

厌氧消化中间产物毒性的研究

余 燚¹, 郑 平¹, 汪彩华¹, 陈婷婷¹, 黄 武²

(1.浙江大学环境工程系, 浙江 杭州 310029; 2.浙江省沼气太阳能科学研究所, 浙江 杭州 310012)

摘要:有关厌氧消化中间产物的毒性研究,特别是有关多种中间产物的联合毒性研究,迄今鲜见文献报道。采用发光细菌法测定了4种典型厌氧消化中间产物乙醇、乙酸、丙酸和丁酸的急性毒性(15 min-IC₅₀)。结果表明,乙醇、乙酸、丙酸和丁酸对发光杆菌的半抑制浓度 IC₅₀ 分别为 27.1、3.96、2.49 和 6.00 g·L⁻¹,其毒性大小顺序为:丙酸>乙酸>丁酸>乙醇。非解离态 VFA 是其主要抑制形态,非解离态乙酸、丙酸和丁酸的 IC₅₀ 值分别为 23.4、19 和 37 mg·L⁻¹,相当于汞 IC₅₀ 值的 234 倍、190 倍和 370 倍。4种厌氧消化中间产物对发光细菌的联合毒性作用方式皆为相加作用。研究结果为厌氧消化技术的调控和优化提供了理论依据。

关键词:发光细菌;单一毒性;联合毒性

中图分类号:X501 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2009)08-1651-04

Toxicity of Anaerobic Digestion Intermediates

YU Yi¹, ZHENG Ping¹, WANG Cai-hua¹, CHEN Ting-ting¹, HUANG Wu²

(1.Department of Environmental Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; 2.Research Center of Biogas and Solar Energy of Zhejiang Province, Hangzhou 310012, China)

Abstract: Few researches on individual toxicity of anaerobic digestion intermediates have so far been reported, let alone researches on their combined toxicity. Ethanol, acetate, propionate and butyrate are four typical intermediates in anaerobic digestion and their acute toxicity are determined with *Photobacterium phosphoreum*. The results showed that the IC₅₀ (half inhibition concentration for 15 min) values of ethanol, acetate, propionate and butyrate were 27.0, 3.96, 2.49 and 6.00 g·L⁻¹, respectively. The toxicity descended in the order of propionate, acetate, butyrate and ethanol. The inhibition of VFAs (volatile fatty acids) in their undissociated forms was stronger than that in their dissociated forms. The IC₅₀ values of undissociated acetic acid, propionic acid and butyric acid were 23.4, 19, 37 mg·L⁻¹, respectively, which were 234, 190, 370 times of the IC₅₀ values of standard toxicity reference substrate HgCl₂. The combined effects of ethanol and acetate, ethanol and propionate, ethanol and butyrate, acetate and propionate, acetate and butyrate, propionate and butyrate were all additive effects. The combined effects of the four anaerobic digestion intermediates were also additive effects. The achievement has laid a basis for control and optimization of anaerobic biotechnology.

Keywords: *Photobacterium phosphoreum*; single toxicity; combined toxicity

由于环境污染和能源短缺,自上世纪60年代末开始,厌氧消化技术受到人们青睐,并在环境工程上得到广泛应用^[1]。厌氧消化技术的功效综合反映了厌氧消化技术的现实水平,以容积有机负荷(Organic Loading Rate, OLR)作为功效指标,现有生产性厌氧消化技术的 OLR 一般为 5~10 kg COD·m⁻³·d⁻¹,有的

高达 20~40 kg COD·m⁻³·d⁻¹。现有实验室厌氧消化技术的 OLR 通常高于生产性厌氧消化技术,一般为 10~20 kg COD·m⁻³·d⁻¹,有的高达 86~306 kg COD·m⁻³·d⁻¹^[2-3]。Thiele 等^[4]以乙酸-丙酸-丁酸混合液作为基质,使生态工程高速厌氧消化系统的 OLR 达到了 700 kg COD·m⁻³·d⁻¹。

若以工程上已经达到的最高 OLR 水平作为标准,则可将 OLR ≥ 40 kg COD·m⁻³·d⁻¹ 的厌氧消化技术称为超高效厌氧消化技术。超高效厌氧消化技术为什么能够高效?探明其机理,有助于超高效厌氧消化技术的研发和应用。在厌氧消化过程中,醇类和挥发

收稿日期:2008-12-24

基金项目:国家 863 项目(2006AA06ZZ332);浙江省重大科技攻关项目(2005C13004)

作者简介:余 燚(1985—),男,湖北天门人,硕士研究生,研究方向为废水生物处理与资源化。E-mail:yuyuyiyi@gmail.com

通讯作者:郑 平 E-mail:pzheng@zju.edu.cn

性脂肪酸(Volatile Fatty Acid,VFA)是重要中间产物,它们或多或少对生物具有毒性^[5]。这些毒性中间产物是常规厌氧消化的限制因子吗?有关厌氧消化中间产物的毒性研究,特别是多种中间产物的联合毒性研究,迄今鲜见文献报道。本课题选择典型的厌氧消化中间产物,采用发光细菌法进行了毒性评价,以期为厌氧消化技术的调控和优化提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 仪器

DXY-2 型生物毒性测试仪,中科院南京土壤研究所;YXQ-SG41-280 型压力蒸汽灭菌锅,上海医用核子仪器厂;ZHWY-Z102C 型恒温摇床培养箱,上海智城仪器制造厂;85-2 型磁力搅拌器,杭州仪表电机厂;PHS-9V 型 pH 计,杭州华光无线电厂;Thermo 可调式移液器。

1.2 试剂

无水乙醇、乙酸、丙酸、正丁酸均为分析纯,购于上海国药集团化学试剂有限公司。

1.3 试验菌种

明亮发光杆菌 (*Photobacterium phosphoreum*) T₃ 变种,购自中国科学院南京土壤研究所。培养液及培养基配方参照吴淑杭的博士论文^[6]。菌液制备方法如下:将装有冻干粉的安培瓶置于 4℃ 冰箱内约 10~15 min,把冻干粉溶解于经灭菌的 0.5 mL 3% NaCl 溶液中,再迅速转入 50 mL 培养液中,20℃ 恒温培养,每 24 h 转接 1 次斜面,将培养好的第三代斜面置于 4℃ 冰箱中,作为菌种备用;菌种接入培养基平板上,20℃ 恒温培养 16~22 h 后,加入 5 mL 3% NaCl 至发光细菌平板中,适当振荡将菌体冲下,用漩涡振荡器将菌液混匀,浓度调节至合适范围,作为试验菌剂备用。

1.4 发光菌法毒性测定

1.4.1 单一毒物的毒性测定

根据预备试验结果,将待测毒物用 3% NaCl 配成 8 个浓度梯度。为排除 pH 对测定结果的影响,样品 pH 值控制到 7.0 左右^[7],混合均匀后取 2 mL 加入平底玻璃管中,以 2 mL 3% NaCl 溶液做空白对照,每个浓度梯度设 3 组重复。取 10 μL 试验菌剂于各玻璃管中,振荡混匀,15 min 后用生物毒性测试仪测定发光强度。每组浓度梯度设 3 个重复。通过空白对照发光度(相对发光单位 RLU 表示)的平均值 RLU₀ 和各浓度 3 组平行样发光度的平均值 RLU,计算毒物对发光菌的相对发光抑制率 X(%),即:

$$X(\%) = \left[1 - \frac{RLU}{RLU_0} \right] \times 100\% \quad (1)$$

用直线内插法求出相对发光强度为 50% 时所对应的化合物浓度,即为该种化合物对发光细菌的半数发光抑制浓度 IC₅₀。

1.4.2 多种毒物的联合毒性测定

根据测得的 4 种厌氧消化中间产物 IC₅₀,进行等效效应混合,配制 6 种二元混合物 A(乙醇+乙酸)、B(乙醇+丙酸)、C(乙醇+丁酸)、D(乙酸+丙酸)、E(乙酸+丁酸)、F(丙酸+丁酸)及 1 种四元混合物 G(乙醇+乙酸+丙酸+丁酸)。测定混合物对发光细菌的抑制强度。测定方法同 1.4.1 中单一毒物毒性测定法。每组浓度梯度设 3 个重复。

1.5 数据处理与分析方法

$$\text{发光度抑制率} = \left[1 - \frac{\text{平均样品发光强度}}{\text{平均空白发光强度}} \right] \times 100\%$$

利用 Originlab 7.5 和 SPSS 15.0 统计软件进行数据处理和统计分析。

2 结果

2.1 单一毒物的毒性效应

单一厌氧消化中间产物对明亮发光杆菌的急性毒性试验结果见图 1。由图 1 可知,中间产物对发光细菌发光强度的抑制率与其浓度呈正相关。对图 1 中的数据进行线性回归分析,所得的线性回归方程见表 1。由表 1 可知,发光细菌发光强度的抑制率与中间产物浓度有很好的相关关系,相关系数为 0.966 4~0.998 6。采用线性回归方程,求得乙醇、乙酸、丙酸和丁酸的 IC₅₀ 值分别为 27.1、3.96、2.49 和 6.00 g·L⁻¹,即 4 种厌氧消化中间产物的毒性相对大小为:丙酸(1.00)>乙

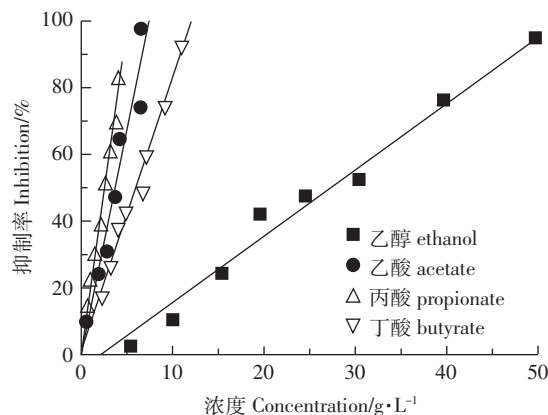


图 1 4 种中间产物对明亮发光杆菌的剂量-效应关系

Figure 1 Dose response relationships for 4 anaerobic digestion intermediates

表 1 单一毒物的急性毒性

Table 1 The acute toxicity of anaerobic digestion intermediate

中间产物	线性回归方程	相关系数	IC ₅₀ /g·L ⁻¹
乙醇	$Y=1.987X-3.89$	0.990 1	27.1
乙酸	$Y=12.261X+1.557$	0.966 4	3.96
丙酸	$Y=19.785X+0.807$	0.988 3	2.49
丁酸	$Y=8.129X+1.29$	0.998 6	6.00

酸(1.59)>丁酸(2.41)>乙醇(10.88)。由于未解离态 VFA 是其产生抑制作用的主要形态^[8-10],未解离乙酸、丙酸和丁酸的 IC₅₀ 值分别为 23.4、19 和 37 mg·L⁻¹,若以汞作为毒性评价标准,则未解离乙酸、丙酸和丁酸的 IC₅₀ 值分别相当于汞 IC₅₀ 值(0.1 mg·L⁻¹)的 234 倍、190 倍和 370 倍。

2.2 中间产物的联合毒性

7 种厌氧消化中间产物多元混合物对明亮发光杆菌的联合毒性结果见图 2(a 和 b)。由图 2 可知,多元混合物对发光细菌发光强度的抑制率与其浓度呈正相关。对图 2 中的数据进行线性回归分析,所得的线性回归方程见表 2。由表 2 可知,发光细菌发光强度的抑制率与混合物浓度有较好的相关关系,相关系

表 2 中间产物的联合毒性

Table 2 Combined toxicity of anaerobic digestion intermediates

二元混合物(质量浓度 比为其 IC ₅₀ 之比)	线性回归方程	相关系数	IC ₅₀ /g·L ⁻¹
A(乙醇+乙酸)	$Y=1.737X-3.16$	0.955 6	30.6
B(乙醇+丙酸)	$Y=1.853X+7.379$	0.947 8	23.0
C(乙醇+丁酸)	$Y=2.57X+5.231$	0.979 0	17.42
D(乙酸+丙酸)	$Y=7.71X-5.804$	0.961 0	7.24
E(乙酸+丁酸)	$Y=3.945X+6.606$	0.954 4	11.0
F(丙酸+丁酸)	$Y=5.769X+4.944$	0.961 6	7.81
G(乙醇+乙酸+丙酸+丁酸)	$Y=4.559X+4.956$	0.954 6	9.88

数为 0.947 8~0.979 0。

对多元混合体系,可采用以下计算法判定混合体系的联合作用^[1,11]:

$$\frac{1}{IC_{50(E)}} = \sum \frac{\chi_i}{IC_{50(i)}} \quad (i=1, 2, \dots, n) \quad (2)$$

式中: χ_i 为毒物 a、b、...、n 在混合物中所占的质量浓度比, $\sum \chi_i=1$; IC_{50(i)} 为毒物 a、b、...、n 在单一体系中的 IC₅₀; IC_{50(E)} 为多元混合物预期的 IC₅₀。

本实验对多元混合物采取等效效应混合,即按照单一毒物的 IC₅₀ 之比混合,故有:

$$\chi_a = \frac{IC_{50(a)}}{IC_{50(a)} + IC_{50(b)} + \dots + IC_{50(n)}} \quad (3)$$

根据表 1 中单一毒物的 IC₅₀ 和式 3,可计算出多元混合物的 IC_{50(E)},再按下式计算 R 值。

$$R = \frac{IC_{50(E)}}{IC_{50}} \quad (4)$$

式中:IC₅₀ 为实测混合物对发光细菌的半数发光抑制浓度。

根据 R 值,可以判定混合体系的联合作用类型:若 $R < 0.4$,则判为拮抗作用;若 $R > 2.5$,则判为协同作用;若 $0.4 < R < 2.5$,则判为相加作用。

根据计算,6 种二元混合物的 R 值分别为 0.507、0.641、0.947、0.449、0.455、0.544,因此判定 4 种厌氧消化中间产物两两联合作用类型皆为相加作用;四元混合物的 R 值为 0.736,4 种中间产物的联合作用类型也为相加作用。

3 讨论

3.1 单一毒物的毒性机理

对厌氧消化中间产物的研究大多集中于抑制动力学方面^[8,10],而对其毒理学方面的研究较少。据报道,乙醇、乙酸、丙酸和丁酸对叶绿素 a 的半抑制浓度

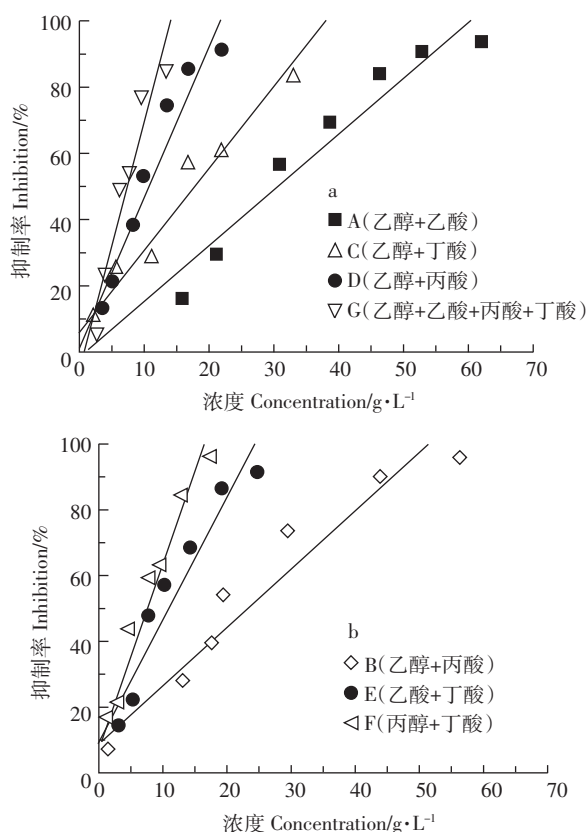


图 2 7 种多元中间产物混合物的联合毒性

Figure 2 Combined toxicity of 7 multicomponent mixtures of anaerobic digestion intermediates

IC₅₀ 分别为 27、0.35、0.25 和 0.34 g·L⁻¹[12],其毒性趋势与本试验结果一致。Blum 和 Speece^[13]研究发现,有机毒物对产甲烷菌的 IC₅₀ 值和对 Microtox(一种商用发光细菌)的 IC₅₀ 值之间有良好的线性关系(相关系数 0.905 6),表明用发光细菌法评价中间产物对厌氧污泥的毒害效应是可行的。

乙醇和 VFA 的 IC₅₀ 相差十多倍,这与其作用机理不同有关:乙醇通过溶解细胞膜上的脂质而改变膜的通透性^[11],VFA 则通过瓦解膜内外质子梯度而导致 ATP 合成受损^[8-9]。3 种 VFA 的毒性与其 pKa 值有关。在水溶液中,一元酸(HA)存在如下平衡:

$$\text{HA} = \text{A}^- + \text{H}^+ \quad K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]_w}{[\text{HA}]_w} \quad (5)$$

$$\frac{[\text{HA}]_w}{[\text{HA}]_r} = \frac{[\text{HA}]_w}{[\text{HA}]_w + [\text{A}^-]_w} = \frac{1}{1 + K_a/[\text{H}^+]} = \frac{1}{1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_a}} \quad (6)$$

在 20 ℃时,乙酸、丙酸和丁酸的 pKa 值分别为 4.75、4.87、4.81^[14],在 pH 为 7.0 时,浓度同样为 5 000 mg·L⁻¹ 的乙酸、丙酸和丁酸其未解离态分别为 27、38 和 33 mg·L⁻¹。可见相同条件下,丙酸的毒性最大。

3.2 中间产物的联合毒性机理

当毒物的结构相似、性质相近、靶器官相同或作用机理相同时,其生物学效应往往呈相加作用。VFA 间联合作用之所以呈现相加作用,是因为它们的结构相似并且作用机理相同。在中温厌氧消化中,VFA 允许浓度为 2 000 mg·L⁻¹ 左右^[1]。

4 结论

(1)对 4 种典型厌氧消化中间产物的单独毒性试验发现,乙醇、乙酸、丙酸和丁酸对发光杆菌的 IC₅₀ 值分别为 27.1、3.96、2.49 和 6.00 g·L⁻¹,毒性大小依次为:丙酸>乙酸>丁酸>乙醇。非解离态 VFA 是其主要抑制形态,非解离态乙酸、丙酸和丁酸的 IC₅₀ 值分别相当于汞 IC₅₀ 值的 234 倍、190 倍和 370 倍。

(2)对 4 种典型厌氧消化中间产物的联合毒性试验发现,二元等效毒性混合物的 R 值分别为 0.507、0.641、0.947、0.449、0.455、0.544,4 种厌氧消化中间产物的两两联合作用类型为相加作用。四元等效毒性混合物的 R 值为 0.736,4 种中间产物的联合作用类型也为相加作用。

参考文献:

[1] 郑 平,冯孝善.厌氧生物处理[M].北京:高等教育出版社,2006:

190-360.

ZHENG Ping, FENG Xiao-shan. Biotechnology for wastes treatment[M]. Beijing: Higher Education Press, 2006: 190-360.

[2] Ren N Q, Chua H, Chan S Y, et al. Assessing optimal fermentation type for bio-hydrogen production in continuous-flow acidogenic reactors[J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98(9): 1774-1780.

[3] 陈建伟,唐崇俭,郑 平,等.实验室模拟高负荷 SPAC 厌氧反应器运行[J].生物工程学报,2008,25(6):1413-1419.

CHEN Jian-wei, TANG Chong-jian, ZHENG Ping, et al. Performance of lab-scale SPAC anaerobic bioreactor with high loading rate[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2008, 25(6): 1413-1419.

[4] Thiele J H, Wu Weimin, Jain M K, et al. Ecoengineering high rate anaerobic digestion systems: Analysis of improved syntrophic biomethanation catalysts[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1990, 35(10): 990-999.

[5] Ye Chen, Jay J Cheng, Kurt S Creamer. Inhibition of anaerobic digestion process: A review[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99: 4044-4064.

[6] 吴淑杭.发光细菌法快速检测农产品中主要污染物联合毒性技术研究[D].上海:华东师范大学,2007:5-20.

WU Shu-hang. The rapid detection technology for assessing integrated biotoxicity of agricultural products' pollutants using luminescent bacteria[D]. Shanghai: East China Normal University, 2007: 5-20.

[7] GB/T 15441—1995,水质急性毒性的测定发光细菌法[S].

[8] Jordening H J, Mosche M. Comparison of different models of substrate and product inhibition in anaerobic digestion[J]. *Water Research*, 1999, 33(11): 2545-2554.

[9] 赵学明,白冬梅译.代谢工程—原理与方法[M].北京:化学工业出版社,2003:15-45.

ZHAO Xue-ming, BAI Dong-mei. Metabolic engineering—principles and methodologies[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2003: 15-45.

[10] Alastair J Ward, Phil J Hobbs, Peter J Holliman, et al. Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99: 7928-7940.

[11] 孟紫强.环境毒理学基础[M].北京:高等教育出版社,2003:43-82. MENG Zi-qiang. Environmental toxicology[M]. Beijing: Higher Education Press, 2003: 43-82.

[12] 张自杰,张忠祥,龙腾锐,等.废水处理理论与设计[M].北京:中国建筑工业出版社,2003:740-890.

ZHANG Zi-jie, ZHANG Zhong-xiang, LONG Teng-rui, et al. Theory and design of wastewater treatment[M]. Beijing: China Building Industry Press, 2003: 740-890.

[13] Blum G JW, Speece R E. A database of chemical toxicity to environmental bacteria and its use in interspecies comparisons and correlation [J]. *Research Journal of the Water Pollution Control Federation*, 1991, 63: 198-207.

[14] 汪小兰.有机化学[M].北京:高等教育出版社,1997:102-153.

WANG Xiao-lan. Organic chemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 1997: 102-153.