



关于有机化学污染物与有机化工废水的生物毒性与生物降解性的初步研究 (下)

张 忠 祥

(北京市环境保护科学研究所)

六、脱氢酶活性测定法评价 有机污染物的生物毒性

利用脱氢酶测定微生物活性的方法最初是 Lenbaro 等人在测定土壤和天然水体底泥的生物活性与自净能力的关系时提出的,后来应用于评价活性污泥的活性^(1, 2)。苏联文献报道,利用大肠杆菌脱氢酶法评价化学污染物质的生物毒性的研究也获得了较满意的结果,并提出了评价多种有机化学污染毒物同时存在时对生物脱氢酶活性的共同作用问题。该实验结果证明,多种有毒物质的共同毒性作用与污染毒物的性质和浓度有明显的相关性,可反映出毒性的叠合效应、强化效应和削弱效应⁽³⁾。

近年来报道了采用氯化三苯基四氮唑(TTC)测定脱氢酶活性和假单胞杆菌(Pseudomonas)细胞分裂开始受抑制时有机污染物浓度的方法来评定水中较稳定的3,5-二氯苯(3,5-DCP)的生物毒性⁽⁴⁾。该实验室所获毒性浓度的结果与活性污泥装置中所取得的结果基本吻合。

脱氢酶属氧化还原酶,是生物氧化有

机物过程中酶系统的重要组成部分。生物群体的脱氢酶活性反映了生物的细胞活性。活性污泥(或生物膜)的脱氢酶活性与其所含细菌数成正比例,而细菌数与其生长相有密切关系,与可资利用的基质和营养物总量成正比。在有机物生物降解过程中,细菌脱氢酶活性随着基质浓度的降低而降低。脱氢酶具有蛋白特性,对毒物非常敏感。若基质中含有毒物,可促使脱氢酶活性急剧下降。因此,通过测定活性污泥(或生物膜)的脱氢酶活性的降低程度,可简捷地度量微生物系统中活性生物量,并借以评价有机污染物的生物毒性,故在生物监测方面应用日益广泛。

该方法的测定原理是在微生物呼吸链中以氧化还原指示剂代替氧作为 H^+/e^- 的最终受氢体,使指示剂颜色发生变化。氯化三苯基四氮唑是一种敏感的指示剂,当细菌对有机物进行生物氧化时,脱氢酶将氢脱下并转移到TTC上,成为具有红色的三苯基甲腈(Triphenyl formazan),其光密度值能反映出脱氢酶活性的升高或降低。其操作程序为:①将活性污泥离心脱水,用蒸馏水洗涤,去除表面有机物及还原性物质,以减少非酶物的干扰。洗涤三次后,用pH为7.0的磷酸盐缓冲液制成稀污泥悬浊液备用;②以三苯基甲腈(TF)

在25毫升溶液中所含微克摩尔浓度为横坐标,光密度为纵坐标,绘得标准曲线;③取上述活性污泥悬浊液4.5毫升,振荡,使其呈悬浊状态,在黑暗条件下,37℃水浴中恒温10分钟后,加入0.5毫升待测有机污染物或废水及0.5毫升0.1%的TTC溶液,继续在37℃下恒温30分钟,此期间振荡2次,然后加少许冰醋酸以中止酶反应;再注入丙酮,得到25毫升TF红色丙酮提取液,过滤后测其光密度。而酶活性以相当于对照组的百分数表示。

我们曾用上述方法对某化工厂有机合成废水中含有的典型化学物质做过试验。其结果如表1所示。

表1 有机污染物抑制微生物生化反应的极限允许浓度

有机污染物	极限允许浓度 (毫克/升)
乙二胺	250
邻氯酚	<500
硫代乙醇酸	100
丙烯腈	300
亚硝酸异戊酯	500
吡啶	1500—2000
三聚乙醛	<1000
溴乙烷	<1000
二碘甲烷	1000
三乙酸甘油酯	>2000
丁酮	<2000
2,5-二甲基四氢呋喃	2000

由表1结果看出,脱氢酶活性测得结果与*e. Coli*细胞分裂抑制时的浓度基本吻合。

七、量测微生物细胞的三磷酸腺苷(ATP)以评价有机污染物的生物毒性的方法

利用ATP评价和控制有机废水的可生化性的研究日益趋向实用化。该法快

速、简易,既能评价生物净化过程的生物量,也能评价活性污泥微生物的代谢活性。

S.Y.Chiu等^[5]曾在实验室条件下从连续流活性污泥反应器里取样研究细胞的生理行为(Physiological Behavior),研究细胞体内ATP的含量、生物量(Biomass)与基质浓度之间的关系,研究生物细胞内ATP含量与基质去除率之间的关系。他们先对纯培养(Pure Culture)进行研究,求出其ATP生长量系数 y_{ATP} (ATP Growth yield Coefficient),该系数表征每摩尔ATP合成量时所生成的细胞量。有人曾对未经鉴别的一些好气革兰氏阴性及阳性菌株以及埃希氏大肠杆菌(*Escherichia Coli*)、假单胞杆菌属的*Pseudomonas fluorescens*及芽孢杆菌属的*Bacillus Subtilus*等在细菌生长滞缓期、对数生长期及稳定期的ATP含量进行研究。他们认为,处于生长稳定期的活性污泥微生物(细菌)的ATP含量正比于存活细胞量。因此ATP成为能反映不同生长时期生物量的近似参数,可用来测定活性污泥的代谢活性。

S.Y.Chiu等采用杜邦公司生产的生物计(Biometer)来量测ATP值。在配制的培养基中,投入活性污泥菌种,置于培养瓶中,然后,振荡曝气,使细菌进入稳定生长阶段,测其MLSS值。取1毫升混合液与1毫升丁酮,混合,使细胞在10秒钟内消溶,然后再加8毫升辛醇,剧烈振荡10秒钟,置于离心机中(转速为3000转/分钟),离心3分钟,丁酮乃浮升至辛醇上面,此时细胞内的ATP转入水中,取出0.01毫升萃取后的含ATP的水溶液,置生物计小管内,投入荧光素及荧光素酶,将ATP转化为荧光物质,其荧光强度以数字显示,由此可得ATP值。该法测定简捷迅

速,从进样至数字显示不到10秒钟,整个测定过程不到1分钟,因此可用于活性污泥工艺全过程的代谢活性测定。该法对废水中有毒物质对活性污泥过程可能造成的危害能及时地提出警报,故也可用于活性污泥工艺过程的监控。

八、测定BOD/COD比值法

评价有机污染物和工业废水的可生化性

作者曾对国内若干工业废水和城市污

水的COD、BOD之间的相关性进行了比较系统的总结^(*)。采用回归分析法对数据整理计算并研究了其相关性(结果列于表2—4),进而求得了我国若干典型工业废水和城市污水COD与BOD之间相关关系的数学表达式。所得各回归方程比较稳定,精度高,均在 $\alpha=0.01$ 水平上显著相关。这对研究工业废水和城市污水的有机污染指数、污染水平、生化降解性、化学分解性及加速(简化)监测方面有参考价值。此外,除了以通常采用的BOD₅/COD比值来作评定工业废水和城市污水可生化性的参考指标外,作者还尝试补

表2 废水和污水的COD与BOD的相关式及有关参数汇总

废水和污水名称	BOD ₅ 与COD相关公式 COD=a+bBOD ₅	分 析 次 数	相 关 系 数 γ	相关显 著水平 α
1. 有机化工废水	COD=178.5+1.50BOD ₅	16	0.763	<0.01
2. 维尼纶厂甲醛废水	COD=74.0+1.36BOD ₅	32	0.939	
3. 合成脂肪酸有机废水	CO=167.6+1.84BOD ₅	69	0.991	
4. 有机磷农药废水(混合1)	COD=931.14+1.10BOD ₅	14	0.738	
有机磷农药废水(混合2)	COD=444.7+1.37BOD ₅	14	0.747	
5. 焦化厂含酚废水	COD=240.0+1.33BOD ₅	11	0.973	
焦化厂含酚废水生物处理后出水	COD=138.9+3.55BOD ₅	16	0.901	
6. 纤维板厂酚醛废水	COD=1351.0+1.03BOD ₅	49	0.786	
7. 碱法草浆半化学浆中段废水	COD=180.0+1.56BOD ₅	47	0.612	
碱法造纸废水(以蔗渣、木片为原料)	COD=3.82BOD ₅ -65.4	11	0.939	
8. 印染废水	COD=242.9+2.28BOD ₅	9	0.973	
9. 粘胶纤维废水	COD=1.59BOD ₅ -2.30	4	0.999	
粘胶纤维废水生物处理出水	COD=2.25BOD ₅ -0.2	4	0.999	
10. 北京市城市污水(高碑店污水场)	COD=200.4+2.34BOD ₅	17	0.766	
北京市城市污水(南区零号井)	COD=96.9+1.51BOD ₅	10	0.824	
11. 西安市城市污水	COD=101.4+1.41BOD ₅	69	0.675	
西安市城市污水一级处理出水	COD=133.0+1.00BOD ₅	68	0.479	
12. 沈阳市城市污水	COD=96.2+1.47BOD ₅	71	0.667	
沈阳市城市污水生物处理出水	COD=57.3+1.83BOD ₅	68	0.787	
13. 吉林市城市污水	COD=201.2+1.58BOD ₅	38	0.735	

表3 各类废水和污水的有关参数

废水和污水名称	BOD ₅	COD	COD _{Cr}	BOD ₅ /COD	COD _{Cr} /COD	COD _{Cr} /BOD ₅
1. 有机化工废水	260.9	569.8	178.5	0.46	0.31	0.69
2. 维尼纶厂甲醛废水	388.9	604.1	74.0	0.64	0.12	0.88
3. 脂肪酸有机废水	748.4	1544.6	167.6	0.54	0.11	0.89
4. 有机磷农药废水(混合1)	346.3	1112.7	931.1	0.26	0.71	0.29
有机磷农药废水(混合2)	512.7	1147.5	442.7	0.45	0.39	0.61
5. 焦化厂含酚废水	693.6	1160.0	240.0	0.60	0.21	0.79
焦化厂含酚废水生物处理出水	62.1	359.2	138.9	0.17	0.39	0.61
6. 纤维板厂酚醛废水	2198.2	3616.8	1351.0	0.61	0.37	0.63
7. 碱法造纸半化学浆中段废水	116.8	361.9	180.0	0.32	0.50	0.50
碱法造纸废水(蔗渣、木片原料)	1264.4	4764.6	—	0.265	—	—
8. 印染废水	216.4	736.6	242.9	0.29	0.33	0.67
9. 粘胶纤维废水	215.0	339.0	—	0.63	—	—
10. 北京市城市污水(高碑店)	119.2	479.3	200.4	0.25	0.42	0.58
北京市城市污水(南区零号井)	60.7	188.4	96.7	0.32	0.51	0.49
11. 西安市城市污水	123.9	276.1	101.4	0.45	0.37	0.63
西安市城市污水一级处理出水	110.7	243.7	133.0	0.45	0.55	0.45
12. 沈阳市城市污水	82.7	217.7	96.2	0.38	0.44	0.56
沈阳市城市污水二级生物处理出水	12.9	80.9	57.3	0.16	0.71	0.20
13. 吉林市城市污水	123.5	396.0	201.2	0.31	0.51	0.49

注 表内数据均为平均值,单位为毫克/升。

表4 废水与污水的可生化性的评价

可生化性的 评价	评价指标		废水与污水名称
	BOD ₅ /COD	COD _{Cr} /COD	
第一类 可生化性良好 或较好	>45%为较好 >60%为良好	>20%	维尼纶甲醛废水, 脂肪酸有机废水, 粘胶纤维废水, 焦化废水, 纤维板酚醛废水
第二类 可生化性尚好	30—45%	>50%	有机化工废水, 印染废水, 有机磷农药废水(混合2), 碱法造纸半化学浆中段废水, 北京(零号井)、西安、沈阳、 吉林等城市污水
第三类 可生化性差 (应控制污染源)	<25%	>50%	有机磷农药废水(混合1), 北京市高碑店污水场污水, 碱法造纸废水, 城市污水生物处理出水

充 $\text{COD}_{\text{B}}/\text{COD}$ 比值(COD_{B} 为 COD 中非生物降解部份)作为另一评定指标,即采用上述两种综合指标来分析与评定污水的可生化性。

九、影响有机污染物

生物降解性的因素

影响有机污染物生物降解的因素有三,一是与化学物质的种类、性质有关的因素;二是与微生物的种类、性质有关的因素;三是与化学物质、微生物所属的环境有关的因素,诸如 pH 、温度、溶解氧、营养物等。其中,有机污染物的结构与生物降解性无疑有重要关系。

1. 有机污染物的结构与其生物降解性

异养性微生物能同化学物质作用,并产生许多能合成其细胞质的分子。生化代谢反应的关键在于化学物质的结构应是可以代谢的,而这种代谢常与酶有关系。因此,化学物质的结构与其生物降解性之间存在着重要的内在联系。

化学物质的结构决定其溶解性、分子的排列、分子的空间结构、化学官能团、分子间的吸引、排斥等。不同的化学质的基团在微生物细胞表面的不同点发生代谢反应。

化学物质的代谢通常从分子的端部,而不是从中部开始。羧基对水具有很大的亲和性。微生物表面的水解酶能降解亲水性化合物,使之成为小分子的化合物,而后进入细胞。化学基团按生物降解性反应的强弱依次排列,如羧基,醛基,酮基,羟基,胺基,巯基,甲基;又如:酰胺基,酯基,磺酸基,磺基,氯基,醚基,氰基等。

化学物分子的生物降解性与化学基团

在分子中的位置有关。每一化学基团都影响到其他基团,使生物代谢显得异常复杂。

生化反应首先发生在细胞壁表面,通过胞外酶反应,产生初级反应物,进入细胞壁内部,藉胞内酶加速生化反应。酶由体酶和辅酶组成,二者结合才有活性,即活性酶。

化学基团按其与水的关系可分为亲水性基团与憎水性基团两种。属亲水性基团的有羧基、醛基、氨基、巯基、磺酸基、氰基等;属憎水性基团的有甲基、亚甲基。具亲水性基团的有机物比憎水性化合物容易生物降解。

有机化合物的分子大小、空间结构、分子排列等对生物降解均有重要影响。分子小的比分子大的要容易代谢降解。复杂的有机化合物的结构具有螺旋形空间结构特性,使相邻碳分子间发生代谢反应。

烃类及其衍生物主要由三个基本代谢反应(脱氢、水解、碳链断裂)组成。脱氢酶、水解酶和辅酶等都参加了反应,引起反应物的分解并进行细胞合成。

链烃通常比环烃容易分解;直链烃比支链烃容易分解;直链饱和烃中 C_2-C_3 比 C_4-C_8 容易分解; C_9-C_{20} 比 C_2-C_3 容易分解; C_1 的饱和烃虽最简单但最难生物降解。饱和碳氢化合物经脱氢后转化为非饱和碳氢化合物,通过加水反应生成醇类,醇类氧化至醛类,再氧化为有机酸类。若起始饱和碳氢化合物仅含 C_2 ,则其生成物为醋酸,而醋酸是所有生物代谢的关键中间产物。若起始反应物含 C_3 或更多的碳,则形成的有机酸必须进一步代谢。有机化合物的生化代谢反应通过生成醇、醛、脂肪酸的规律进行。而后脂肪酸经过碳键断裂及三羧酸循环系统把反应进行到底,最后以形成 CO_2 而告终。

各类有机化合物的化学结构与生物降解性⁽⁷⁾的关系如下:

(1) 烃类化合物

烃类化合物对生物氧化有阻抗作用,其中短侧链烷基苯化合物具有抑制作用。环烃比脂烃的抑制性强。烃类化合物随抑制作用增强而显示出良好的同化作用。

(2) 醇类化合物

大多数醇类化合物能生物降解,其降解性主要取决于微生物的驯化程度。同分异构物中“异”化合物与“正”化合物相比较,差别极小。但叔丁醇、戊醇、季醇、季戊四醇等对生物降解呈强抑制性。二基团化合物如乙二醇、1,5戊二醇对生物降解具有强抑制性。

(3) 酚类化合物

一元酚、二元酚较易生物降解,三元酚较难生物降解。硝基酚类化合物,除邻位硝基酚、间位硝基酚和2,4二硝基酚外,当苯酚引入硝基时,就变得难于生物降解。二氯酚比一氯酚难于生物降解。向苯酚引入甲基,生物降解性变易。对位甲基酚比邻位、间位甲基酚降解迅速。2,4,5三氯苯酚、六氯苯酚等对生物降解性表现出强抑制性。

(4) 醛类化合物

醛类化合物能被微生物所降解。但苯醛与3,3-二羟基丁醛在高浓度时对生物降解具有相当强的抑制作用。

(5) 有机酸盐和酯类

有机酸盐和酯类比醇类和醛类容易被微生物所降解,具有硫碳链的化合物在未驯化情况下,对生物降解性的抑制十分显著。

(6) 醚类化合物

除甲醚、二甲醚外,醚类化合物对生物降解均有相当程度的抑制作用,因此对微生物需要进行长期的驯化。二噁烷能用特

种驯化的微生物进行生物降解。二苯醚可以从流水中去除,但历时甚长。

(7) 酮类化合物

酮类化合物比醛、醇、酸、酚类化合物的生物降解抑制性强,但比醚类的抑制性小。

(8) 氨基酸类化合物

氨基酸类化合物能很好地被微生物降解并同化。但胱氨酸和酪氨酸仅能被经较长时间驯化后的微生物降解。

(9) 杂氮化合物

杂氮化合物能生物降解。但当作用于氮上的氢数目减少时,抑制作用增加。三乙醇胺、乙酰替苯胺等在低浓度时可被同化。含氮与氧原子杂环的吗啉对生物降解性呈强抑制作用,但吡啶则无抑制性,也无生物毒性。

(10) 氰和腈类化合物

微生物经驯化后能将氰和腈类化合物生物降解。氨为其主要中间产物,最终产物为氮气。

(11) 表面活性剂和类似化合物

低分子的苯磺酸盐对生物降解不呈抑制作用。丁基硫化苯容易生物降解。烷基芳基硫酸盐(从C₁₂至C₁₈烷基)直链化合物容易生物降解。硫酸盐和酯及低分子聚乙氧酰胺和酯容易生物降解。丁基苯对生物降解有抑制作用。特丁苯的磺化衍生物对生物降解有强抑制作用。“特”型化合物不易生物降解。高分子量的聚乙氧酯及酰胺类化合物对生物降解更为稳定。

(12) 乙烯类化合物

除少数化合物外,乙烯类化合物对生物降解有良好的适应性。支链化合物无明显的生物抑制作用,而在高浓度时却可被生物降解。甲基乙烯酮对生物降解有强抑制作用。烯丙醇形成的高分子聚合物对生物降解有抑制作用,分子量250—600是抑

制生物降解的界限。

(13) 含氧化合物

氧乙基类(醚链)化合物对生物降解有明显的抑制作用。附加的醚基和高分子化合物会增强其抑制作用。

(14) 杂氮化合物

淀粉或葡萄糖的官能团经氧乙基作用后会对生物降解产生强抑制作用。木质素的生物降解性很差。酯类和丙烯类在其化合物中均能增加对生物降解的抑制作用。其氯代化合物可能被生物降解。

(15) 有机磷化合物

杀螟松、甲基1605和乐果均能被微生物所降解。对于未经驯化的微生物有一定抑制作用。经驯化后,对微生物的生长、代谢有促进作用。pH9.0时,其生物降解性更高些^[8]。

2. 抑制微生物生物降解的主要原因剖析

关于此问题可从微生物的生化反应、营养、环境等方面来分析:

①由于酶系统的变性、失活与切断,从而使生化反应受到抑制。有些含氮、硫的有机化合物能与酶争夺组成辅酶所必需的微量金属元素;汞、铜和某些金属能与酶及其代谢产物形成络合物,从而使酶失活;基质与酶的活性基团相结合,能阻碍中间产物的生成,或者阻碍中间产物的进一步分解。当基质中存在两种或两种以上化学结构类似的有机化合物时,两者皆能与酶的活性中心结合,从而抑制中间产物的形成,使酶失活,即“竞争性”抑制。对酶的“竞争性”抑制与“非竞争性”抑制都能使酶的催化反应速率降低。若抑制剂与基质和酶同时结合在同一部位上,或抑制剂与酶的某部分相结合,结果使酶的构

型改变,从而失去催化能力。此外,pH、温度等也能抑制酶的活性。

②由于能量代谢系统的抑制、失灵,使生化反应终止。有机污染物或其它抑制剂阻碍了微生物的三磷酸腺苷的合成,就会使其能量代谢系统失灵,从而终止微生物的代谢反应。

③由于电子传递链(即呼吸链)断裂而引起抑制作用,磷酸化作用因得不到电子所放出的能量而不能进行,使微生物的生命活动终止。若细胞色素酶受到抑制,也能使该系统(细胞色素 a_1 、 a_2 、 a_3 、 a 、 b 、 c 、 c_1)呼吸切断而受抑制。

④由于破坏或损伤细胞构造(如细胞壁、渗透膜)或使蛋白质变性、抑制合成等也可抑制微生物生物降解。

参 考 文 献

- (1) Nielson R.H., Water Research, 9(12), (1977).
- (2) Eckenfelder W.W. Jr., Proc. of the 21st Indust. Wastewater Conf. Purdue Univ, 1966.
- (3) Гюнтер Л.И. и др., Водоснабжение и сан. техн., (9), 9(1976).
- (4) 张忠祥、吕明、齐雯钰,有机化工废水的生物毒性和可生化性测定与生物处理的探索试验研究(内部资料),北京市环保所,1979年。
- (5) Kao I.C. et al., JWPCF, (5), 926—931(1973).
- (6) 张忠祥,建筑技术通讯-给水排水, (2), 2—9(1982).
- (7) Ludzack F.J. et al., JWPCF, (11), 1173(1960).
- (8) 孙安强、张忠祥,环境科学学报, 3(1), 62—72(1983).