

文章编号: 1674-5566(2010)01-0111-05

酚类化合物对发光细菌的急性毒性和对 ETS 的抑制研究

李娟英, 高峰, 陈洁, 华寅, 彭自然, 王静

(上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要:研究了5种酚类化合物对发光细菌毒性和活性污泥脱氢酶活性的抑制作用。结果表明,酚类化合物对502海水发光细菌的毒性大小顺序为2,4-二氯苯酚>对硝基苯酚>邻甲基苯酚>苯酚>对氨基苯酚,对应的 EC_{50} 值分别为4.95、23.90、42.43、83.65和178.75 mg/L。而对活性污泥脱氢酶活性抑制的大小顺序同发光细菌毒性测定结果不太一致,毒性大小顺序为2,4-二氯苯酚>邻甲基苯酚>对氨基苯酚>苯酚>对硝基苯酚,相应的 EC_{50} 值分别为37、398、575、794和1333 mg/L。两种毒性测定方法的 EC_{50} 结果差异比较大,可能和测定方法的特点有关。但仅仅根据单一的、高灵敏度的发光细菌毒性测定结果来调整废水处理工艺中的各项参数而实现对水质的调控,可能会造成处理成本大幅度地增加,因此根据两种或多种毒性测定方法(其中包括以活性污泥为对象)的测定结果判定有机污染物的毒性更科学。

关键词:苯酚及其衍生物;发光细菌;脱氢酶;生物毒性

中图分类号: X 820 **文献标识码:** A

Inhibition of phenol and its derivatives on dehydrogenase activity and luminescent bacteria biotoxicity

LI Juan-ying, GAO Feng, CHEN Jie, HUA Yin, PENG Zi-ran, WANG Jing

(College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Luminescent bacteria biotoxicity and inhibition on dehydrogenase activity by phenol and its derivatives were studied in this paper. The results showed that the order of luminescent bacteria biotoxicity of the five phenolic compounds was 2,4-dichlorophenol>p-nitrophenol>orthomethylphenol>phenol>p-aminophenol and the value of EC_{50} was 4.95, 23.90, 42.43, 83.65 and 178.75 mg/L respectively. The order of inhibition on dehydrogenase activity by phenol and its derivatives was different from that of luminescent bacteria biotoxicity, but the sensitivity was relatively low, and the value of EC_{50} was 37, 398, 575, 794 and 1333 mg/L. The difference of EC_{50} value between two methods was great, which may be connected with the feature of experimental approaches. But it might result in unnecessary significant increase cost based solely on a single high sensitivity of the luminescent bacteria toxicity results to adjust the parameters of wastewater treatment process to achieve the water quality control. It would be more scientific to determine the toxicity of organic pollutants by two or more procedures.

Key words: phenol and its derivatives; luminescent bacteria; dehydrogenase activity; biotoxicity

收稿日期: 2009-06-23

基金项目: 上海市教委一般创新项目(10YZ128); 上海海洋生物学重点学科(J50701)

作者简介: 李娟英(1978-), 女, 博士, 副教授, 主要从事水污染控制方面的研究。E-mail: jyl@shou.edu.cn

发光细菌、大型藻类、鱼类等细菌和水生生物被越来越多地用于水质毒性的测定^[1],但同营养级或不同营养级的生物体对很多毒物的反应可能不同。尤其对于污水处理厂,活性污泥作为处理污染物的主体,其分解代谢污染物主要是靠其体内的酶的参与而实现的,用上述细菌、藻类或鱼类来表征水中有毒物质的毒性在很多情况下可能会产生偏差^[2]。在活性污泥中脱氢酶占有重要的地位,因为有机物在生物体内的氧化往往是通过脱氢来进行的。脱氢酶能使被氧化有机质的氢原子活化并通过污泥的电子传递体系(Electron Transport System, ETS)传递给特定的受氢体,由此通过脱氢酶活性便可间接指示活性污泥的生物活性。用于检测污泥 ETS活性的氧化还原染料是氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium Chloride TTC),它常作为一种人工电子受体,在微生物电子传递体系的作用下接受电子而被还原,并发生明显的颜色变化,无色 TTC受氢后变为红色的三苯甲基(TF)。TF的生成量直接反映了 ETS的活性^[3]。

由于酶是一类蛋白质,对废水中毒物的作用非常敏感,污泥活性出现任何异常变化都可导致三苯基甲脂(Fomazan)生成速率及污泥 ETS活性的改变,有毒物质的存在会使 ETS活性降低并影响活性污泥的生物活性^[4]。酚是工业废水中常见的有毒污染物,广泛存在于染料、煤气、焦化、石油化工、制药及油漆等工业废水中。废水生物处理很容易受到这一类化合物的攻击,这个阶段的任何影响都会大大降低处理后的出水水质。因此,通过测定脱氢酶活性的变化来评价工业废水中苯酚的毒性,了解其对活性污泥生物活性的影响规律,与发光细菌快速毒性测定结果进行对照比较分析,可为活性污泥生物处理工艺的合理设计和运行管理提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用 502 发光细菌冻干粉由华东师范大学生物系朱文杰教授提供。

接种污泥取自城市污水处理厂 A²/O 工艺的 A 段,在实验室进行短期间歇培养后进行实验,污泥浓度约为 4 500 mg/L, pH 值在 7.2 左右。

1.2 方法

1.2.1 发光细菌毒性检测

毒性测定方法参照 GB/T 15441-1995 进行,反应时间调整为 20 min。

1.2.2 脱氢酶标准曲线的绘制

取 0、20、40、60、80、100、120、140 μg TTC/mL 的系列标准溶液各 1 mL 置于 10 mL 的离心管中,再加入 2 mL Tris-HCl 缓冲液、1 mL 10% Na₂S 溶液和 1 mL 蒸馏水。将上述离心管置于 37℃ 恒温水浴振荡仪中振荡反应 30 min,然后加入 0.5 mL 甲醛和 5 mL 萃取剂(80% 丙酮),在 37℃ 恒温水浴振荡仪振荡 10 min,萃取完毕后在 4 000 r/min 下离心 5 min,取上清液于分光光度计 485 nm 处读取吸光度。

1.2.3 活性污泥脱氢酶的测定

样品预处理:实验进行之前,污泥样品先曝气 24 h 以保证所有外源基质被耗尽,然后从中取出适量的污泥混合液,用蒸馏水洗涤 2 次后加水稀释,污泥浓度控制在 2 000 mg/L 左右。从稀释后的污泥中取出一系列体积为 50 mL 的污泥混合液,并同时测定这些污泥样品的初始 ETS 活性。为消除 pH 对实验结果的影响,用磷酸盐缓冲溶液将样品 pH 值调节为 7.2。根据预实验确定的酚类化合物的浓度梯度,向这些样品中加入不同量的酚类化合物,并保持污泥混合液总体积不变。将样品置于振荡仪上振荡 2 h 后,测定抑制后的 ETS 活性。本研究均采用 3 次平行样品测定。

污泥 ETS 活性的测定:取 1 mL 污泥混合液置于 10 mL 的离心管中,并依次加入 2 mL Tris-HCl 缓冲溶液、0.5 mL 0.1 mol/L 葡萄糖溶液和 0.5 mL 0.4% TTC 溶液,迅速将制备好的样品放置于 37℃ 恒温水浴振荡仪中振荡反应 2 h 后加入 0.5 mL 甲醛终止反应,离心 5 min 后去除上清液,加入 5 mL 萃取剂(80% 丙酮),在 37℃ 恒温水浴振荡仪中振荡 10 min,萃取完毕后再离心 5 min(上述离心均在 4 000 r/min 下完成),取上清液于分光光度计 485 nm 处读取吸光度。经离心的沉淀污泥在 (105±1)℃ 下烘干 2 h 后测干重。

ETS_t 活性的计算公式^[5]如下:

$$ETS_t = \frac{D_{485} V}{k_t W t} \quad (1)$$

式中: ETS_t 为 ETS活性 [$\mu\text{g}/(\text{mg}\cdot\text{h})$], D_{485} 为波长 485 nm 处的上清液吸光度, V 为萃取剂体积 (mL), k_t 为标准曲线斜率, W 为污泥干重 (mg), t 为培养时间 (h)。

1.2.4 数据处理

为定量描述有毒物质对脱氢酶活性的影响, 其 EC_{50} 值通常用 Logistic 方程来描述^[6], 酚类化合物的浓度与 TF 的浓度关系用下式来表示, 实验数据用 Origin 6.0 软件进行处理。

$$y = \frac{k}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b} \quad (2)$$

式中: x 为有毒物质的浓度 (mg/L); y 为生成的 TF 的浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$); x_0 为 EC_{50} 值; k 值的含义是

当 $x=0$ 时 y 的值, 即未加有毒物质时的空白对照组的 TF 值; b 为经验系数。

2 结果与讨论

2.1 酚类化合物对发光细菌的毒性

对 5 种酚类化合物, 包括苯酚 (Phenol), 2,4-二氯苯酚 (2,4-Dichlorophenol 或 2,4-DCP), 邻甲基苯酚 (O-methyl phenol), 对氨基苯酚 (P-aminophenol), 对硝基苯酚 (P-nitrophenol) 进行了发光细菌的急性毒性实验, 将受试化合物的对数浓度和发光细菌抑制率进行回归分析, 得出剂量-效应回归方程如表 1 所示。

表 1 酚类化合物与发光菌的剂量-效应回归分析
Fig 1 The result of dose-effect regression analysis

受试化合物	回归方程	R	EC_{50} (mg/L)	$EC_{50Hg^{2+}}$ 值 (mg/L)*
2,4-二氯苯酚	$y = -60.8x + 92.2$	0.98	4.95	0.047
对硝基苯酚	$y = -79.1x + 159$	0.99	23.90	0.053
邻甲基苯酚	$y = -64.4x + 154.8$	0.99	42.43	0.059
苯酚	$y = -60.8x + 166.8$	0.99	83.65	0.055
对氨基苯酚	$y = -100.7x + 276.8$	0.98	178.75	0.056

注: * 是指发光细菌的发光抑制率为 50% 时对应的 Hg^{2+} 的浓度。

由表 1 可知, 发光细菌的抑制率 (5% ~ 95%) 和酚类化合物的对数浓度有明显的相关关系, 即发光细菌的相对发光度随化合物浓度的增大而减小。在给定化合物浓度的情况下, 可以根据化合物的剂量-效应回归方程计算发光细菌的抑制率。5 种酚类化合物的 EC_{50} 值差别较大, 根据 EC_{50} 值可以判定, 上述 5 种酚类化合物的毒性大小顺序为 2,4-二氯苯酚 > 对硝基苯酚 > 邻甲基苯酚 > 苯酚 > 对氨基苯酚。而 Hg^{2+} 抑制发光细菌发光率的 EC_{50} 值在 0.05 mg/L 左右。

2.2 酚类化合物对脱氢酶的毒性

2.2.1 TTC 标准曲线的绘制

用 TTC 作为人工受氢体, 将 TTC 浓度和吸光度的相关数据进行现行回归, 所得标准曲线如图 1 所示。

由图 1 可知, TTC 浓度与 485 nm 处的吸光度之间存在显著线性关系, 且具有良好的相关性。因此通过 485 nm 处某一已知的吸光度准确计算 TF 的生成量是可行的。

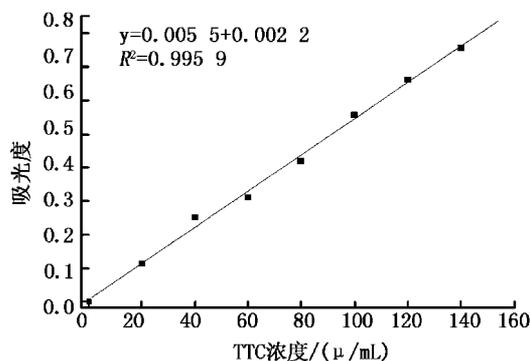


图 1 TTC 标准曲线
Fig 1 TTC standard curve

2.2.2 酚类化合物对污泥 ETS 活性的影响

图 2 是利用本文中的方法得到的上述 5 种酚类化合物对 ETS 活性抑制的实验结果。图中不同形状的点代表实测实验数据, 光滑曲线是根据 1.2.3 中的 Logistic 方程进行数据模拟的结果。

从图 2 可知, 由于官能团的不同, 5 种酚类化合物对活性污泥的抑制能力不同^[7]。根据 Logistic 方程模拟结果 (见表 2) 可知 2,4-二氯苯

酚、邻甲基苯酚、对氨基苯酚、苯酚和对硝基苯酚的 EC₅₀分别为 37、398、575、794 和 1333 mg/L。上述 5 种酚类化合物对活性污泥脱氢酶活性的抑制程度由大到小的顺序为：2,4-二氯苯酚 > 邻甲基苯酚 > 对氨基苯酚 > 苯酚 > 对硝基苯酚，毒性大小和毒性强度与发光细菌的研究结果不太一致。由表 1、表 2 可知两种毒性测定方法测定酚类化合物的毒性结果差别比较大，EC₅₀值的差异如图 3 所示，在一个甚至两个数量级，究其原因可能和两种方法本身的特点及测定条件有关。发光细菌发光的基本原理可以用下式表示^[8]：

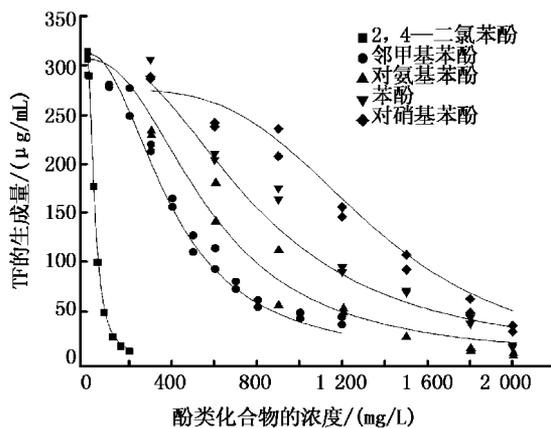


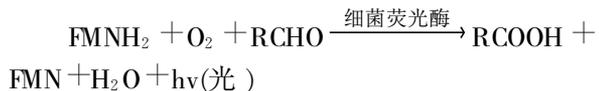
图 2 酚类化合物对 TF 生成量的影响

Fig 2 The impact of phenolic compounds on TF

表 2 酚类化合物与脱氢酶活性的剂量-效应 logistic 回归方程

Tab 2 The result of dose-effect logistic regression equation

化合物	Logistic 方程	K		X ₀ 或 EC ₅₀ (mg/L)		b	
		数值	误差	数值	误差	数值	误差
2,4-二氯苯酚	$y = \frac{315}{1 + \left(\frac{x}{37}\right)^{1.98}}$	315	12	37	3	1.98	0.10
邻甲基苯酚	$y = \frac{313}{1 + \left(\frac{x}{398}\right)^{2.12}}$	313	16	398	59	2.12	0.56
对氨基苯酚	$y = \frac{307}{1 + \left(\frac{x}{575}\right)^{2.26}}$	307	12	575	40	2.26	0.24
苯酚	$y = \frac{309}{1 + \left(\frac{x}{794}\right)^{2.31}}$	309	16	794	58	2.31	0.16
对硝基苯酚	$y = \frac{276}{1 + \left(\frac{x}{1333}\right)^{3.70}}$	276	14	1333	52	3.70	0.54
Hg ²⁺ [9]	$y = \frac{144}{1 + \left(\frac{x}{3.19}\right)^{5.67}}$	144	8.32	3.19	0.17	5.67	1.51



其中，细菌荧光酶可以被看做是一种单加氧酶，使还原型黄素单核苷酸 (FMNH) 及长链脂肪醛 (RCHO) 分别各接受一个氧原子氧化成黄素单核苷酸 (FMN) 及相应的长链脂肪酸。细菌发光参与的是细菌呼吸的一个侧支，与细菌的代谢密切相关，任何能影响细菌代谢的因素，均可影响到细菌的发光。因此发光细菌对毒物的反应非常灵敏。Hg²⁺ 抑制脱氢酶活性的 EC₅₀ 值为 3.19 mg/L 而用发光细菌测定的 EC₅₀ 值为 0.05 mg/L 和发光细菌毒性测定结果相比，采用活性污泥脱氢酶活性变化来反映污染物的毒性，灵敏度确实有些偏低，这可能和污染物在活性污泥絮体表

面及内部的吸附作用有关，同时污泥絮体内存在的丰富的微生物对有机污染物的降解作用可能也会对其毒性测定结果产生影响。

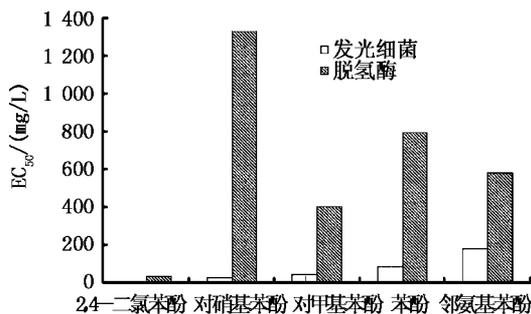


图 3 两种方法毒性测定结果比较

Fig 3 Comparison of two methods toxicity

Cronin等^[10]和 Kaiser等^[11]的研究结果也表明,发光细菌作为判别污水处理厂中有毒污染物毒性的指示生物,其反应太过敏感,使用发光细菌毒性测定方法来筛选大批量样品中可能有问题的样品是可行的,如果单单根据发光细菌的测试结果调整污水处理系统的水力停留时间、泥龄、混合液回流比等工艺参数来实现对系统出水水质的控制,可能会导致废水处理成本无谓的大幅度增加。因此为了更准确地判定污水处理厂中有机污染物的毒性,至少应该以活性污泥为对象做一组毒性实验,而不能以发光细菌的毒性测定结果作为唯一的判定依据^[12]。虽然脱氢酶活性对文中5种酚类化合物较低的灵敏度限制了其在实际生产中的应用,但是为了探明有毒持久性有机污染物的生物降解性能,脱氢酶活性对其他有毒污染物灵敏性的研究还有待进一步的研究,该生物毒性测定方法的进一步优化和改进工作也有待进一步提高,这对于其他生物毒性测定方法的优化和开展具有现实指导意义。

3 结论

5种酚类化合物对502海水发光细菌的毒性大小顺序为2,4-二氯苯酚>对硝基苯酚>邻甲基苯酚>苯酚>对氨基苯酚,对应的 EC_{50} 值分别为4.95、23.90、42.43、83.65和178.75 mg/L。但对活性污泥脱氢酶活性抑制的灵敏度相对较低,其毒性大小顺序为2,4-二氯苯酚>邻甲基苯酚>对氨基苯酚>苯酚>对硝基苯酚,对应的 EC_{50} 值分别为37、398、575、794和1333 mg/L。

两种毒性测定方法的 EC_{50} 结果差异比较大,可能和各自的测定方法有关,但单一的、高灵敏度发光细菌毒性测定方法不适宜作为判定生物处理工艺中有机污染物毒性的唯一依据,可能根据两种或多种毒性测定方法(其中包括以活性污泥为对象)的测定结果判定有机污染物的毒性更科学。

参考文献:

- [1] Monel J L, Biion G, Koopman B. Use of microtox for assessing copper complexation with organic compounds[J]. Arch Environ Contam Toxicol 1988, 17: 493-496.
- [2] Shoji R, Sakoda A, Sakai Y, et al Formulating bioassay data of chemicals and environmental water[J]. Water Science and Technology 2000, 42 (3-4): 115-124.
- [3] Fikret Kargi, Isil Konya. COD, Para-chlorophenol and toxicity removal from para-chlorophenol containing synthetic wastewater in an activated sludge unit [J]. Journal of Hazardous Materials 2006, 5: 226-231.
- [4] Lv Zhen hua, Yao Yan lai, Lv Zhen mei, et al Effect of tetrahydrofuran on enzyme activities in activated sludge[J]. Ecotoxicology and environmental safety, 2008, 70: 259-265.
- [5] Anderson K, Koopman B, Bitton G. Evaluation of NIT-dehydrogenase assay for heavy metal inhibition of activated sludge [J]. Wat Res 1988, 22(3): 349-353.
- [6] Federica Abbondanzi, Anabela Cachada, Tiziana Campisi et al Optimisation of a microbial bioassay for contaminated soil monitoring: bacterial inoculum standardization and comparison with Microtox assay[J]. Chemosphere 2003, 53: 889-897.
- [7] 徐寿昌. 有机化学 [M]. 2版. 北京:高等教育出版社, 2003, 181-193.
- [8] 朱文杰, 郑天凌, 李伟民. 发光细菌与环境毒性检测 [M]. 北京:中国轻工业出版社, 2009, 53-55.
- [9] 陈洁. 重金属污染物对污泥脱氢酶活性的抑制研究 [D]. 上海:上海海洋大学, 2009, 16-17.
- [10] Cronin MTD, Dearden JC. The comparative toxicology of the Microtox test [M] //Richardson M. Ecotoxicology Monitoring VCH Weinheim, Germany, 1993, 213-223.
- [11] Kaiser K L. Qualitative and quantitative relationships of Microtox data with toxicity data for other aquatic species [M] //Richardson M. Ecotoxicology Monitoring VCH Weinheim, Germany, 1993, 197-211.
- [12] Dalzell D J B, Alte S, Aspichueta E, et al A comparison of five rapid direct toxicity assessment methods to determine toxicity of pollutants to activated sludge[J]. Chemosphere 2002, 47: 535-545.