

苯及其一取代化合物对底泥氨氧化活性联合抑制作用

董春宏, 胡洪营*, 魏东斌, 黄霞, 钱易

(清华大学环境科学与工程系 环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 北京 100084)

摘要: 为研究复合苯系污染物对氮循环中硝化过程的影响, 采用摇瓶实验研究了苯及其 3 种一取代化合物(苯酚、苯胺和硝基苯)对底泥氨氧化活性的联合抑制作用。结果表明, 苯、苯胺、苯酚以及硝基苯进行两者及多者之间等毒性混合的 11 组混合物, 对底泥氨氧化活性的联合抑制作用中, 有 7 组表现为加和作用, 3 组表现为协同作用, 只有苯和苯酚的混合物表现为拮抗作用。含有硝基苯的混合物对底泥氨氧化活性的抑制作用一般表现为加和作用。苯及其一取代化合物的混合物对底泥氨氧化活性半数抑制浓度(IC_{50} , $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)与这种混合物中取代基的电负性 ME 有相关关系: $\lg IC_{50} = 2.197 - 0.236 ME$, 随取代基电负性的增加, 混合物对底泥氨氧化活性的联合抑制作用逐渐增强。

关键词: 苯一取代化合物; 底泥; 氨氧化活性; 联合抑制作用; 硝化活性

中图分类号: X131 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2004)03-0106-04

Joint Inhibition of Benzene and Monosubstituted Benzenes on Ammonia oxidizing Activity of Sediment

DONG Chun-hong, HU Hong-ying*, WEI Dong-bin, HUANG Xia, QIAN Yi

(Environment Simulation and Pollution Control State Key Joint Laboratory, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: The joint inhibitions of benzene and three kinds of monosubstituted benzenes (aniline, phenol and nitrobenzene) on ammonia oxidizing activity of sediment was investigated in order to study the effects of combined pollutants on nitrification process in the nitrogen cycle. The results showed that the joint inhibition of 11 different kinds of mixtures, including binary or multi-equitoxic mixtures among benzene, aniline, phenol and nitrobenzene, exhibited different effects on ammonia oxidizing activity of sediment, among which seven were additive effect, three were synergistic, and only the mixture of benzene and phenol was antagonism. A conclusion could be made that the addition of nitrobenzene to a mixture usually exhibited additive effect. There was a relationship between the half joint inhibition concentrations (IC_{50} , $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) of benzene and monosubstituted benzenes on ammonia oxidizing activity of sediment and the mixed electronegativities (MEs): $\lg IC_{50} = 2.197 - 0.236 ME$. With the increase of mixed electronegativities (MEs), the joint inhibitions of mixtures increased.

Key words: monosubstituted benzenes; sediment; joint inhibition; ammonia oxidizing activity; nitrifying activity

氮循环是水生生态系统中物质循环的重要组成部分, 同时也是水体自净、降低富营养化程度的重要途径。硝化过程是氮循环的关键环节和控制步骤。实现硝化过程的硝化菌群对多数化学物质都非常敏感^[1], 选用底泥中的硝化菌群作测试生物来评价有毒有害化学物质对硝化菌硝化能力的联合抑制作用, 对研究有毒有害化学物质的联合生态效应具有重要的意义。目前, 有机污染物对水生生态系统影响的研究集中在单一有机物对单一生物急性毒性方面^[2~4], 而多种污染物共存引起的联合效应虽有研究^[5~7], 仍主要集中在对单一生物上, 针对复合污染物对水生生态系统功能影响的研究比较少。本研究的目的是研究苯及其一取代化合物的混合物对底泥硝化活性的影响, 为评价污染物对水生生态系统氮循环功能的影响提供支持。本文以实验室培养系统中的底泥为试验对象, 采用摇瓶实验测定了苯及

其 3 种一取代化合物对底泥氨氧化活性的联合抑制作用, 分析了取代基类型对底泥氨氧化活性的联合影响, 初步探讨了苯取代化合物对底泥氨氧化联合抑制作用与其性质、结构之间的关系。

1 实验材料与研究方法

1.1 测试化合物

选取苯以及苯的一取代化合物苯酚、苯胺和硝基苯共 4 种化合物为测试对象, 这 4 种化合物性质各异, 代表了典型的环境污染物, 都属于环境优先控制的污染物^[8]。这 4 种化合物对底泥氨氧化活性的

收稿日期: 2003-06-01; 修订日期: 2003-10-17

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(G1999045711); 国家自然科学基金资助项目(20277025); 教育部留学回国人员启动基金项目。

作者简介: 董春宏(1970~), 男, 清华大学博士生, 主要从事废水生态效应的研究。

* 联系人

抑制作用(IC_{50} , $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)及取代基的电负性列于表 1.

表 1 受试化合物的相关性质
Table 1 Properties of tested chemicals

受试化合物	$E^{[9]}$	IC_{50}	混合储备液中各组
		$/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	分浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
苯	2.30(—H)	22.40	67.20
苯酚	3.48(—OH)	13.60	40.80
苯胺	3.05(—NH ₂)	48.53	145.59
硝基苯	3.63(—NO ₂)	32.01	96.03

1) 化合物中取代基电负性

1.2 联合抑制作用试验

实验参照测定化合物对活性污泥硝化活性抑制作用的标准方法^[10]进行,实验所用底泥取自实验室的底泥培养系统^[10].试验时,从系统中取出适量表面底泥,放于 2000 mL 烧杯中,用去离子水稀释至 1500 mL,电磁搅拌使整个体系均匀,并恒温至 35℃ 备用.4 种化合物以等毒性(不同化合物对同一生物产生相同抑制作用时的浓度值)方式混合,混合储备液的浓度按各组分的 IC_{50} 的 3 倍进行配制(表 1),混合液总浓度为各组分浓度之和.

在一系列 500 mL 的锥形瓶中,按对数等差方式加入不同体积的受试混合物溶液,以不加受试混合物作为空白对照,以烯丙基硫脲(ATU)作为参照毒物,并加入以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为主要成分的培养液^[11],初始氨氮浓度控制在 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.用去离子水控制混合液体积为 300 mL,置于 $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床内,以 $150\sim160\text{ r/min}$ 振荡.待反应液温度稳定后,分别加入 100 mL 混合均匀的底泥,并调整混合液 pH 值在 8.0,开始振荡计时,测定不同抑制剂浓度下的氨氧化速率.同时进行平行实验一次.当参照毒物 ATU 浓度为 $0.238\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的相对抑制率为 50% 时,认为本次实验有效,否则重新进行实验.

1.3 分析方法

氨氮测定:从反应体系中取混合液 5~7 mL,经 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤后,用纳氏试剂比色法测定滤液氨氮浓度,分析仪器为 SHIMADZU 公司生产的 UV-1200 V 型分光光度计.

1.4 生物毒性表示方法

受试混合物对底泥氨氧化菌群的 24h 抑制作用用半数抑制浓度($IC_{50,M}$)表示,通过底物氨氮消耗速率的相对变化率经直线内插法求得^[11]. $IC_{50,M}$ 越大,促使底泥氨氧化活性降到 50% 时所需的抑制剂浓度越大,表明抑制作用越弱.

1.5 联合抑制作用类型判定

自 1939 年 Bliss 研究了 2 种毒物的联合作用,并由此提出了拮抗作用、加和作用、协同作用等概念以后,有关毒物联合作用的研究才逐渐为人们所认识^[11].关于联合作用的机理、联合作用类型范围的限定,一直受到研究人员的重视^[13].本文按 Keplinger^[13]比值法评价受试化合物质的联合抑制作用.根据各单一化学物质测出的 $IC_{50,M}$ 再按下式计算混合抑制作用预期 $IC_{50,P}$ 值.

$$\frac{1}{IC_{50,P}} = \frac{a}{IC_{50,A}} + \frac{b}{IC_{50,B}} + \dots + \frac{n}{IC_{50,N}}$$
$$Q = \frac{IC_{50,P}}{IC_{50,M}}$$

式中, $IC_{50,M}$ 和 $IC_{50,P}$ 为混合物对低泥氨氧化活性抑制作用的实测值和按加合作用计算的预测值, $a, b, \dots, n$ 分别为 A, B, $\dots, N$ 各受试化合物在混合物中所占摩尔比例, $a + b + \dots + n = 1$. $IC_{50,A}, IC_{50,B}, \dots, IC_{50,N}$ 是单一化合物对底泥氨氧化活性抑制作用的实测值.

Q 为联合作用系数,理论上对于加和作用,其值应为 1,实际上由于测定的 $IC_{50,M}$ 有一定误差范围, Q 会在一定范围内变化,本研究按 Keplinger 法, $Q < 0.57$ 为拮抗作用, Q 在 $0.57\sim1.75$ 之间为加和作用, $Q > 1.75$ 为协同作用.

1.6 混合物基团电负性的计算

电负性(E)是表征一个原子或基团在分子中吸引电子能力的经验标度,利用取代基团电负性可以预测有机化合物官能团的化学活性以及分子中各个部分的化学活性.电负性在药物的筛选与合成以及毒理学研究中应用较多^[9,14].本研究中采用的取代基团电负性(E)来自文献^[9],混合物中取代基团电负性(ME)计算方法如下:

$$ME = \sum_i X_i E_i$$

式中 E_i 为混合物中组分 i 取代基电负性, X_i 为混合物中组分 i 所占摩尔分数.

2 结果与讨论

2.1 实验结果

苯及其一取代化合物苯酚、苯胺和硝基苯等 4 种化合物的等毒性组合方式共有 11 种,各种组合对底泥氨氧化活性的联合抑制作用($IC_{50,M}$, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的测定结果见表 2.

从表 2 可以看出,在所选化合物对氨氧化活性的联合抑制作用中,抑制作用最大的是苯、苯胺和苯

酚三者的混合物,其 $IC_{50,M}$ 为 $12.65\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,低于单一化合物苯酚的 $IC_{50,M}$ ($13.60\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$);抑制作用最小的是苯和苯酚以及苯和苯胺两两的混合物,其 $IC_{50,M}$ 分别为 $34.58\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $34.28\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;其余的联合抑制作用都介于这两者之间.由于所选化合物都具有苯环结构,只是取代基不同,表明取代基不同的化合物所引起的联合作用方式就不同,其对底泥氨氧化活性的抑制作用强弱就不同.

表 2 受试化合物的联合抑制作用 ($IC_{50,M}$) 及相关参数/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

Table 2 Joint inhibition ($IC_{50,M}$) of tested chemicals and related parameters/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$					
编号	混合物	$IC_{50,M}$	Q	联合类型	ME
1	苯 + 苯酚 + 苯胺	12.65	2.23	协同	2.92
2	苯胺 + 苯酚	15.43	2.01	协同	3.14
3	苯酚 + 硝基苯	20.68	1.10	加和	3.61
4	苯 + 苯胺 + 硝基苯	21.28	1.61	加和	3.31
5	苯胺 + 硝基苯	22.47	1.79	协同	3.45
6	苯胺 + 苯酚 + 硝基苯	23.31	1.34	加和	3.45
7	苯 + 苯胺 + 苯酚 + 硝基苯	30.25	0.96	加和	3.32
8	苯 + 苯酚 + 硝基苯	31.01	0.73	加和	4.10
9	苯 + 硝基苯	32.03	0.85	加和	3.40
10	苯 + 苯胺	34.28	1.03	加和	2.81
11	苯 + 苯酚	34.58	0.52	拮抗	2.75

2.2 苯及其一取代化合物对联合抑制作用的影响

苯、苯酚、苯胺和硝基苯 4 种化合物都有共同的苯环结构,取代基分别为氢(—H)、羟基(—OH)、氨基(—NH₂)和硝基(—NO₂).这些化合物 2 种、3 种和 4 种混合时共形成 11 种混合物,对底泥氨氧化活性抑制作用的结果如表 2.按 Keplinger 法进行判断,有 7 种表现为加和作用,3 种表现为协同作用,只有苯和苯酚的混合物表现为拮抗作用.这与文献报道的水中化学污染物的联合作用以相加作用为主的结论相一致^[15].

苯和苯胺等毒性混合对底泥氨氧化活性的联合抑制作用,与苯和苯酚等毒性混合的联合抑制作用相近,分别为 $34.28\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $34.58\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.苯和苯胺等毒性混合对底泥氨氧化活性的联合抑制作用表现为明显的加和作用,苯和苯酚等毒性混合的联合抑制作用的联合系数为 0.52,略小于加和作用下限,表现为弱拮抗作用.这可能与苯环上取代基的性质有关,苯环上氢(—H)的电负性最小,既不能降低苯环电子云密度,也不能使苯环电子云密度偏离.苯环上取代基氨基的电负性虽然较大(3.05),但氨基氮原子与苯环碳原子间由于 $p-\pi$ 共

轭^[16],使得苯胺在与苯混合时对苯环上电子云密度基本没有影响,因而表现为加和作用.苯环上取代基羟基(—OH)电负性(3.48)明显大于氨基(—NH₂)的电负性,苯酚的吸电子能力明显大于后者,氧原子不能与苯环上碳原子形成共轭键.苯酚在与苯混合时能与苯环上的氢原子形成部分氢键,这样就削弱了二者的作用,因而表现拮抗作用.

硝基苯除了和苯胺混合时对底泥氨氧化抑制作用的 Q 值 1.79 略大于加和作用上限 1.75,表现为协同作用外,与苯、苯胺以及苯酚两两及多个混合时的联合作用都表现为加和作用(Q 都在 0.57~1.75 之间).这可能与苯环上的取代基团硝基有关.与氢(—H)、氨基(—NH₂)、羟基(—OH)相比,硝基(—NO₂)电负性最大(3.63),这种差异使得苯环上的硝基,一方面通过吸引苯环上的 π 电子^[17],来降低苯环上均匀分布的电子云密度,改变与之靠近的物质分子的电子云密度;另一方面可能是硝基上的氧原子能够与周围的 H 原子形成氢键,稳定与之相结合的物质分子,这两种作用共同产生的结果,就使得与之混合的化学物质都表现为加和作用.

2.3 联合抑制作用的定量构效关系

研究表明^[18~21],化学物质对单一生物的活性抑制作用不仅与物质的酸碱性、溶解度等性质有关,还与物质分子结构、空间效应等量子化学参数有关.对于多种化学物质共同存在时对生物的联合抑制作用,除了研究联合抑制作用类型^[23,24]外,还利用定量构效关系研究多种化学物质共同存在时对生物的联合抑制作用^[25,26].

本研究初步表明,苯及其一取代化合物对底泥氨氧化活性的联合抑制作用强弱与化合物上官能团的电负性 E 的平均值(ME)有相关关系(图 1):ME 越大,对底泥氨氧化活性的抑制作用越明显.为此进行数据的统计处理,结果是,苯取代化合物的 ME 与其对底泥氨氧化活性抑制作用间的相关关系为:

$$\begin{aligned} \lg IC_{50} &= 2.197 - 0.236 ME \\ N &= 8, R = 0.77, F = 8.53 \\ SD &= 0.067, p < 0.027 \end{aligned}$$

式中, N 为回归样本数, R 为线性相关系数, F 为 F 检验值, SD 为标准偏差, p 为显著水平.除异常点外, R 值达到了 0.77,表明本研究所选取的 4 种苯一取代化合物对底泥氨氧化活性的联合抑制作用与苯取代官能团的电负性 ME 的复合值之间有相关关系.等毒性混合时的 ME 越大,其对底泥氨氧化活性的联合抑制作用强度就越小.

按 95 % 的置信域估计,有 3 个异常点(苯胺 + 苯酚,苯 + 苯酚 + 硝基苯以及苯 + 苯酚 + 苯胺)明显偏离置信区域(图 1)。从图 1 可以看出,这 3 个异常点明显不同于由其各自混合电负性所预见的抑制作用强度。原因是多方面的,复合污染物的混合电负性计算方法的选取有多种,本研究只采用了较为简单的计算方法;可能还有其它因素如立体效应等的影响;实验所用底泥体系本身复杂,实验结果引起的误差也是一个方面,这些方面都还有待进一步探讨。

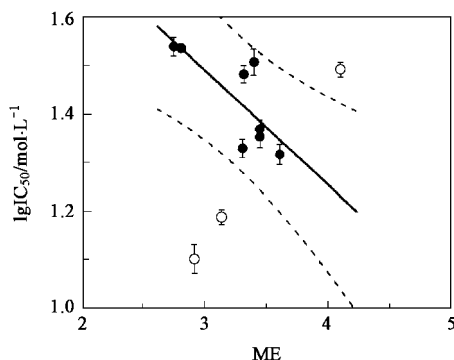


图 1 联合抑制作用与 ME 之间关系

Fig.1 Joint inhibition (IC_{50}) vs mixed electronegativity (ME)

3 结论

苯及苯环上的氢被氨基(—NH₂)、羟基(—OH)和硝基(—NO₂)取代的情况下,苯与这些化合物两者或多者混合的 11 组中有 7 组表现为加和作用,3 组表现为协同作用,只有苯和苯酚的混合物表现为拮抗作用。

苯及其一取代化合物两者或多者的混合物对底泥氨氧化活性的联合抑制作用强弱(IC_{50})与这种混合物中化合物上官能团的电负性 ME 有相关关系: $lg IC_{50} = 2.197 - 0.236 ME$,随着苯环上取代基官能团电负性之和的增加,化合物对底泥氨氧化抑制作用也越强。

参考文献:

- [1] Stensel H D, McDowell C S, Ritter E D. An automated biological nitrification toxicity test[J]. Journal Water Pollution Control Federation, 1976, 48: 2343 ~ 2350.
- [2] Kahru A, Kurvet M, Külm I. Toxicity of phenolic wastewater to luminescent bacteria photobacterium phosphoreum and activated sludges[J]. Water Science and Technology, 1996, 33(6): 139 ~ 146.
- [3] Stasinakis A S, Thomaidis N S, Lekkas T D. Toxicity of organotin compounds to activated sludge[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2001, 49(3): 275 ~ 280.
- [4] Lajoie, C A, Lin S C, Nguyen H, et al. A toxicity testing protocol using a bioluminescent reporter bacterium from activated sludge[J]. Journal of Microbiological Methods, 2002, 50(3): 273 ~ 282.
- [5] Ensenbach U, Roland N. Toxicity of complex chemical mixtures: acute and long-term effects on different life stages of zebrafish (*Brachydanio rerio*)[J]. Ecotoxicity and Environmental Safety, 1995, 30(2): 151 ~ 157.
- [6] Thomulka K W, Lange J H. Mixture toxicity of nitrobenzene and trinitrobenzene using the marine bacterium *Vibrio harveyi* as the test organism[J]. Ecotoxicity and Environmental Safety, 1997, 36(2): 189 ~ 195.
- [7] Backhaus T, Scholze M, Grimme L H. The single substance and mixture toxicity of quinolines to the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri*[J]. Aquatic Toxicology, 2000, 49(1 ~ 2): 49 ~ 61.
- [8] 周文敏,寇洪如,王湘君. 环境优先污染物[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1989. 6 ~ 96.
- [9] Xie Q, Sun H M, et al. An Iterative Method for Calculation of Group Electronegativities[J]. J. Chem. Inf. Comput. Sci., 1995, 35: 106 ~ 109.
- [10] International Standard, ISO 9509, 1989.
- [11] 董春宏,胡洪营,黄霞,钱易. 底泥硝化菌群用于生物毒性测试的初步研究[J]. 环境科学研究, 2002, 15(6): 45 ~ 48.
- [12] Faust M, Altenburger R, Backhaus T, et al. Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action[J]. Aquatic Toxicology, 2003, 63(1): 43 ~ 63.
- [13] 孟紫强主编. 环境毒理学[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2000. 44 ~ 50.
- [14] Rosenkranz H S, Klopman G. Relationships between electronegativity and genotoxicity[J]. Mutation Research, 1995, 328: 215 ~ 227.
- [15] 董建,冯致英. 环境化学物的联合毒作用[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1994. 237 ~ 245.
- [16] 梁世懿,成本诚. 高等有机化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1993: 35 ~ 50.
- [17] Jones R. A. Y. 著,欧育湘,杨志军译. 物理和机理有机化学[M]. 北京: 北京理工大学出版社, 1992. 294 ~ 266.
- [18] Zhao Y H, He Y B, Wang L S. Predicting toxicity of substituted aromatic hydrocarbons to fish by Toxicities to *Daphnia magna*[J]. Toxicol. Environ. Chem., 1995, 51: 191 ~ 195.
- [19] Ren S J, Frymier P D. Estimating the toxicity of organic chemicals to bioluminescent bacteria and activated sludge[J]. Water Research, 2002, 36(17): 4406 ~ 4414.
- [20] Cronin M T D, Aptula A O, Duffy J C, et al. Comparative assessment of methods to develop QSARs for the prediction of the toxicity of phenols to *Tetrahymena pyriformis*[J]. Chemosphere, 2002, 49(10): 1201 ~ 1221.
- [21] 魏东斌,翟丽华,董春宏,等. 取代苯化合物对发光菌急性毒性的测定及预测[J]. 环境科学, 2002, 23(增刊): 1 ~ 5.
- [22] Trevizo C, Nirmalakhandan N. Prediction of microbial toxicity of industrial organic chemicals[J]. Water Science and Technology, 1999, 39(10 ~ 11): 63 ~ 69.
- [23] Broderius S J, Kahl M D, Hoglund M D. Use of joint response to define the primary mode of toxic action for diverse industrial organic chemicals[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 1995, 14: 1591 ~ 1605.
- [24] Posthuma L, Baerselman R, Van Veen R P M, et al. Single and joint toxic effects of copper and zinc on reproduction of *Enchytraeus crypticus* in relation to sorption of metals in soils[J]. Ecotoxicology and environmental safety, 1997, 38(2): 108 ~ 121.
- [25] Xu S, Nirmalakhandan N. Use of QSAR models in predicting joint effects in multicomponent mixtures of organic chemicals[J]. Water Research, 1998, 32(8): 2391 ~ 2399.
- [26] Lock K, Janssen C R. Mixture toxicity of zinc, cadmium, copper, and lead to the pot worm *enchytraeus albidus*[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2002, 52(1): 1 ~ 7.