

有机磷农药在水生态系中生物 净化机理研究

3. 对硫磷及其降解产物对栅藻光合作用的影响和 模拟藻菌系统中对硝基酚的降解

谭渝云 张甬元 孙美娟

(中国科学院水生生物研究所)

提 要

对硝基酚对栅藻光合放氧有明显抑制作用,半抑制浓度在16毫克/升左右;对硝基酚钠对栅藻光合放氧和 CO_2 同化的抑制作用十分一致,它们的半抑制浓度分别在54毫克/升和52毫克/升左右。实验室证明对硝基酚在水体中主要是由细菌分解,藻类起供氧作用。一旦藻类的光合放氧受到抑制,细菌对对硝基酚的好气性降解能力也消失。对硫磷和二乙基硫代磷酸钾对栅藻光合放氧无明显抑制作用。

利用藻类和细菌共生原理处理生活污水,很早就为人们所重视,并进行了许多研究。Oswald等^[7,8]对氧化塘的藻菌共生系统中藻类的光合放氧和污水净化的关系作了大量工作。

我们利用鸭儿湖氧化塘处理有机磷农药废水,取得了比较好的效果。有机磷农药及其中间产物进入氧化塘,经过微生物作用,主要是细菌降解形成无机磷、氮和 CO_2 等营养元素。这些物质被自养性的藻类利用,藻类进行光合作用放出氧气又供给微生物生活所需。借助于这个相互依赖的藻菌共生系统完成了有机农药的降解过程^[2]。

当有机毒物进入水体后,其含量超过藻类的耐受浓度时就会产生毒害作用。氯代烃农药对藻类光合作用的影响有比较多的报道。Charles^[5]用 C^{14} 标记碳酸氢盐测定藻类的光合作用,证明DDT浓度为200 ppb时对4种海藻的光合同化 CO_2 有抑制作用。Boush等^[4]研究了DDT及其衍生物和狄氏剂对藻类生长的影响,提出了不仅毒物原体而且其降解的中间产物对藻类生长也有不利的影响。Ewald等^[6]在1976年研究了多氯联苯对裸藻的毒性,并测定对叶绿素含量、同化 CO_2 和放氧的影响,指出了多氯联苯对同化 CO_2 有抑制作用,但对放氧抑制不明显。

作者以对硫磷为代表研究了原体及降解产物对硝基酚和二乙基硫代磷酸钾对栅藻光

合放氧和固定 CO_2 的急性致毒作用。并在研究细菌 *Pseudomonas* sp. CTP-02 降解对硝基酚特性的基础上^[1],在模拟藻菌系统中,观察了对硝基酚的降解规律。

材 料 和 方 法

藻种培养 藻种是斜生栅藻 [*Scenedesmus obliquus* (Turp) Kütz], 容器为 2000 毫升的方玻璃缸, 500 瓦碘钨灯作为光源, 光照 10 小时暗 14 小时, 通以含 2.5% CO_2 的氮气, 并加电动搅拌, 培养基为水生 4 号^[3]。藻种在上述条件下培养 3 天。

细菌培养 从氧化塘系统中分离驯化的细菌 *Pseudomonas* sp. CTP-02 经富集置于 2500 毫升的试剂瓶中, 用 Burk 无机培养基并加对硝基酚为唯一碳源通气连续培养。

光合放氧测定 40 毫升具水套的玻璃反应槽, 外层通入恒温水, 控制反应温度在 30℃, 槽内加电磁搅拌。将培养 3 天后的栅藻种离心收集细胞, 悬浮于新鲜水生 4 号培养基中, 控制藻悬液的光密度 OD_{650} 为 0.6 左右, 并通入含 6% CO_2 的氮气和纯氮气调 pH 至 6.0 或 7.5。具温度补偿的测氧银铝电极插入反应槽中, 氧电极连在带自动记录的测氧仪上。距反应槽 15 厘米处用 2.5 伏 300 瓦碘钨灯作为光源, 光强为 18,000 lx。

光照开始两分钟后加入一定浓度的试验农药并自动记录氧含量的变化。

测定同化 CO_2 的装置同上, 栅藻细胞离心后悬浮在 0.002 M 碳酸氢钠缓冲液中, 用 CO_2 和氮气混合气体调 pH 至 7.5。用测定 pH 值的复合玻璃电极代替测氧电极, 连接在带自动记录仪的 pH S 29 A 型的 pH 计上, 加入对硝基酚 2 分钟后开始光照, 观察自动记录仪上 pH 值的变化, 然后依公式换算成 CO_2 同化量。

模拟藻菌共生系统试验在 100 毫升比色管中进行, 加入新鲜栅藻和离心收集的 CTP-02, 培养基为水生 4 号或 Burk 无机培养基, 控制栅藻 OD_{650} 在 0.45 左右, 菌液 OD_{500} 在 0.1 左右。以单一栅藻和单一细菌作对照, 藻菌系统和单一栅藻组均加光照, 单一细菌组通空气。然后向各处理组加入不同试验浓度的对硝基酚, 试验至对硝基酚完全被分解后结束。

离心除掉栅藻和细菌细胞, 上清液直接在上分二厂 721-分光光度计波长 410nm 处测定对硝基酚吸收值的变化。菌液在波长 500nm 处测定光密度以表示细菌生长情况。

结 果 和 讨 论

1. 对硝基酚对栅藻光合作用的影响

在光照下 pH 为 6.2 的栅藻悬液中, 加入浓度为 10—40 毫克/升的对硝基酚, 经不同浓度对硝基酚处理后, 栅藻光合放氧曲线如图 1, 单位时间内对硝基酚对栅藻总放氧量的影响见表 1。

从图 1 可以看出光合放氧量随着对硝基酚浓度的增加而逐渐受到抑制。在未加对硝基酚的对照组中, 8 分钟后溶氧升高到 4 毫克/升, 当对硝基酚浓度为 10 毫克/升时, 反应 8 分钟后溶氧只升高 2.75 毫克/升, 抑制了 31.25%。然而对硝基酚浓度达到 40 毫克/升时, 反应开始 1 分钟溶氧只增加了 0.2 毫克/升, 以后上升很慢, 8 分钟后仍保持在 0.25 毫

克/升，抑制藻类放氧率达到 93.75 %。藻类放氧速率比较结果 (表 1) 表明了藻类光合放氧量随着栅藻接触对硝基酚的时间增长而逐渐下降，如加入 40 毫克/升对硝基酚的一组在两分钟以后，藻类光合放氧速度降至零，光合放氧完全受到抑制。

对硝基酚的钠盐对栅藻光合作用的影响是在 pH 7.5 条件下进行的，其浓度范围在 23.2—81.2 毫克/升时栅藻光合放氧曲线见图 2。对栅藻细胞放氧速率的影响见表 2。

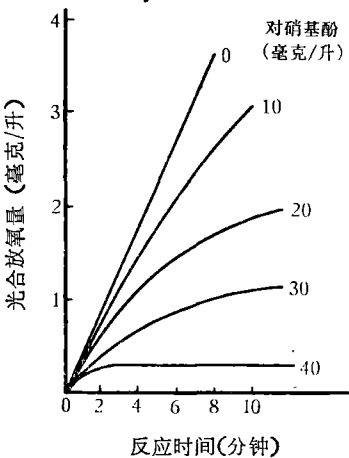


图 1 不同浓度对硝基酚对栅藻光合放氧的影响

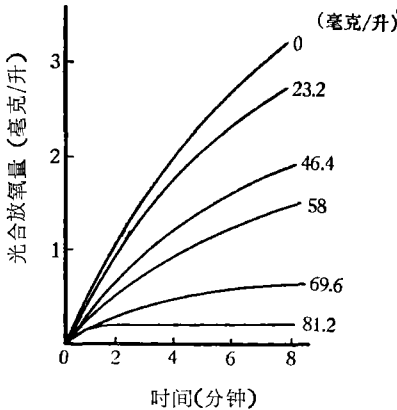


图 2 不同浓度对硝基酚钠对栅藻光合放氧的影响

表 1 对硝基酚对栅藻光合放氧速率的影响 (单位: 毫克/藻干重克/分)

对硝基酚浓度(毫克/升)	反 应 时 间 (分)			
	2	4	6	8
0	0.800	0.800	0.800	0.800
10	0.660	0.584	0.504	0.456
20	0.420	0.360	0.240	0.190
30	0.384	0.176	0.144	0.080
40	0.190	0	0	0

表 2 对硝基酚钠对栅藻光合放氧速率的影响 (单位: 毫克氧/藻干重克/分)

对硝基酚钠浓度(毫克/升)	反 应 时 间 (分)			
	2	4	6	8
0	0.95	0.779	0.606	0.433
23.2	0.779	0.736	0.476	0.268
46.4	0.606	0.381	0.329	0.303
58	0.416	0.346	0.259	0.217
69.6	0.199	0.1039	0.1039	0.052
81.2	0.132	0	0	0

从图 2 和表 2 的结果可以看出，对硝基酚钠对藻类的光合放氧的抑制作用也是随其浓度的增加而加强的。与对硝基酚相比对光合放氧抑制作用显著降低，当对硝基酚浓度

达到 40 毫克/升时,栅藻光合放氧完全被抑制,而钠盐在 46.4 毫克/升时仅抑制 41.5%,直到浓度增高到 81.2 毫克/升才完全抑制藻类放氧。可见对硝基酚钠对栅藻光合放氧的抑制作用比对硝基酚低一倍。pH 7.5 以上不仅有利于分解对硝基酚细菌的生长,而且在这样的 pH 条件下对硝基酚是以钠盐的形式存在的,对藻类光合放氧的影响也比较小,藻类可以提供充足的氧气给细菌利用,在水环境中这种条件是对硝基酚降解的有利因素。

对硫磷和二乙基硫代磷酸的钾盐试验结果表明:这两种化合物浓度甚至超过 100 毫克/升时,对栅藻光合放氧也没有明显的抑制作用。

对硝基酚钠对栅藻的 CO_2 同化作用的影响可通过碳酸氢盐缓冲液中 pH 的变化加以测定。从栅藻液中对硝基酚由 11.6 毫克/升到 69.6 毫克/升时的 pH 的变化可以看出:对照组藻类在光照后,溶液中 pH 值逐渐上升,8 分钟以后达到 pH 8.38,当对硝基酚钠达到 69.6 毫克/升时,溶液中 pH 保持 7.5 不变(图 3)。将 pH 值依公式 $\text{pH} = \text{pK} + \log \alpha + \log \frac{\text{NaHCO}_3}{\text{CO}_2}$ 换算成藻类同化 CO_2 的绝对量列于表 3。从表 3 可以看出,反应 8 分钟以后栅藻同化 CO_2 的绝对量为 4.576 毫克/升,随着对硝基酚钠浓度的提高, CO_2 同化抑制作用增强,当浓度为 46.4 毫克/升时抑制了 39.89%,浓度达到 69.6 毫克/升时 CO_2 同化作用完全停止。

对硝基酚及其钠盐对栅藻光合放氧和 CO_2 同化速率影响的比较如图 4。通过作图法求出,当光合放氧和 CO_2 同化被抑制 50% 时的毒物浓度为半抑制浓度。光合放氧的半抑制浓度对硝基酚为 16 毫克/升;对硝基酚钠为 54.5 毫克/升。 CO_2 同化的半抑制浓度对硝基酚钠为 52.2 毫克/升。从图 4 可以看出对硝基酚钠抑制栅藻光合放氧和同化 CO_2 的速率十分近似,低浓度下抑制作用不甚明显,一旦浓度超过半抑制浓度后,表现出强烈的作用。

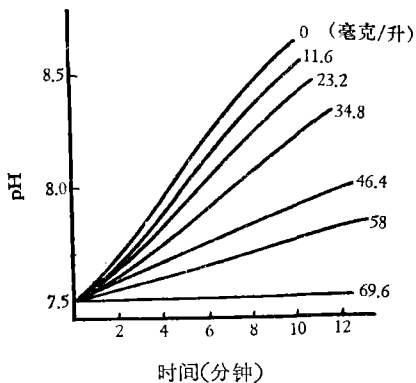
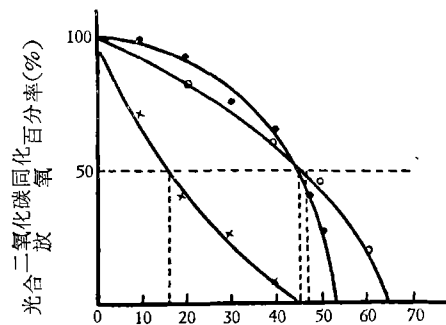


图3 不同浓度对硝基酚钠处理后栅藻液中 pH 变化曲线



对硝基酚浓度(毫克/升)对硝基酚钠 $\times 1.16$ (毫克/升)

图4 栅藻光合放氧、同化二氧化碳对硝基酚(钠)的半抑制浓度

- ×——对硝基酚对光合放氧抑制曲线
- 对硝基酚钠对光合放氧抑制曲线
- 对硝基酚钠对光合同化二氧化碳抑制曲线

2. 对硝基酚在模拟藻菌共生系统中的降解规律

在藻菌系统、单一栅藻和具备通气条件的单一 CTP-02 的培养液中,光照开始时分别

表 3 对硝基酚钠对栅藻 CO₂ 同化的影响 (反应时间 8 分钟)

对硝基酚钠浓度 (毫克/升)	反 应 前		反 应 后		同化 CO ₂ 量 (毫克/升)	同化 CO ₂ 速度 (毫克/克 干重/分)
	pH	CO ₂ 量 (毫克/升)	pH	CO ₂ 量 (毫克/升)		
0	7.5	5.28	8.38	0.704	4.576	0.915
11.6	7.5	5.28	8.29	0.814	4.460	0.892
23.2	7.5	5.28	8.18	1.1	4.180	0.836
34.8	7.5	5.28	8.03	1.9	3.380	0.676
46.4	7.5	5.28	7.82	2.53	2.750	0.550
58.0	7.5	5.28	7.68	4.05	1.130	0.226
69.6	7.5	5.28	7.50	5.28	0	0

加入 40 毫克/升对硝基酚钠,测定各组对硝基酚钠含量的变化(图 5)。从图 5 可看出,在 3.5 小时以后,藻菌系统和通气的单一细菌培养液中对硝基酚钠完全被分解了,并且降解速率十分一致。而单一藻类培养液中对硝基酚钠浓度没有变化。试验结束后分别测定各组的溶解氧,藻菌系统为 9.8 毫克/升、栅藻液为 9.8 毫克/升、菌液为 5.8 毫克/升。

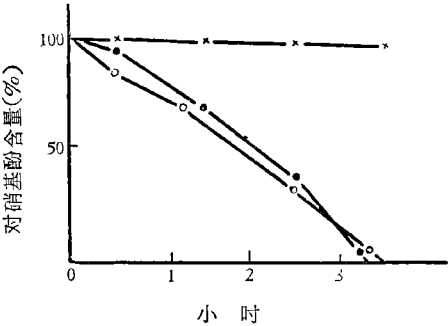


图 5 “藻”、“菌”、“藻加菌”系统中对硝基酚钠降解的比较
 ×——“藻”,对硝基酚钠 40 毫克/升。OD₅₅₀ = 0.45
 Δ——“藻加菌”,对硝基酚钠 40 毫克/升。
 o——“CTP-02 菌”,对硝基酚钠 40 毫克/升。OD₅₀₀ = 0.1

以上结果表明了对硝基酚钠在水介质中主要依靠好气性细菌的分解作用,藻类光合放氧代替通气供给细菌生长需要的氧气。因此藻菌系统中也表现出同样效果,而栅藻本身没有检出分解对硝基酚钠的能力。

在模拟藻菌系统中,当对硝基酚起始的浓度均为 40 毫克/升,而溶液中 pH 分别为 6.2 和 7.5 时,即开始进行对硝基酚和它的钠盐降解速度试验。pH 条件不同,对硝基酚的降解速率出现相当大的差异(图 6)。从图 6 可以看出,2.5 小时后 pH7.5 的处理组对硝基酚下降了 57%,3.5 小时后前者已降至零,后者只下降了 16%。在 pH 6.2 条件下是对硝基酚的形式存在,浓度在 40 毫克/升时完全抑制藻类的光合放氧,在开始 1.5 小时 after 对硝基酚略有降解,可能是由于藻菌系统中带进了少量氧气,一旦氧气被细菌用完又无法补充,细菌就丧失了降解能力。试验结束后测定各组的溶解氧,pH7.5 和 pH6.2 溶氧分别为 9.8 毫克/升和小于 1 毫克/升。这一结果进一步证明了对硝基酚降解主要依靠细菌的作用,但它的限制因子是氧气。

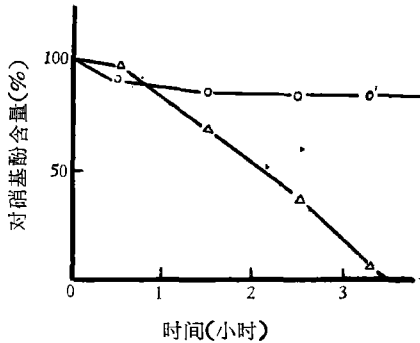


图6 pH对藻菌共生系统降解对硝基酚的影响

△ pH7.5 对硝基酚浓度为40毫克/升
○ pH6.2 对硝基酚浓度为40毫克/升

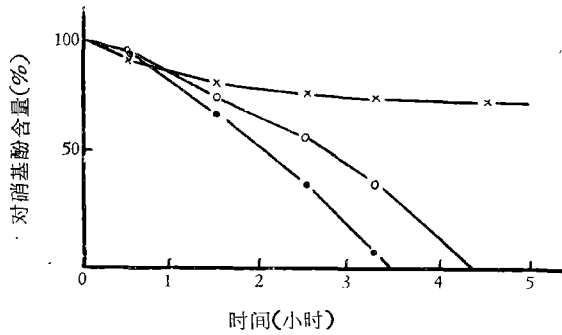


图7 对硝基酚浓度对藻菌系统降解对硝基酚的影响

×——60毫克/升对硝基酚藻菌系统
○——60毫克/升对硝基酚菌液曝气
●——40毫克/升对硝基酚藻菌系统

在模拟藻菌共生系统中,如果溶液 pH 均为 7.5,加入对硝基酚钠的起始浓度分别为 46.4 毫克/升和 69.6 毫克/升,显现出的降解速率也有很大的差异(图 7),从图 7 可以看出,光照 2.5 小时以后 46.4 毫克/升处理组已降至 15.39 毫克/升,而 69.6 毫克/升的一组降至 47.79 毫克/升,3.5 小时以后前者降至零,后者 4.5 小时后仍保持为 46.17 毫克/升。与单一细菌通气条件下,加 69.6 毫克/升对硝基酚钠培养作比较,在 4.5 小时后已完全被分解。这说明对硝基酚钠浓度达到 69.6 毫克/升时,藻类光合放氧十分微弱(表 2),以致对硝基酚分解菌不能正常生长,逐渐丧失降解能力。上述结果表明细菌和栅藻对对硝基酚都有一定的耐受能力,只要我们选择适当的浓度和适当的 pH 条件,是可以发挥藻菌共生系统中降解对硝基酚的最大潜力的。

参 考 文 献

- [1] 张甬元等,1980.氧化塘法净化有机农药废水机理研究.环境科学,(2): 8—13。
- [2] 张甬元等,1981.鸭儿湖地区环境质量控制和改造研究.环境污染与生态学文集.第 159—180 页.江苏科学技术出版社。
- [3] 黎尚豪等,1959.单细胞绿藻大量培养试验.水生生物学集刊,(4): 462—473。
- [4] Boush, G. M. and F. Matsumura, 1975. Pesticide degradation by marine algae. Office of Naval Research Contract, Task No. NR 306.
- [5] Charles, F. W. 1968. DDT reduces photosynthesis by marine phytoplankton. *Science*, 159, 1474—1475.
- [6] Ewald, W. G.; J. E. French and M. A. Champ, 1976. Toxicity of polychlorinated biphenyls (PCBs) to *Euglena gracilis*: cell population growth, carbon fixation, chlorophyll level, oxygen consumption and protein and nucleic acid synthesis. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 16(1): 71—80.
- [7] Ludwig, H. F.; W. J. Oswald; H. B. Gotaas and V. Lynch. 1951. Algae symbiosis in oxidation ponds I. Growth characteristics of *Euglena gracilis* cultured in sewage. *Sew. Ind. Wastes.*, 23, 1337—1341.
- [8] Oswald, W. J.; H. B. Gotaas; H. F. Ludwig and V. Lynch, 1953. Algae symbiosis in oxidation ponds. III. Photosynthetic oxygenation. *Sew. Ind. Wastes.*, 25, 692—697.

MECHANISM OF BIODEGRADATION OF ORGANOPHOSPHATE PESTICIDES IN AQUATIC ECOSYSTEM

3. EFFECT OF PARATHION AND ITS DEGRADATION PRODUCTS ON PHOTOSYNTHESIS OF *SCENEDESMUS OBLIQUUS* AND P-NITROPHENOL DEGRADATION IN ALGAE-BACTERIA SYSTEM

Tan Yuyun Zhang Yongyuan and Sun Meijuan

(*Institute of Hydrobiology, Academia Sinica*)

Abstract

The effect of parathion and its degradation products on photosynthesis of *Scenedesmus obliquus* was investigated. The toxicity of p-nitrophenol is much stronger than the sodium salts of nitrophenol, diethylthiophosphate and parathion. Studies of simulated algae-bacteria system of *Pseudomonas* sp. CTP-02 and *Scenedesmus obliquus*, using p-nitrophenol as substrate, indicate that oxygen needed for aerobic bacteria can be provided by photosynthesis of algae.