

氧化塘法净化有机农药废水机理研究

张甬元 谭渝云 孙美娟 张进军

(中国科学院水生生物研究所)

在水体污染治理中,我们采用氧化塘方法作为有机磷农药废水的三级处理,取得了明显的净化效果。氧化塘法作为生活污水的处理,是一个成熟和有效的处理方法。但作为有机磷农药生产废水的处理则未见报导。因此,进一步探讨有机磷农药在氧化塘这样一种特殊的水生态系统中的净化原理,是有其理论和实践意义的。农药包括除草剂、杀菌剂在水环境中的降解研究,早期大都是关于农药在水环境中残留时间和净化现象的观察,以后进一步研究理化、生物等因素在农药降解中的作用。在生物降解中关于微生物的作用进行过不少研究。近年来又进一步开展农药酶解的研究。农药的生物净化方面的研究可以说从生物个体水平向分子水平迈进了一步,逐步开始接触到农药生物净化的本质。其中 Engelherdt (1973)^[1-2] 和 Munnecke (1976)^[3-5] 分别对除草剂和有机磷农药的酶学降解做了不少工作。Heritage 和 MacRae (1977)^[6] 报导了六六六的酶解。此外,2,4-D 和其它农药的酶解也有报导^[7-10]。

我们首先从氧化塘系统中富集分离出有机磷农药分解菌,并对其降解性质进行了观察,确定了起净化作用的生物。同时,通过模拟藻菌系统中代表性毒物的降解试验,证明不同种群的生物在净化过程中各自的功能。此外,还研究了对硫磷在氧化塘系统中代谢途径,最后,又从对硫磷分解菌制备了无细胞酶制剂。酶制剂具有很高的对硫磷水解活性,在理论上解释净化过程中对硫磷降解的

本质。本文将讨论关于有机农药的酶解研究在环境科学中的理论和实践意义。

一、对硫磷和对硝基酚分解菌的富集、分离及降解特性

进入氧化塘的废水,主要是对硫磷、马拉硫磷、乐果及对硝基酚的生产废水。其中对硫磷对水生生物毒性和在水中的化学稳定性都比其它两种高。因此,选择对硫磷作为研究净化过程的代表性农药。从氧化塘系统中采来的水样分别连续加对硫磷和对硝基酚富集,最终分离出 CTP-01、CTP-02 两种好气性细菌-极毛杆菌 (*Pseudomonas* sp.), 具有很高的对硫磷和对硝基酚的分解活力,其分解速率分别达到 11.5 克/升/天和 6 克/升/天。

对 CTP-02 菌的对硝基酚降解动力学研究表明,此菌降解对硝基酚的速度与时间的动力学方程为:

$$\frac{dC}{dt} = -K_1t - K_2$$

式中,

$\frac{dC}{dt}$ ——对硝基酚的浓度对时间的微分;

K_1, K_2 ——分解常数;

t ——瞬时间。

这一方程通解为:

$$C = C_0 - 2K_1t^2 - K_2t$$

当对硝基酚起始浓度为 60 毫克/升,温度为 25℃ 菌液浓度在波长 500 毫微米处的

光密度值为0.185时,按方程式计算的理论值与实际值见图1。实验开始时,对硝基酚的浓

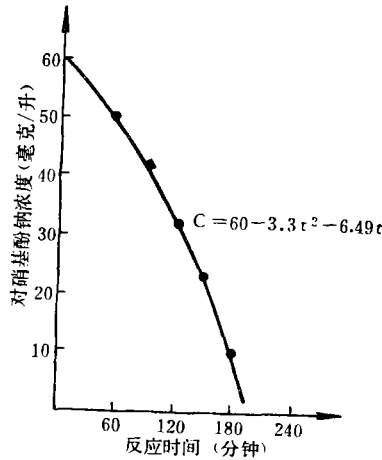


图1 CTP-02 菌降解对硝基酚钠的动力学模式
 $C = 60 - 3.3t^2 - 6.49t$

度高显示出对细菌代谢能力有一定的抑制作用,分解速率比较慢。随着对硝基酚被细菌利用,含量逐渐降低,同时由于细菌增殖,分解对硝基酚的能力也相应加强。这就形成了对硝基酚的降解与反应时间的关系成为负二次方程的抛物线性质。细菌的浓度与对硝基酚的分解速度成正比(图2)。同时我们用各

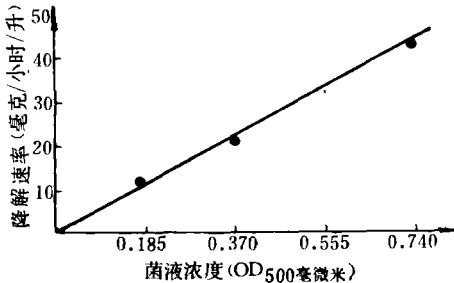


图2 CTP-02 菌数量与对硝基酚钠降解速率的关系

级氧化塘出水加入低浓度的对硝基酚作模拟降解试验,并与CTP-02菌浓度较低的情况进行了比较,见表1。由表1可见,在氧化塘系统中接近进水部分分解速率高,而随后分解能力逐渐降低。同时,在鸭儿湖治理前的自净调查中也观察到对硫磷的含量以负指数函数($C = C_0 e^{-kt}$)递减。可见这些现象的生物学基础就在于接近废水源毒物含量相对

表1 各级氧化塘出水口水样
对硝基酚降解速率比较

	CTP-02菌*	一级氧化塘出水	二级氧化塘出水	鱼种湖出水
半分解期(小时)	3	9	50	3天未有明显分解
与一级塘分解速率比较(%)	600	100	18	

* 分光光度计波长500毫微米处菌液光密度为0.045

地比较高,以致适应这类毒物作为基质的微生物种群数量比较多,显示出较强的净化能力。而在下游的水体中,毒物含量减少,相应的微生物种群数量也减少,净化能力随之降低。

二、对硫磷及其中间产物对藻类光合作用影响及藻菌模拟系统中对硝基酚的降解

为了解水生态系中主要成分藻类对农药忍受能力,为藻菌模拟试验以及氧化塘运转提供依据,我们观察了对硫磷及其中间产品二乙基硫代磷酸酯和对硝基酚对常见藻类栅藻光合作用的影响。上述各种物质对栅藻光合放氧半抑制浓度如表2。由表2可见对硫

表2 对硫磷及其中间产物对栅藻光合放氧的半抑制浓度

	对硫磷	二乙基硫代磷酸酯*	对硝基酚(pH6)	对硝基酚钠(pH7.5)
半抑制浓度(毫克/升)	>100	>150	20	35

* 工业品氯化物经纯化,制备成二乙基硫代磷酸酯的钾盐

磷及其中间产物对藻类的毒性顺序为:对硝基酚 > 对硝基酚钠 > 对硫磷和二乙基硫代磷酸酯。对硝基酚对光合作用放氧半抑制浓度为20毫克/升,对硫磷和二乙基硫代磷酸酯浓度超过100毫克/升未见明显抑制。图3是不同浓度的对硝基酚对光合作用放氧的抑制曲线。实验证明,藻类对这类物质有比较高的耐受能力。

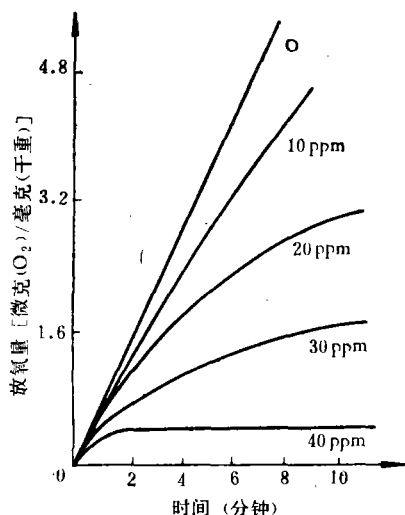


图3 对硝基酚浓度对栅藻光合作用的影响

为确保藻类在农药净化中的作用,以对硝基酚钠为基质,分别观察了单一栅藻,单一的CTP-02菌和“栅藻加CTP-02菌”共生系统中降解规律,结果如图4。由图4可见在光照条件下,在单一的藻类系统中没有对硝基酚钠的消耗,说明了没有可测出的对硝基酚钠降解能力。在“栅藻加CTP-02菌”的共

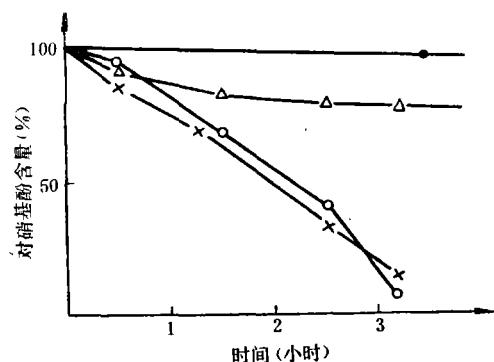
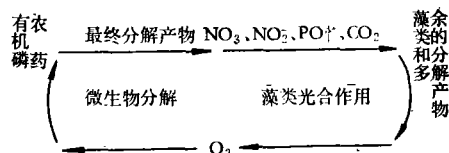


图4 “藻”“菌”和“藻加菌”系统对对硝基酚钠降解比较

- “藻”,对硝基酚钠 40 毫克/升
- △——“藻加菌”,对硝基酚钠 60 毫克/升
- “藻加菌”,对硝基酚钠 40 毫克/升
- ×——CTP-02 “菌”,对硝基酚钠 40 毫克/升

生系统中,对硝基酚钠加入的浓度超过栅藻的忍受限使光合放氧受到抑制,只是在试验初期对硝基酚钠稍有下降。然而,在“栅藻加CTP-02菌”共生系统中,对硝基酚钠浓度低

于栅藻光合抑制浓度,则对硝基酚钠降解很快,其速度与单独的CTP-02菌并加曝气的系统中降解速度很相近。由此可见,有机磷农药在氧化塘系统中的净化过程,同一般有机物在氧化塘藻菌共生系统中的净化过程一样,即毒物分解主要是依靠细菌,细菌最终的分解产物磷、氮作为藻类的营养元素,而藻类通过光合作用放出的氧供应细菌生长,示意如下。



从实验结果可以看出,现在进入氧化塘系统的有机磷农药的浓度尚不是净化能力的限制因子。藻菌共生系统对农药净化的潜力比目前实际效力还可以更大些,但需要有效措施,进一步提高藻类密度。

三、对硫磷的代谢途径

对硫磷进入氧化塘后的代谢途径,通过实际运转系统的监测和实验室验证,我们已经证明:

(一) 通过好气性微生物的对硫磷水解酶作用,在P—O键上裂解,形成二乙基硫代磷酸酯和对硝基酚。

(二) 对硝基酚在好气性微生物(CTP-02菌)作用下降解,并化学计量地形成 NO_2^- (表3),表明在对硝基酚降解中发生脱硝基作用。在缺 NH_4^+ 条件下,恒化器中连续培养试验证明:CTP-02菌的生长速度尽管比有 NH_4^+ 的条件慢,但能持续生长,表明细菌有利用 NO_2^- 作氮源的可能性。

(三) 微生物厌气降解试验和氧化塘系统中处于厌气条件下,有明显的对氨基酚检出,但在CTP-02菌好气性降解试验和氧化塘好气区域没有发现对氨基酚,可见在厌气条件下首先发生硝基还原,而不是硝基脱落。

表 3 对硝基酚的降解与 NO_2^- 的形成

单位: 毫克/升

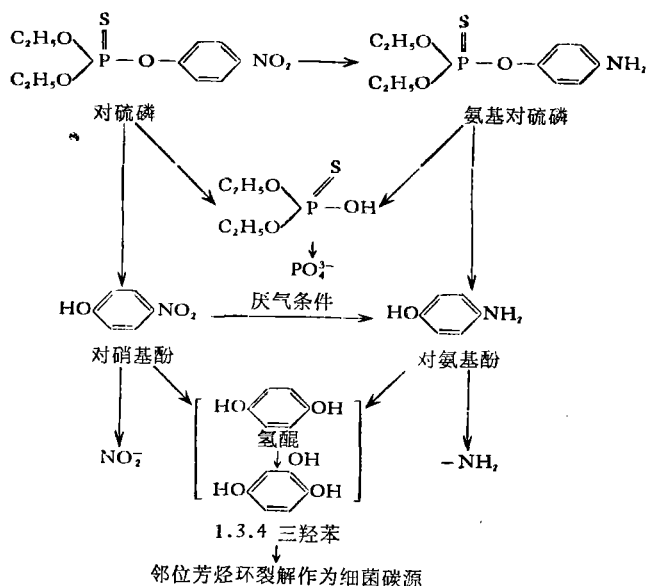
时间(分钟)	0	15	30	45	60
对硝基酚含量实测	60	44.54	29.00	17.95	4.94
对硝基酚分解量		15.46	31.00	42.05	55.06
NO ₂ ⁻ 形成的理论值		5.12	10.26	13.92	18.22
NO ₂ ⁻ 实测量		5.76	11.10	15.00	19.50

(四) 在氧化塘系统的各检测点, 检出结果表明, 在气温合适的情况下, 有机磷的去除率可达 60—70%。1977 年 3 月至 10 月份进水中无机磷占总磷平均为 9%, 而氧化塘出水中无机磷占总磷的 50%, 8 月份最高比率达到 85%, 可见有机磷农药含磷中间体的最终产物是 PO_4^{3-} , 用火焰光度—气相色谱进行指纹比较研究也证明这一结论。尽管 CTP-01 和 CTP-02 菌目前尚未发现有可检出的降解二乙基硫代磷酸酯的能力, 但可以认为在氧

化塘系统中有另一种能降解二乙基硫代磷酸酯的微生物存在。

此外,文献报导^[13-14]也可以从对硫磷形成氨基对硫磷并进一步分解成相应的对氨基酚。还报导^[15-16],对硝基酚的芳烃环经氢醌和1,3,4-三羟基苯代谢中间产物,然后发生邻位芳烃环裂解,最后作为碳源参与微生物碳的代谢。

综合上述,可以把对硫磷在氧化塘系统中的代谢途径归纳如下:



四、对硫磷水解酶的 的制备及其性质

生命细胞的复杂代谢都由成千上万个不同的酶控制着，各种复杂的物质代谢过程都可以剖析成一系列的酶促反应。因此，在现代生物学研究中，酶的研究是一个很重要和

很活跃的领域，同时酶作为生物催化剂催化各种化学反应，有着高度的专一性和高效性。外源有机物进入生物体并发生降解，同样必将同各种酶促反应有关。因此，在环境科学中，酶学研究同污染物的代谢途径的研究结合起来，将在微观方面阐明生态系中有机毒物代谢规律，并且在环境控制研究及应用中

将有着广阔的前景。

在研究藻菌共生系统在有机磷农药净化功能的基础上,为深入弄清生物净化机理,我们又进一步探讨了对硫磷的酶解.将CTP-01菌超声破碎以后,高速离心并去掉细胞残渣,制备无细胞酶制剂.这种酶制剂的对硫磷水解活性达到 933 毫微克分子/毫克蛋白/分钟.按文献资料折算比在 0.1N 氢氧化钠中化学水解速度快 5494 倍^[4],对硫磷水解酶水解速率与底物浓度的动力学如图 5.

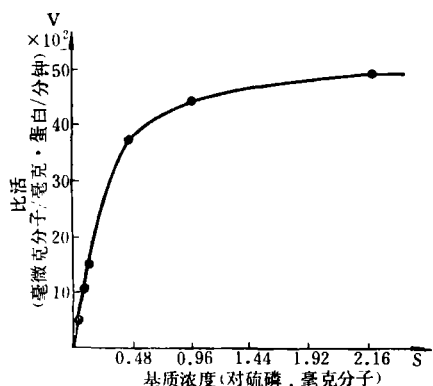
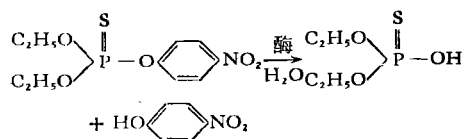


图 5 对硫磷水解酶水解速度与底物浓度的动力学

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

$$K_m = 2.3 \times 10^{-5} M$$

Michaelis 常数为 $2.3 \times 10^{-5} M$, 酶的最适 pH 为 7.5, 酶的热稳定性较高, 最适温度范围为 40—50°C. 在这种酶催化对硫磷的降解过程中, 化学计量地生成对硝基酚, 并伴随着反应系统中 pH 下降. 可见酶的作用部位是对硫磷分子上二乙基硫代磷酸酯与对硝基酚之间的 P—O 键, 属于一种水解酶, 反应如下:



根据 Munnecke (1976)^[4] 报导从六种混合菌种培养制备的酶制剂除对硫磷外, 尚对其他七种有机磷农药有明显的水解能力. 由

水解酶催化的 P—O 键裂解是有机磷农药生物净化中一个最基本的化学反应. 对硫磷水解酶的基质诱导的响应时间很短. 这些结果表明, 当农药进入环境(包括氧化塘和生化处理池这样特殊的水生生态系统), 微生物通过代谢调节产生相应的诱导酶, 使之适应改变了的环境, 并利用其降解产物作为维持生长的营养物质. 生物的这种反作用于环境的效应, 就是有机毒物生物净化(自净)的本质, 而酶促分解就是构成净化过程的基本反应.

有机磷农药将是今后发展的杀虫剂的主要品种之一. 在生产过程中, 大量废水要处理. 虽然提出了一些生物处理方法^[11-12], 但这些方法毕竟都是利用多种生物协同作用, 并以生物个体或整细胞为单位进行反应, 易受毒物超荷的冲击和其他代谢抑制因子的影响, 难于大幅度提高处理能力. 通过生物净化机理的研究, 有可能使农药废水的生物处理手段有新的突破. 从对硫磷水解酶的基质响应时间、特异性、耐热性等性质来看, 酶在有机磷农药废水处理中具有很大的应用前景. 如果说在生化工业中酶学工艺是为了获得酶作用后形成的有用产物, 那么在环境控制中则是利用酶解达到无害化和净化的目的, 很有可能发展成为一种完全新型的高效处理方法——酶学法(或固定化酶法). 这种方法有可能使处理小型化, 甚至管道化. 还可设想, 把固定化酶系统与固定化的高效菌系统偶联起来, 形成一种能水解有机磷农药又能分解其中间产物的完整的系统. Munnecke (1977)^[5] 将从六种混合细菌培养物制备的对硫磷水解酶固定于烷基化的玻璃砂上, 并获得活性. 虽然活性还不高, 但已从理论上证明有其应用的可能性. 要达到实际应用, 还要做许多相应的基础研究.

五、氧化塘中六六六的归趋

氧化塘系统主要是作有机磷废水的三级处理之用, 但也观察到有明显的六六

六去除效率,在气温比较高的时候,去除率甚至可达 60% 以上。根据文献报导,在好气条件下,六六六不易被微生物分解,残留时间可长达 7—10 年。但在厌气条件下,则很容易被分解^[17-20]。我们也观察到在湖泥沉积物中,在厌气条件下有很强的分解六六六的能力。最近 Heritage (1977)^[6]从厌气菌 (*Clostridium Sphenoides*) 制备的酶制剂在亚细胞膜片存在时,厌气条件下有明显的丙体六六六的降解。因此,在水生态系中,特别是湖底沉积的厌气部分,为六六六的降解提供了有利条件。我们曾研究过底泥对六六六吸附的能力,但只能在强力的物理因素下,如大风搅动,才有可能使湖泥颗粒大量与水混合,提供较好的吸附条件。在一般情况下,吸附只发生在水与沉积物之间的界面。考虑到六六六的亲脂性质,我们又进一步用藻类和浮游动物的活体和死体对六六六的吸附作了观察。实验证明,藻类和浮游动物都具有很大浓集系数,而死体和活体也几乎有相同的浓集能力(见表 4),显然这种浓集能力是由于这些生物体

表 4 裸腹蚤和栅列藻的浓集系数

	裸腹蚤		栅列藻	
	死	活	死	活
f	147	155	446	234

f 浓集系数以干重计

的类脂质的缘故。Canton 等 (1977)^[21-22] 也观察到藻类的活体和死体对六六六具有同样浓集能力。由于藻类作为水生态系中的原初生产者,在富营养程度较高的氧化塘中产量是很大的。因净化作用的进行,水的毒性降低,浮游动物包括原生动物,枝角类、挠足类等,生物数量也随之增加。最后因浮游生物尸体沉入底泥,六六六也随之进入底部,使

厌气分解有了可能。在氧化塘中表现出的六六六净化效果,通过生物迁移因子进入湖底沉积是一个重要因素。

参 考 文 献

- [1] Engelhardt, G. et al., *Appl. Microbiol.*, **22** (3), 284 (1971).
- [2] Engelhardt, G. et al., *Appl. Microbiol.*, **26** (5), 709 (1973).
- [3] Munneke, D. M. & D. P. H. Hsieh, *Appl. & Environ. Microbiol.*, **31**(1), 63 (1976).
- [4] Munneke, D. M. & D. P. H. Hsieh, *Appl. & Environ. Microbiol.*, **32**(1), 7 (1976).
- [5] Munneke, D. M., *Appl. & Environ. Microbiol.*, **33**(3), 503 (1977).
- [6] Heritage, A. D. & J. C. MacRae, *Appl. & Environ. Microbiol.*, **34**(2), 222 (1977).
- [7] Tiedje, J. M. & M. Alexander, *J. Agric. Food Chem.*, **17**, 1080 (1969).
- [8] Lanzilotti, & Pramer, *Appl. Microbiol.*, **19**(2), 307 (1970).
- [9] Blake, J. & D. D. Kaufman, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **5**, 305 (1975).
- [10] Walln fer, P. R. & J. Bader, *Appl. Microbiol.*, **19**(5), 714 (1970).
- [11] Coley, G. & C. N. Stutz, *J. Water Pollut. Control Fed.*, **38**, 1345 (1966).
- [12] Iue-Hing, C. & S. D. Brady, *Proc. 23rd Ind. Waste Conf.*, Purdue Univ. Ext. Ser. 132, 1166 (1966).
- [13] Sethunathan, N. *Residue Review*, **47**, 143 (1973).
- [14] Graetz, D. A. et al., *J. Water Pollut. Control Fed.*, **42**(1), 76 (1970).
- [15] Munneke, D. M. & D. P. H. Hsieh, *Appl. Microbiol.*, **28**(2), 212 (1974).
- [16] Dark, R. K. & R. J. Stretton, *Microbiological Aspects of Pollution Control*, p. 197 (1977).
- [17] Raghu, K., *Science*, **154**, 263 (1967).
- [18] Yule, W. N. et al., *J. Agr. Food Chem.*, **15**, 1000 (1967).
- [19] Macrae, I. C. et al., *J. Agr. Food Chem.*, **15**, 911 (1967).
- [20] Castro, C. I. et al., *J. Agr. Food Chem.*, **19**, 1168 (1971).
- [21] Canton, J. H. et al., *Water Research*, **11**(1), 111 (1977).
- [22] Canton, J. H. et al., *Water Research*, **9**(12), 1163 (1975).