

苯取代化合物对底泥氨氧化活性的抑制作用研究

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: 为研究污染物对氮循环中硝化过程的影响, 利用摇瓶实验测定了 24 种苯取代化合物对底泥氨氧化活性的抑制作用。结果表明, 单取代苯化合物对底泥氨氧化活性抑制作用强弱顺序为: $-\text{OH} > -\text{NO}_2 > -\text{NH}_2 > -\text{Cl} > -\text{CH}_3 > -\text{H}$; 取代基的位置对抑制作用有一定的影响, 二甲苯对底泥氨氧化活性抑制作用强弱顺序为: 间 > 邻 > 对, 苯二胺也表现为同样的趋势, 但不明显; 多取代甲基和氨基, 随着取代基数增加对底泥氨氧化抑制作用有增强趋势。苯取代化合物对底泥氨氧化活性的抑制作用 ($\text{IC}_{50}, \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 与取代基团电负性之和 ($\sum E$) 有较好的相关关系: $\lg \text{IC}_{50} = 14.72 - 0.91 \sum E$, 苯环上取代基团的 $\sum E$ 越大, 该化合物对底泥氨氧化作用的抑制越明显。

关键词: 苯取代化合物; 底泥; 氨氧化活性; 抑制作用; 硝化活性

中图分类号: X131.2 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2004)02-0094-04

Inhibition of Aromatics 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 inhibition of 24 aromatics on ammonia oxidizing activity of nitrifying bacteria in sediment was measured. The effects of the kind, number and position of substituted groups on ammonia oxidizing activity of nitrifying bacteria were discussed. The inhibition of mono-substituted benzenes on ammonia oxidizing activity of nitrifying bacteria were in order of $-\text{OH} > -\text{NO}_2 > -\text{NH}_2 > -\text{Cl} > -\text{CH}_3 > -\text{H}$. The position of substituted groups of di-substituted benzenes also affected the inhibition, and the inhibitions of dimethylbenzenes (xylene) were in order of meta > ortho > para. The increase in number of substituted group on benzene ring enhanced the inhibition of aromatics studied in this study on nitrifying bacteria. There was a linear relationship between inhibition ($\text{IC}_{50}, \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) of aromatics on ammonia oxidizing activity and total electronegativity ($\sum E$) of aromatics: $\lg \text{IC}_{50} = 14.72 - 0.91 \sum E$.

Key words: aromatics; sediment; inhibition; ammonia oxidizing activity; nitrification activity

日益增多的污染物不但给人类健康, 而且给生态系统造成了危害。目前, 污染物对水生生态系统的影响研究, 主要是考察其对水生微生物、藻类、两栖软体动物、浮游生物和鱼类等单一水生生物的毒性^[1], 而针对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取代化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。氮循环是生态系统中最重要的物质循环之一, 硝化过程是氮循环的关键环节和控制步骤。污染物对硝化过程的影响, 主要是通过硝化菌的作用实现的。硝化菌对多数化学物质都非常敏感^[2], 选用底泥中的硝化菌群作测试生物, 评价有毒有害化学物质对硝化过程的抑制程度^[3, 4], 对研究有毒有害化学物质对水生生态系统氮循环功能的影响具有重要意义^[5]。

本文以底泥为试验对象, 利用摇瓶实验测定了 24 种苯取代化合物对底泥硝化过程中氨氧化活性

的抑制作用, 分析了取代基类型以及取代位置对底泥氨氧化活性抑制作用的影响, 初步探讨了苯取代化合物对底泥氨氧化活性抑制作用与其性质、结构之间的关系。

1 实验材料与方法

1.1 测试化合物

24 种受试化合物均为分析纯, 实验时配成一定浓度的储备液备用。

1.2 抑制作用实验

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^[6]进行, 所用底泥取自本实验室的

收稿日期: 2003-05-10; 修订日期: 2003-09-24

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, 清华大学在读博士生, 主要从事废水生态效应的研究。

* 联系人

底泥培养系统^[7]. 实验时,从系统中取出表层底泥 200 mL,放于 2000 mL 烧杯中,稀释至 1000 mL,利用磁力搅拌器连续搅拌,使整个体系保持均一,并恒温至 35 ℃.

实验设计的受试化合物浓度是按对数等差浓度安排的,并以不加受试化合物作为空白参照,以烯丙基硫脲(ATU)作为毒物参照,初始氨氮浓度控制在 50 mg/L. 在一系列 500 mL 的锥形瓶中,依实验设计确定的初始浓度要求,加入不同体积的受试化合物溶液以及以 (NH₄)₂SO₄ 为主要成分的培养液^[7],用去离子水控制反应液体积为 300 mL,置于 30 ℃ ± 0.5 ℃ 摇床内,以 150 ~ 160 r/min 的转速振荡. 待混合液温度稳定后,分别加入 100 mL 均匀混合的底泥悬浮液,并用磷酸盐缓冲液调整混合液 pH 值在 8.0,开始振荡计时,测定氨氮浓度随时间的变化.

同时进行平行实验一次. 当参照毒物 ATU 浓度为 0.238 mg·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.

表 1 苯取代化合物对底泥氨氧化活性的抑制作用(IC₅₀/μmol·L⁻¹)及其电负性

Table 1 Measured IC₅₀ of aromatics on ammonia oxidizing activity (IC₅₀/μmol·L⁻¹) and electronegativity

编号	测试化合物	IC ₅₀	∑ E ^[8,9]	编号	测试化合物	IC ₅₀	∑ E ^[8,9]
1	苯	275.93	13.800	13	邻苯二胺	6.46	15.300
2	苯酚	13.60	14.981	14	间苯二胺	4.22	15.300
3	甲苯	78.54	13.965	15	对苯二胺	4.81	15.300
4	氯苯	55.08	14.596	16	邻甲苯胺	4.77	14.715
5	苯胺	48.53	14.550	17	对甲苯胺	21.96	14.715
6	硝基苯	32.01	15.126	18	二苯胺	150.24	8.493
7	邻二甲苯	809.10	14.130	19	邻羟基对氨基甲苯	17.47	15.896
8	间二甲苯	13.27	14.130	20	邻硝基对氨基甲苯	142.23	16.041
9	对二甲苯	32.97	14.130	21	间硝基甲苯	4.07	15.291
10	邻二氯苯	NT ¹⁾	15.392	22	间硝基对氨基甲苯	96.65	16.041
11	间二氯苯	125.03	15.392	23	邻硝基对氨基氯苯	24.84	16.672
12	对二氯苯	NT ¹⁾	15.392	24	联邻甲苯胺	NT ¹⁾	17.415

1)表中 NT 为有抑制,由于超出溶解度而未检测到 IC₅₀

由表 1 可以看出,抑制作用最强的是间硝基甲苯,其次是间苯二胺和邻甲苯胺;抑制作用最弱的为邻二甲苯,其次是苯. 还可以看出,苯环上取代基不同,取代位置不同以及取代基数不同,对氨氧化活性的抑制程度也不同.

2.2 取代基对底泥氨氧化活性抑制作用的影响

苯环上的氢被 -Cl, -CH₃, -NO₂, (-H), -OH, -NH₂ 单取代时,对底泥氨氧化活性的抑制作用如图 1 所示. 从图 1 可以看出,抑制作用强弱

1.3 分析方法

氨氮测定:取混合液 5 ~ 7 mL,经 0.45 μm 滤膜过滤后,用纳氏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

受试化合物对底泥氨氧化活性的 24h 抑制作用(IC₅₀),通过氨氮消耗速率的相对变化率由直线内插法求得^[7]. IC₅₀ 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.

2 结果与讨论

2.1 苯取代化合物对底泥氨氧化活性的抑制作用

24 种苯取代化合物对底泥氨氧化活性的抑制作用(IC₅₀, μmol·L⁻¹) 的测定结果见表 1. 表中还有 3 种(邻二氯苯、对二氯苯以及联邻甲苯胺)苯取代化合物,由于其 IC₅₀ 大于该物质溶解度,因而未测得 IC₅₀ 值.

顺序大致为: -OH > -NO₂ > -NH₂ > -Cl > -CH₃ > -H, 这与基团电负性大小顺序基本一致^[9,10],说明电负性越大,苯环上的电荷受基团的吸引力越大,苯取代化合物分子极性越大,与底泥中氨氧化微生物作用时,与微生物结合部位的作用增强,因而抑制作用增强. 对表 1 中的邻羟基对氨基甲苯、邻硝基对氨基甲苯以及邻硝基对氨基氯苯对底泥氨氧化活性抑制作用强弱进行比较,得出一致的结论: -OH > -NO₂, -Cl > -CH₃.

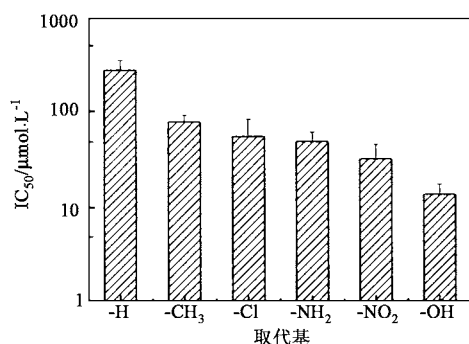
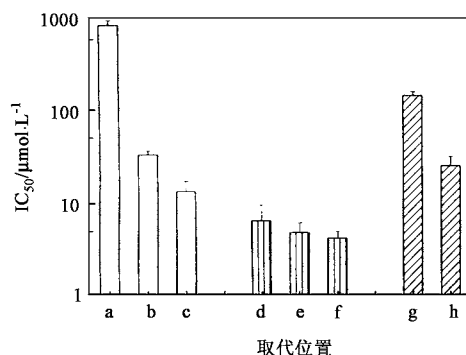


图 1 苯单取代化合物对氨氧化活性的抑制作用

Fig.1 Inhibition of mono-substituted benzenes on ammonia-oxidizing activity

2.3 取代基位置及取代基个数对氨氧化活性的抑制作用的影响

苯环上不同取代基对氨氧化活性的抑制作用不同,对相同取代基,苯环上取代基位置对氨氧化菌活性的抑制作用也有一定的影响.如图2,二甲苯对底泥氨氧化活性抑制作用强弱顺序为:间>对>邻,苯二胺也表现为同样的趋势,但不如二甲苯显著.对于苯环上多取代化合物,如表1中的邻硝基对氨基



a. 邻二甲苯; b. 对二甲苯; c. 间二甲苯;
d. 邻苯二胺; e. 对苯二胺; f. 间苯二胺;
g. 邻硝基对氨基甲苯; h. 间硝基对氨基甲苯

图 2 取代基位置对氨氧化活性抑制作用的影响

Fig.2 Effects of substituted positions on benzene ring on the inhibition of ammonia-oxidizing activity

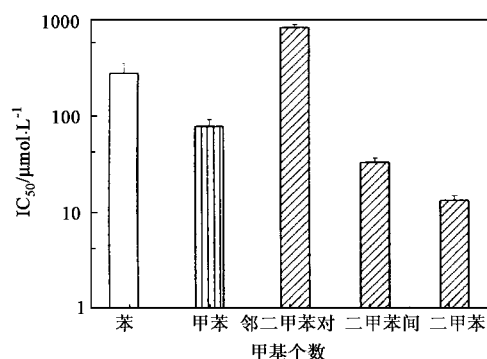


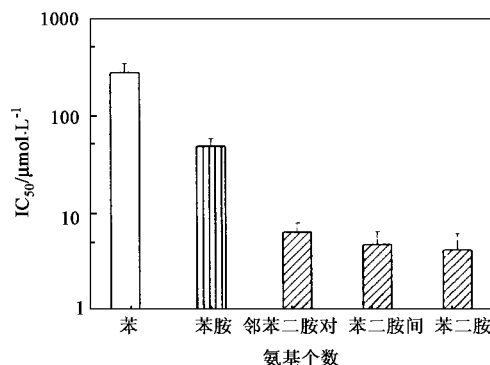
图 3 取代基个数对底泥氨氧化活性抑制作用的影响

Fig.3 Effects of number of substituted groups on inhibition of ammonia-oxidizing activity

取代基个数也有影响,以甲基和氨基取代为例,如图3,可以看出,与苯对底泥氨氧化作用的抑制相比,随着苯环上-CH₃或-NH₂个数的增加,化合物对底泥氨氧化活性抑制作用的总趋势在增强,-CH₃个数的增加使得苯环电子云密度由于 α - π 的超共轭而有不同程度的降低^[10], -NH₂个数的增加则是由于电负性显著差异致使苯环电子云密度降低^[9],在与底泥中氨氧化微生物作用时,表现出与结合部位作用的增强,因而抑制作用增强.

2.4 苯取代化合物对底泥氨氧化活性抑制作用与分子结构性质关系初步分析

甲苯和间硝基对氨基甲苯,其差异是由于硝基所处取代位置不同所引起,也存在相同的抑制强弱顺序:间>邻.这一差异是由相同取代基的取代位置变化引起的,表明抑制作用的强弱还与苯环上不同位置的电子效应有关^[10,11].



一些研究^[12~15]表明,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. Trevizo^[16]报道了化合物对活性污泥与纯硝酸菌的毒性作用 IC₅₀ (mmol/L) 与水溶性 S (mmol/L) 之间的相关关系:

活性污泥: $\lg IC_{50} = -0.12 + 0.61 \lg S$

纯硝酸菌: $\lg IC_{50} = 0.43 + 0.22 \lg S$

本研究初步表明,苯取代化合物对底泥氨氧化活性的抑制作用强弱与化合物上官能团的电负性 E 有相关关系(图4): E 越大,对底泥氨氧化活性的

抑制作用越明显. 为此进行数据分析, 以苯环上各官能团总电负性和 $\sum E$ 为自变量, IC_{50} 为因变量, 在个人 PC 机上用软件 SPSS10.0 进行数据处理, 苯取代化合物的 $\sum E$ 与其对底泥氨氧化作用间的正相关关系为:

$$\lg IC_{50} = 14.72 - 0.91 \sum E$$

$$N = 15; R = 0.784; SD = 0.462;$$

$$F = 17.79; P < 0.0005$$

式中, N 为回归样本数, R 为线性相关系数, SD 为标准偏差, F 为 F 检验值, P 为显著水平. 可以看出, R 值达到了 0.784, 表明苯取代化合物对底泥氨氧化活性的抑制作用与苯取代官能团 $\sum E$ 之间有很好的相关关系. 随着 $\sum E$ 的增加, IC_{50} 逐渐变小, 对底泥氨氧化活性抑制作用增强. 回归式中的异常点主要为与硝基取代相关的化合物(硝基苯、邻硝基对氨基氯苯、间硝基对氨基甲苯、邻硝基对氨基甲苯), 而且抑制作用明显偏小, 可能是由于 $-NO_2$ 基团上的氧本身易于与邻位上的氢形成分子内氢键, 从而削弱了与氨氧化菌作用的能力所引起.

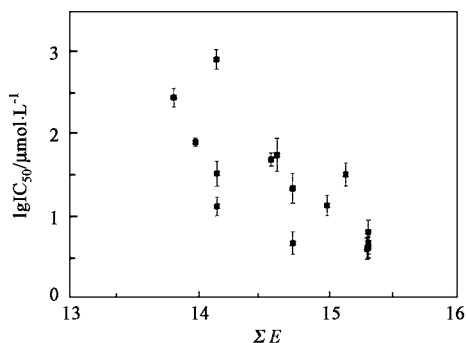


图 4 电负性与底泥氨氧化抑制作用间的关系

Fig.4 Relationship of IC_{50} and $\sum E$

3 结论

苯单取代化合物对底泥氨氧化活性抑制作用强弱顺序为: $-OH > -NO_2 > NH_2 > -Cl > -CH_3 > -H$; 取代基位置对氨氧化活性抑制作用亦有影响, 二甲苯的抑制作用强弱顺序为: 间 > 邻 > 对; 多取代甲基和氨基, 随着取代基个数增加对底泥氨氧化抑制作用有增强趋势.

苯取代化合物对底泥氨氧化的抑制作用 (IC_{50} , $\mu mol \cdot L^{-1}$) 与官能团的电负性之和 $\sum E$ 有正相关关系: $\lg IC_{50} = 14.72 - 0.91 \sum E$, 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增强.

参考文献:

- [1] 黄正, 王家玲. 发光细菌的生理特性及其在环境监测中的应用[J]. 环境科学, 1995, 16(3): 87~90.
- [2] 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.
- [3] Nowak O, Svardal K. Observations on the kinetics of nitrification under inhibiting conditions caused by industrial wastewater compounds[J]. Water Science and Technology, 1993, 28(2): 115~123.
- [4] Lee Y W, Ong S K, Sato C. Effects of Heavy Metals on Nitrifying Bacteria[J]. Water Science and Technology, 1997, 36(12): 69~74.
- [5] 杜秀英, 竺乃恺, 夏希娟, 等. 微宇宙理论及其在生态毒理学中的应用[J]. 生态学报, 2001, 21(10): 1726~1733.
- [6] International Standard, ISO 9509, 1989.
- [7] 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.
- [8] Qian Xie, Hong mei Sun, et al. An Iterative Method for Calculation of Group Electronegativities[J]. J. Chem. Inf. Comput. Sci., 1995, 35: 106~109.
- [9] 陈念贻. 键参数函数及其应用[M]. 北京: 科学出版社, 1976: 5~29.
- [10] 梁世懿, 成本诚. 高等有机化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1993: 29~90.
- [11] 沈宏康. 有机酸碱[M]. 北京: 高等教育出版社, 1983: 26~88.
- [12] 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.
- [13] Ren S J, Frymier P D. Estimating the toxicity of organic chemicals to bioluminescent bacteria and activated sludge[J]. Water Research, 2002, 36: 4406~4414.
- [14] Cronin M T D, Aptula A O, et al. Comparative assessment of methods to develop QSARs for the prediction of the toxicity of phenols to *Tetrahymena pyriformis*[J]. Chemosphere, 2002, 49: 1201~1221.
- [15] 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(sup): 1~5.
- [16] Trevizo C, Nirmalakhandan N. Prediction of microbial toxicity of industrial organic chemicals[J]. Water Science and Technology, 1999, 39(10~11): 63~69.