	0.49
5.	P·P'-DDM	0.88	0.67
6.		0.96	0.86

表 5 枯草芽孢杆菌细胞膜和上清液对DDT的降解代谢

Table 5 Metabolism of DDT by the membranous fraction of the bacterial cell and supernatant

不 同 处 理	DDT原 始 量(mg/kg)	24小时后生成DDD的含量(mg/kg)
DDT + 缓冲液	1.0	0.08
DDT + 上清液	1.0	0.45
DDT + 细胞膜	1.0	2.45

〔1〕 0.07M磷酸盐缓冲液($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) pH7.0.

〔2〕 细胞膜部分的干重为10mg/ml.

〔3〕 二个试验的平均值。



按Matsumura (1978)在微生物对 DDT的代谢途径中综述了五种途径, 其中之一途径为 $\text{DDT} \rightarrow \text{DDD} \rightarrow \text{DDMS} \rightarrow \text{DDOH} \rightarrow \text{DDA} \rightarrow \text{DDM}$, DDM 可进一步开环生成 对 氯苯乙酸, 这与我们试验结果是一致的。根据Focht (1970) 曾用镰孢菌Fusarium和Hydrogenomonas共同试验可将DDT降解生成DDM, 同时进一步降解生成 $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{HCl}$ 。以上情况说明枯草芽孢杆菌将DDT降解成DDD, 进一步生成 DDM, 从而间接证明 DDM 可进一步降解成简单化合物。

三、小 结

研究证明DDT在污水库底泥中含量逐渐减少, 主要是由于底泥微生物降解作用的结果。人工合成的有机化合物进入环境后, 底泥微生物便产生了适应能力。常此下去这些底泥微生物群落中包括枯草芽孢杆菌便具有较强的适应能力, 从而不断降解DDT, 再从DDT降解生成DDD, 进一步降解生成DDA、DDM; 试验证明枯草芽孢杆菌降解DDT的作用是酶促反应,

这种酶的活性部位是在细胞膜部分。上述结果初步说明微生物降解DDT现象的机理。因此,创造嫌气环境条件促进底泥微生物对 DDT 的降解,是消除DDT 污染的重要措施。凡生产农药的工厂所排放的污水可利用污水库的方法,在库内充分发挥底泥微生物的净化作用是消除污染、提高环境质量的一项有效措施。

参 考 文 献

- 施国涵等 1984 污水库底泥微生物对六六六降解的研究 生态学报 4(4)。
- Castro, T.F. and T.yoshida 1974 Effect of organic matter on the biodegradation of some organochlorine insecticides in submerged soils. *Soil Sci. Plant Nutr.* 24(4) 367—370.
- Chacko, C.I., J.L.Lockwood and M.Zabik 1966 Chlorinated hydrocarbon pesticides: Degradation by microbes. *Science* 154: 893—895.
- Focht, D.D. and M.Alexander 1970 DDT metabolites and analogs: Ring fission by *Hydrogenomonas*. *Science* 170: 91—92.
- French, A.L. and R.A.Hoopingarner 1970 Dechlorination of DDT by membranes isolated from *Escherichia coli*. *J.Econ.Entom.* 63: 756—759.
- Guenzi, W.D. and W.E.Beard 1976 DDT degradation in flooded soil as related to temperature. *J.Environ. Qual.* 5(4): 391—394.
- Heritage, A.D. and I.C.MacRae 1977 Degradation of lindane by cell-free preparation of *Clostridium sphenoides*. *Appl. Microbiol.* 34: 222—224.
- Hill, D.W. and P.L.McCarty 1967 Anaerobic degradation of selected Chlorinated hydrocarbon pesticides. *J. water pollution control Federation* 39: 1259—1277.
- Kearney, P.C. 1969 Decontamination of pesticides in soil. *Residue Rev.* 29: 137—149.
- Matsumura, F. and H.J.Benezet 1978 Microbial degradation of insecticides In: "Pesticide Microbiology" (Hill I.R. and S.T.L.Wright Eds.) p. 638—667.
- Patil, K.C., F.Matsumura and G.M.Baush 1970 Degradation of Endrin and Aldrin, DDT by soil microorganisms. *Appl. Microbiol.* 19: 879.
- Tu, C.M., J.R.W.Miles and C.R.Harris 1968 Soil microbial degradation of Aldrin. *Life Sci.* 7: 311—322.
- Wedmeyer, G. 1967 Dechlorination of DDT by *Aerobacter aerogenes* *Appl. Microbiology* 15: (3) 569—574.
- Головделева П.А. 等 1980 The condition of DDT and its analogues decomposition by *Pseudomonas aeruginosa* 640x. *Серия Биологическая* 2: 243—253.

STUDY ON BIODEGRADATION MECHANISM OF DDT IN SEWAGE SLUDGE OF WASTEWATER RESERVOIR

Shi Guohan Sun Anqiong Chen Xingwu Ma Ruixia

(Institute of Environmental Chemistry, Academia Sinica)

The results of regular determination of DDT content in the sewage sludge of natural wastewater reservoir and of laboratory experiments on degradation and metabolism of DDT by microorganisms indicated that the content of DDT in the sewage sludge of wastewater reservoir was reduced gradually, in which microorganisms played a very important role.

Bacillus subtilis isolated from the sewage sludge not only could metabolize DDT to DDD, but also could convert DDD to DDA and DDM. The results of experiments also showed that the degradation of DDT by *B. subtilis* was due to activation of an enzyme. This active site of enzyme occurred in the membranous fraction of the bacterial cell.

These results explained the reason why wastewater containing DDT can be converted to clean water in wastewater reservoir, therefore, promoting the growth of microorganism to clean the wastewater is an effective way to eradicate pollution and improve environmental quality.