辣根过氧化物酶处理五氯酚过程的毒性特征

张国平① J. A. Nicell② 邹永廖①

(①中国科学院地球化学研究所, 贵阳 550002; ②Department of Civil Engineering and Applied Mechanics, McGill University, 817 Sherbrooke Street West, Montreal, Quebec H3A 2K6, Canada)

摘要 用酶的催化聚合作用来处理酚类及芳香胺类化合物的污染是近年来受到重视的新方法, 但人们很少研究废水在这一处理过程中的毒性变化. 采用辣根过氧化物酶和过氧化氢在 pH 值为 4 时处理含五氯酚的模拟废水, 集中研究了该过程的发光菌毒性特征. 结果表明, 五氯酚溶液的毒性在处理后大为降低, 总毒性可降低至起始毒性的 15%左右. 处理过程的产物有少量溶解在水中, 也构成一部分毒性.

关键词 辣根过氧化物酶 五氯酚 废水 毒性

近年来, 用酶的催化聚合作用处理废水引起了许多研究者的重视[1~5]. 但对于这一过程, 大部分研究着重于如何去除底物以及如何节约酶用量, 很少研究废水在处理过程中的毒性变化. 对于一种处理方法, 要使之能够应用于具体实际, 就必须了解废水在处理前后的毒性特征[6].

本文采用辣根过氧化物酶(HRP)与过氧化氢相结合, 对五氯酚(PCP)的模拟水溶液进行处理, 集中研究了处理过程中溶液的发光菌毒性特征.

1 材料与方法

(ⅰ) 试剂. 辣根过氧化物酶(EC1.11.1.7)、过氧化氢酶(EC1.11.1.6)和甲醇是 Sigma 化学品公司的产品. 醋酸、醋酸钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠是 Anachemia 有限公司的产品. H_2O_2(30%体积比)是 Fisher 公司的产品. 五氯酚(纯度>99%)是 Fluka 公司的产品. 有关毒性测定用的试剂均为仪器生产商(Azur Environmental 公司)的产品.

(ⅱ) 酶活性测定. 采用酚、H_2O_2 为试剂, 4-氨基安替比林(AAP)为显色剂. 酚的浓度为 10 mmol/L, 4-氨基安替比林为 2.4 mmol/L, H_2O_2 为 0.2 mmol/L, pH 值为 7.4(缓冲液为磷酸二氢钠-磷酸氢二钠溶液), 温度为 25℃. 酚的反应产物与 4-氨基安替比林生成红色物质.

在反应开始阶段, 酶的活性与反应溶液在 510 nm 处的消光度的变化速度成正比. 在酶加入后, 迅速将比色皿颠倒 3 次以混合均匀, 并立即置于分光光度计上测定消光度随时间的变化. 消光系数为 7 100 L·mol^{-1}·cm^{-1}. 单位酶活性(1 U)的定义为: 在 pH = 7.4, 温度为 25℃时, 如果每分钟内消耗 1 μmol 的 H_2O_2, 那么相应的酶的活性就是 1 U.

(ⅲ) 实验方法. 将五氯酚固体溶解在甲醇中, 配制成浓度为 5 mmol/L 的储存液. 取适量储存液加入到 pH 值为 4 的缓冲液(醋酸-醋酸钠缓冲液)中, 配制成实验用的五氯酚水溶液. 按所需用量, 加进过氧化氢和辣根过氧化物酶, 然后持续搅拌. 五氯酚的初始浓度为 0.05 mmol/L, 这也相当于常温下五氯酚在水中的溶解度[7]. 反应溶液的总体积为 10 mL(有关毒性及底物随反应时间变化的实验为 100 mL), 实验温度控制在 25℃, 反应时间为 3 h(有关毒性及底物随反应时间变化的实验除外). 需结束反应时, 加进过氧化氢酶(每 10 mL 溶液加 50 μL 1 mg/mL 的过氧化氢酶), 使 H_2O_2 迅速分解为 H_2O 和 O_2, 从而使反应终止. 之后, 将样品在 3

500 r/min 的速度下离心 30 min，取清液进行毒性及残存底物(PCP)的测定.

(ⅳ) 分析方法. (1) 底物五氯酚的分析是采用 Waters Associates 公司生产的 441 型高效液相色谱(HPLC)，检测器是紫外检测器(波长 254 nm)，所用的色谱柱是 Supelcosil-LC18. 淋洗液是 88∶12(体积比)的甲醇和水的混合液. 为保证色谱峰型，在淋洗液中加有醋酸和醋酸钠，其在淋洗液中的含量与在 pH = 4 的缓冲液中的含量相同. 淋洗液在使用前预先经过 0.45 μm 微孔过滤和脱气. 淋洗液流量为 1 mL/min，进样体积为 10 μL. (2) 采用 Microtox Model 500 毒性分析仪测定样品的毒性. Aitken 等人[6]较详细地阐述了该方法. 将引起微生物发光强度减少 50% 时溶液的浓度定义为有效浓度 EC_{50}. 实际上仪器给出的结果 EC_{50} 是可使发光菌的发光强度减少 50%时的溶液浓度与被测溶液浓度之比. 这时，为了方便，可以采用 EC_{50i} 的倒数 TU_{50}($TU_{50} = 1/EC_{50}$)来衡量毒性. 某毒性物质所对应的 TU_{50i} 与其含量具有线性关系($TU_{50i} = g_iC_i$).

由于反应溶液通常含有多种毒性组分，如残存底物、各种产物，溶液的总毒性可以用下式来衡量[8]:

$$1/\mathrm{EC}_{50} = \sum_{i=1}^{n} (f_i / \mathrm{EC}_{50i}), \tag{1}$$

因为 $TU_{50} = 1/EC_{50}$，而且 $TU_{50i} = g_iC_i$，所以

$$\mathrm{TU}_{50} = \sum_{i=1}^{n} (f_i \mathrm{TU}_{50i}) = \sum_{i=1}^{n} (f_i g_i C_i) = \sum_{i=1}^{n} (k_i C_i), \tag{2}$$

其中 n 为毒性组分的种类，$k_i = f_ig_i$，C_i 为毒性组分的含量，f_i 是组分 i 在所有毒性组分中所占的比率.

由于 H_2O_2 会影响毒性测定，所以需在测定前先加过氧化氢酶破坏 H_2O_2. 经检验，所用缓冲液、辣根过氧化物酶、过氧化氢酶对测定毒性用的微生物没有影响. 测定时采用仪器生产商(美国的 Azur Environmental 公司)提供的标准测定程序. 由于样品的 pH 值为 4，所以在测定前先用 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L HCl 把样品的 pH 值调至测定要求的 7.

2 结果与讨论

本文测得 PCP 水溶液的 EC_{50} 为 0.97 mg/L. Aitken 等[6]和 Walker[9]测得的结果分别为 1.5 和 1.3 mg/L. 考虑到毒性测定的影响因素多，结果变化范围大，可以认为，以上结果符合得较好. 由于实验中使用的是醋酸-醋酸钠缓冲液，我们还测定了醋酸-醋酸钠缓冲液中 PCP 的毒性，其 EC_{50} 为 0.88 mg/L，与 PCP 水溶液的 EC_{50} 相差很小，说明醋酸-醋酸钠缓冲液对毒性基本上没有影响.

我们[10]研究了用辣根过氧化物酶处理 PCP 过程的一些特征，包括 pH 值、反应速度、酶的最佳用量等. 研究得出反应的最佳 pH 值为 4~5. 对于 0.05 mmol/L 的 PCP 溶液来说，使用 0.1 U/mL 的 HRP 即可获得最高的 PCP 去除率. 另外，PCP/H_2O_2 的适当范围为 1~2. 因而，本文在测定毒性随时间变化的实验中，采用的 HRP 用量为 0.1 U/mL，pH 值为 4，PCP/H_2O_2 比为 1.

我们测定了底物及毒性随反应时间的变化. 图 1 显示了残余毒性占起始毒性的百分比及底物(PCP)残留率随反应时间的变化. 由图可知，HRP 的催化作用可以有效地降低 PCP 溶液的毒性. 在反应开始的 10 min 内，毒性和 PCP 含量都随时间很快下降，之后继续缓慢地下降，最

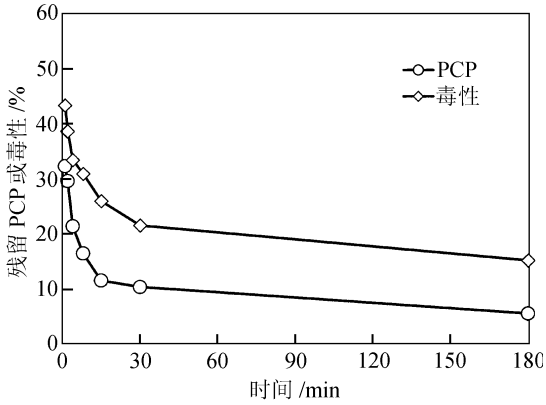


图 1　PCP 及毒性随反应时间的变化

PCP 初始浓度: 0.05 mmol/L, H_2O_2: 0.05 mmol/L, HRP: 0.1 U/mL, pH = 4, 温度 25℃

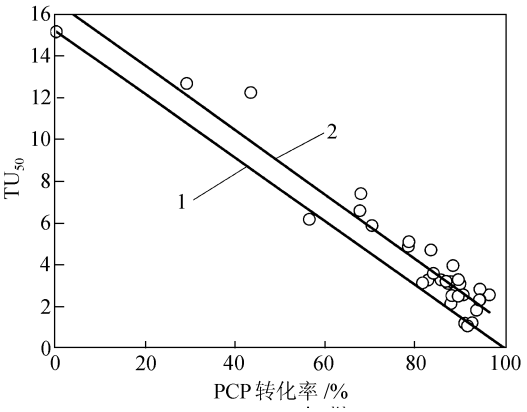


图 2　反应溶液的残留毒性

PCP 初始浓度: 0.05 mmol/L, H_2O_2: 0.05 mmol/L, pH = 4, 温度 25℃, 反应时间为 3 h

终毒性仅为起始毒性的 15%左右. 对比两条曲线可见, 在整个过程中, 毒性曲线一直高于 PCP 的曲线. 两条曲线的差别暗示反应产物也对溶液的总毒性有贡献, 因为如果反应产物完全没有毒性、溶液的毒性完全取决于底物 PCP 的话, 那么两条曲线应该重合.

另外, 我们还测定了多个样品在 3 h 反应后的残余毒性及 PCP 转化率. 测定结果见图 2. 根据毒性测定的方法, TU_{50} 应该与毒性物质的含量成正比, 对于溶液总毒性只取决于残留 PCP 的理想过程, 图 2 曲线 1 就代表了理想处理过程的毒性变化. 将残余毒性对 PCP 的转化率作图, 样品点应该落在这条理想毒性线上. 但在本图中, 几乎所有的处理后样品的毒性测定结果均高于这条理想毒性线. 将这些结果用最小二乘法拟合的实际毒性趋势线(图 2)说明, 除了残留底物 PCP 外, 还有其他物质也产生了毒性, 这与图 1 的推断是一致的. 由于 H_2O_2 已经被过氧化氢酶分解掉, 而过氧化氢酶、缓冲液及 HRP 不会产生毒性, 由此可知, 样品的实际毒性与理想毒性之差是由反应的产物引起的.

以下根据现有数据简要讨论 PCP 处理过程中的毒性计算. 由以前的研究[10]可知, PCP 聚合过程的产物主要是二聚体. 如果只考虑 PCP 及二聚体$(PCP)_2$引起的毒性, 由 (2) 式可得

$$TU_{50} = k_1[PCP] + k_2[(PCP)_2], \tag{3}$$

其中 [PCP]为残留 PCP 的含量, $[(PCP)_2]$为二聚体$(PCP)_2$的含量.

通常情况下, 聚合反应开始时速度非常之快, 很快就出现聚合体的沉淀, 也就是说由于$(PCP)_2$溶解度低, 溶液中的$(PCP)_2$很快达到了饱和, 多余的$(PCP)_2$形成沉淀. 在反应进行很短时间之后, 溶液中$(PCP)_2$的含量不变, $k_2[(PCP)_2]$就可以视为一个常量, 溶液的毒性可以表示为[PCP]的函数.

由本文的数据进行回归分析, 得回归直线

$$TU_{50} = -15.36X + 16.55 \qquad (R^2 = 0.931,\ X \text{ 为转化率}), \tag{4}$$

其中 $X = (0.05-[PCP])/0.05$ (本文中 PCP 的初始浓度为 0.05 mmol/L), 代入(4)式, 得

$$TU_{50} = 307.2[PCP] + 1.19. \tag{5}$$

这就是依据本文数据得出的 PCP 处理过程中溶液毒性的简略计算式.

综上所述, 在 HRP 催化聚合底物五氯酚的过程中, 聚合后的产物大部分形成沉淀后可以

用沉淀法或过滤法除去，但仍有少量产物溶解在溶液中. 这些产物会产生一部分毒性，因而即使底物 PCP 已全部转化，溶液的毒性也不能完全消除，仍然会对环境构成危害，需用其他方法(如微生物法)进一步去除. 我们在去除底物的毒性的同时，必须注意少量溶解在水中的产物的毒性. 在本研究中，PCP 催化聚合的产物(溶解部分)对总毒性的贡献很小，使得当 PCP 大部分转化时，总毒性也大为降低，没有出现由于少量产物的溶解而使总毒性高于或者等于起始毒性的情形.

值得指出的是，酶是具有高度选择性的催化剂，对废水中的酚类污染物选择性强[6]. 另外，酶催化法反应速度快，可望用来在较短的时间内除去大部分底物，并除去大部分毒性，剩余的毒性可以用其他处理方法进一步去除. 在与其他方法的结合中，酶催化法可望起到一个选择性地去除某类污染物、减少污染物负荷、缩短处理时间、降低处理成本的作用.

3 结论

(1) 辣根过氧化物酶的催化聚合作用可以有效地降低五氯酚废水的毒性，处理后总毒性可降低至起始毒性的 15%左右.

(2) 处理过程的产物大部分沉淀后仍有少量溶解在溶液中. 这些溶解部分也具有毒性，会对总毒性产生影响. 这部分毒性可继续用其他方法去除.

参 考 文 献

1 Nicell J A, Bewtra J K, Taylor K E, et al. Enzyme catalyzed polymerization and precipitation of aromatic compounds from wastewater. Wat Sci Tech, 1992, 25(3): 157~164

2 Nakamoto S, Machida N. Phenol removal from aqueous solutions by peroxidase-catalyzed reaction using additives. Wat Res, 1992, 26(1): 49~54

3 Dec J, Bollag J M. Use of plant material for the decontamination of water polluted with phenols. Biotechnology and Bioengineering, 1994, 44: 1132~1139

4 Wu J, Taylor K E, Zou H, et al. Phenol conversion and dimeric intermidiates in horseradish peroxidase-catalyzed phenol removal from water. Environ Sci Tech, 1994, 28: 2154~2160

5 张 彤，赵庆祥，黄 慧，等. 辣根过氧化物酶处理酚和氯酚的催化特性研究. 环境科学, 1998, 19(1): 25~29

6 Aitken M D, Massey I J, Chen T, et al. Characterization of reaction products from the enzyme catalyzed oxidation of phenolic pollutants. Wat Res, 1994, 8(9): 1879~1889

7 Verchueren K. Handbook of environmental data on organic chemicals. New York: Van Nostrand Reinhold Company, 1997

8 Heck P E, Massey I J, Aitken M D. Toxicity of reaction products from enzymatic oxidation of phenolic pollutants. Wat Sci Technol, 26: 2369~2371

9 Walker J D. Effects of chemicals on microorganisms. J Wat Pollut Control Fed, 1989, 61: 1077~1097

10 张国平, Nicell J A, 邹永廖. 用辣根过氧化物酶处理废水中的五氯酚. 环境科学研究, 2000, 13(2): 12~14

(2000-04-20 收稿)