

利用成组生物测试评估不同深度处理工艺出水的安全性

陈盈盈^{1,2}, 马梅^{1*}, 赛道建², 王子健¹

(1. 中国科学院生态环境研究中心环境水质学国家重点实验室, 北京 100085; 2. 山东师范大学生命科学学院, 济南 250014)

摘要: 针对北京北小河污水处理厂出水经深度处理后回用于奥运公园的生态安全性, 用成组生物毒性测试方法比较了不同深度处理工艺对导致急性毒性的物质、内分泌干扰物质和 Ah 受体效应物质的去除效果。结果表明: 城市污水厂出水中含有急性毒性、内分泌干扰和 Ah 受体效应毒性特征的污染物, 超滤和活性炭对不同物质均有较好的去除效果。活性炭吸附能基本有效去除具有急性毒性污染物, 对 Ah 受体特征物质的去除率达到了 98%; 超滤对非极性、具有急性毒性特征的物质和极性的类雌激素物质去除效果最好, 经超滤处理后的出水非极性组分细胞存活率达 100%, 极性组分雌激素当量由 $0.13 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 下降到 $0.04 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。微滤和反渗透工艺不能有效去除有毒有机污染物。进行生物毒性测试时, 不同组分之间可能存在相互作用, 需要采用样品分级方法。

关键词: 水回用; 深度处理; 生物测试; 生态风险

中图分类号: X826 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2005)01-0100-04

Assessing the Ecological Risk of Effluents from Different Advanced Treatment Units by Using a Battery of Bioassay

CHEN Ying-ying^{1,2}, MA Mei¹, SAI Dao-jian², WANG Zi-jian¹

(1. State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Beijing 100085, China; 2. College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, China)

Abstract: In this paper, effluents from different advanced treatment units, which were reclaimed for Olympic Park, were assessed regarding to the removal efficiencies of the technologies on acute toxicants, Ah-receptor chemicals and estrogenic substances by using a battery of bioassays. The results showed that advanced treatments using ultra-filtration and activated carbon absorption were suitable for removal of toxic organic substances from STP effluent. Activated carbon absorption was the most effective technology to remove acute toxicants and Ah-receptor chemicals, and the removal efficiency of Ah-receptor chemicals reached 98%. Ultra-filtration was suitable for removing nonpolar acute toxicants and polar estrogenic chemicals. Nonpolar fraction extracted from water after ultra-filtration treatment showed 100% percentage survival of cell in the acute toxic assay. E2-TEQ was reduced from $0.13 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ to $0.04 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ in the polar fraction extracted from water after ultra-filtration. Treatments with micro-filtration and osmosis did not manifest sufficient efficiencies for removal of toxic organic substances. In complex matrix, interactions may occur among different toxic components to interfere the bioassay results. Therefore fractionation of organic concentrate before bioassay is necessary.

Key words: wastewater reclamation; advanced treatment technology; bioassay; ecological risk assessment

解决水资源短缺矛盾的一个重要出路是城市污水处理厂出水的再生利用^[1]。目前对于各种深度处理工艺的监测还仅限于有限的化学浓度指标。由于有毒污染物数目多、含量低, 不可能对每一种污染物逐个进行化学分析, 因此采用生物毒性测试作为化学分析的补充手段是评价处理工艺的一个新的方案。目前国外已有应用生物毒性测试进行水处理工艺评估的方案, 以美国环保局的“全水毒性测试(WET)”为例^[2]。该方法利用藻、溞和鱼作为实验材料, 对废水处理厂出水进行慢性毒性实验, 通过对半数致死浓度、无影响浓度测定; 鱼类胚胎幼鱼的存活、致畸、致死; 藻类的生长、繁殖实验指标测定来预测有毒排放物质对纳污水体的生态影响。

采用基于细胞培养的生物标记物方法评估水处理工艺效果相比于藻类鱼类等的生长繁殖试验具有费用低廉、节省时间、灵敏度高的优点, 因此具有推广应用的前景。目前国内外有关研究较少。结合应用样品富集和分级方法, 毒性测试可以作为昂贵仪器分析的前期诊断。例如, 发光菌测试方法已经大量应用于水体污染评价^[3], 在给水处理行业目前使用较多的 Ames 测试, 可以用来判断是否存在具有三致效应的物质^[4]。将不同类型生物毒性测试组合在一起, 则

收稿日期: 2004-02-03; 修订日期: 2004-03-16

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(2001 AA6406010); 国家自然科学基金资助项目(2033720)

作者简介: 陈盈盈(1979~), 女, 江苏人, 硕士研究生, 主要从事环境毒理学研究

* 通讯联系人: mamei@mail.rcees.ac.cn

可以形成判断潜在生态和健康影响的测试方法体系.

本文围绕奥运公园补水方案,应用成组生物毒性测试方法,对北京北小河污水处理厂中试规模出水经超滤、反渗透、微滤和活性炭吸附等工艺组合处理后出水的急性毒性物质、Ah 受体效应物质及类雌激素物质的去除效果和规律进行了研究,探讨了目前广泛采用的深度处理技术对不同极性、不同类型有毒有机物质的去除效果.

1 材料和方法

1.1 样品的采集和处理

2003 年 7 月在北京北小河污水处理厂采集了进水、出水和不同深度处理工艺出水水样,包括:总进水;二沉出水;二沉出水经超滤后的出水;二沉出水经超滤;再经反渗透的工艺出水;二沉出水经微滤后的出水;二沉出水经活性炭过滤后的出水.按照美国环保局污水和废水采样规范,所采集的样品都是连续 24h 采集的混合样,运回实验室后经 $0.7\mu\text{m}$ 玻璃纤维滤膜 (APFF, MILLIPORE, USA) 过滤,将有机污染物富集在 HLB 柱 (6 mL , 500 mg , OASIS, Waters, USA) 上.富集在柱上的有机物用 10 mL 二氯甲烷 (HPLC Grade, Fisher, USA) 洗脱 3 次,合并洗脱液高纯氮吹至 1 mL ,转移 0.5 mL 氮气吹干后用 0.5 mL DMSO (ACS Grade, AMRESCO, USA) 溶解, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存用于总提取物的生物测试.

剩余的 0.5 mL 洗脱液加载在 10 g 硅胶 ($60\sim 200\mu\text{m}$, 60 A , ultrapure, ACROS ORGANICS) 和 10 g Al_2O_3 ($50\sim 200\text{ Micron}$, ACROS ORGANICS) 的混合柱上,先用 15 mL 正己烷 (HPLC Grade, Fisher, USA) 洗脱获得非极性有机物组分,再用 70 mL 7:3 的正己烷 (HPLC Grade, Fisher, USA): 二氯甲烷 (HPLC Grade, Fisher, USA) 混合液洗脱获得弱极性有机组分,最后用 30 mL 甲醇 (HPLC Grade, Fisher, USA) 洗脱得到极性有机组分.以上 3 组分别用高纯氮气吹干后用 0.2 mL DMSO 溶解, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存用于分级组分的生物毒性测试.

1.2 生物毒性测试方法

水中有机有毒物质导致的急性毒性通过细胞中性红实验测试,试验采用的人乳腺癌细胞 (MCF-7) 由北京师范大学生物系提供,试验方法参考文献 [5],测试结果以细胞相对存活率表示.

Ah 受体效应物质由 EROD 酶活性方法测定.试验采用的鼠肝癌细胞 (H4IIE) 由中国科学院水生

所提供,测试方法参考文献 [6] 以 96 孔板进行:从 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24h 的细胞中取出培养液,加入样品或对照 $100\mu\text{L}$ 混合均匀, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养暴露 72 h 后将溶液吸出,加入 $100\mu\text{L}$ 新鲜的含 $1\mu\text{L}$ ERF ($1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 $0.1\mu\text{L}$ 双香豆素 ($10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的培养液,继续培养 60 min , $3\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min ,加入 $130\mu\text{L}$ 乙醇终止反应.混匀后取出 $100\mu\text{L}$ 于酶标仪上测 RF 的荧光强度 (激发波长为 535 nm , 吸收波长为 590 nm).将培养板中剩余的反应液吸出,加入 $120\mu\text{L}$ $0.3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 破碎细胞 10 min ,吸出 $100\mu\text{L}$ 介质,加入 G250 染色液 $200\mu\text{L}$ 反应 10 min ,在 595 nm 测蛋白含量.每板设溶剂对照 (DMSO) 和阳性对照 2,3,7,8-四氯代二噁英 (2,3,7,8-TCDD),结果以酶活性表示 [$\mu\text{mol}\cdot(\text{min}\cdot\text{mg})^{-1}$].

对水中类雌激素物质的测试采用重组基因酵母增殖实验.本工作中使用的重组基因酵母由英国 Brunel 大学 Sumpter 教授提供,是将雌激素受体 (hER) 的 DNA 序列稳定地整合到含有 lac-Z 表达基因的质粒 (编码 β -半乳糖苷酶) 的酵母主要染色体上,可间接测定能与雌激素受体 (hER) 发生缔合的所有化学品的雌激素活性.实验中将 $50\sim 100\mu\text{L}$ 新鲜冻融的重组基因酵母菌株接种到 10 mL 补充 CuSO_4 的 SC 培养液中,振荡培养 20 h ($130\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 温度 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$).用 SC 培养液将菌液稀释到所需密度 (600 nm 下吸光度为 0.25) 后用于检测.本文采用的测试方法参考了文献 [7],改用 96 孔板进行,每板设溶剂对照 (DMSO) 和阳性对照 (17β -雌二醇, E2),样品中内分泌干扰物的浓度换算成 E2 当量.

β -半乳糖苷酶的活性 U 的计算:

$$U = 1000 \frac{(\text{OD}_{420} - \text{OD}'_{420})}{(t \times V \times \text{OD}_{600})}$$

式中: t 为酶反应时间 (min), V 为测定时培养细胞的体积 (0.2 mL); OD_{420} 为样品在 420 nm 的吸光度; OD'_{420} 为空白在 420 nm 的吸光度; OD_{600} 为样品在 600 nm 的吸光度.

剂量-效应曲线由以下含 4 个参数的函数方程用最小二乘法进行拟合.由方程可以计算出 EC_{50} :

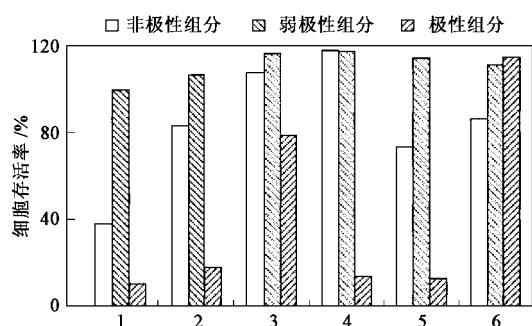
$$y = \frac{A - D}{1 + (c/x)^B} + D$$

式中: y 为 β -半乳糖苷酶活性; x 为雌激素类化合物浓度; A 为最大 β -半乳糖苷酶酶活; B 为回归曲线中点的斜率; c 为半数最大 β -半乳糖苷酶酶活时样品的浓度; D 为本底 β -半乳糖苷酶酶活.

2 结果与讨论

2.1 不同处理工艺对具有急性毒性特征有机污染物的去除效果

各处理段样品分级组分的急性细胞毒性检测结果显示(图1),总进水中非极性组分和极性组分存在明显的急性细胞毒性,而弱极性组分未显示急性毒性.极性组分急性毒性最强,细胞存活率仅10%.在本文提出的分组中,非极性有机物主要包括正构烷烃、多氯代联苯等;弱极性有机污染物主要包括多环芳烃、有机氯农药等;极性有机物组分主要包括取代苯、酚和有机酸等^[8].不同处理工艺组合对不同类型的急性毒性物质的去除效果明显不同,二沉出水中非极性组分和极性组分的急性毒性得到一定程度的去除,2组分中的细胞存活率均升高了1倍左右.再经超滤处理后,非极性组分存活率达到了100%,仅在极性组分显示弱的急性毒性,细胞存活率达到80%.但如果采用超滤-反渗透组合工艺处理,极性组分的急性毒性有明显升高,细胞存活率低于20%,表明反渗过程中有可能引入新的具有急性毒性特征的物质,其原因有待进一步探讨.二沉出水经微滤处理,对非极性组分中的急性毒性物质有一定的去除效果,但对极性组分中的急性毒性物质几乎没有处理效果.二沉出水经活性炭处理后,非极性组分的细胞存活率有明显升高,极性组分中急性毒性物质得到完全去除.



1. 总进水 2. 二沉出水 3. 二沉出水 + 超滤 4. 二沉出水 + 超滤 + 反渗透 5. 二沉出水 + 微滤 6. 二沉出水 + 活性炭

图1 污水处理厂进、出水及不同深度处理工艺出水急性细胞毒性检验效果

Fig.1 Acute toxicity assessment of the samples from different advanced treatment units

从以上结果可以看出,北小河污水处理厂总进水中存在明显的具有急性细胞毒性特征的污染物质,且主要存在于极性组分和非极性组分中,前者可能是未完全降解的有机中间体,如取代苯、酚和有机

酸,后者是生物处理难以去除的持久性有毒物质.基于活性污泥的处理工艺(二沉出水)对急性毒性物质,特别是非极性、且具有急性毒性特征的物质有一定的去除效果,比较4种不同的深度处理工艺可以看出,超滤对非极性、且具有急性毒性特征物质的去除效果最好,活性炭处理对极性、具有急性毒性物质的去除效果最好,而微滤效果不明显,反渗透则引入了急性毒性物质.

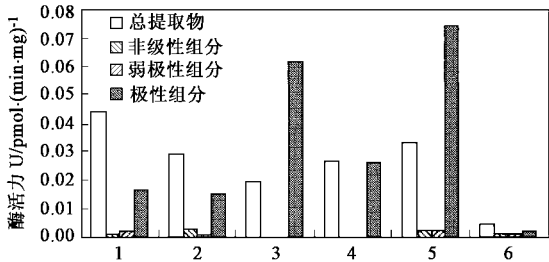
2.2 不同处理工艺对具有 Ah 受体效应有机污染物的去除效果

图2是各处理段出水总提取物和不同组分采用 EROD 测试的结果.北小河污水处理厂总进水的总提取物中能够检测到较强的 Ah 受体效应,酶活力达 $0.044 \text{ pmol} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg})^{-1}$.这一酶活性相当于 TCDD 当量为 $146 \text{ pg} \cdot \text{L}^{-1}$ 引起的效应,主要是由极性组分引起.具有 Ah 受体效应的有毒有机污染物通常是非极性(多氯代联苯、二噁英等)和弱极性的有机污染物(多环芳烃、有机氯农药等)^[9],结果显示这2组分的 EROD 酶活性均在检测限以下,有的甚至未检出.但是硝基芳烃等苯系物同样可以导致 EROD 酶活性增加,尽管其强度要低得多^[10].本工作中观察到的极性组分有明显的 Ah 受体效应可能由于非平面结构特征化合物引起,虽然这类化合物对 P450 酶的应激能力相对较低,却由于浓度较高而表现出较强的酶活性.经过生物处理后,Ah 受体效应并没有得到明显改善,可能是由于生物处理一方面去除了部分原水中具有 Ah 受体特征的有机物,如非极性组分和弱极性组分中的 Ah 受体特征物质,另一方面则有新的 Ah 受体特征污染物形成^[11].

比较不同处理工艺对总提取物的 Ah 受体效应物质的去除效果,可以看出反渗透和微滤的效果均不明显.超滤和反渗透联合工艺处理后 EROD 酶活性反而上升,和急性毒性变化规律类似.考虑到膜的材料为芳香族聚酰胺,不排除引入或产生了新的具有 Ah 受体效应的有毒有机物的可能性.活性炭处理能将大部分 Ah 受体特征物质去除,处理后酶活降低到 $0.005 \text{ pmol} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg})^{-1}$,仅相对于 TCDD 当量 $3.5 \text{ pg} \cdot \text{L}^{-1}$,对 Ah 受体特征物质的去除率达到了98%.比较该工艺去除急性毒性物质的效果,表明大部分有机污染物被活性炭吸附去除.

2.3 不同处理工艺对具有雌激素效应有机污染物的去除效果

重组基因酵母增殖试验结果表明(图3),所有水样对雌激素效应测试均呈阳性反应.总进水中包

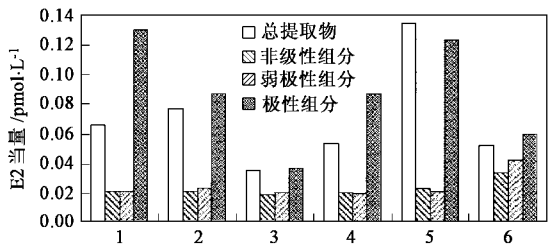


1. 总进水 2. 二沉出水 3. 二沉出水 + 超滤 4. 二沉出水 + 超滤 + 反渗透 5. 二沉出水 + 微滤 6. 二沉出水 + 活性炭

图2 污水处理厂进、出水及不同深度处理工艺出水 EROD测试结果

Fig.2 EROD assay of the samples form different advanced treatment units

含了大量的类雌激素物质,主要存在于极性组分中,按照 17β -雌二醇换算的雌激素当量为 $0.13 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。污水厂的生物处理工艺中,非极性和弱极性组分的类雌激素物质浓度基本没有变化,而极性组分的类雌激素效应降低了 $1/3$ 。经过超滤处理后,极性组分的雌激素效应明显降低,达到 $0.04 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。但是在超滤-反渗透联合工艺处理后,极性组分的类雌激素效应反而升高了 1 倍,表明反渗透工艺有可能引入了新的极性有毒物质,和其他生物毒性测试的规律基本相同。活性炭处理工艺可以将雌激素效应物质降低到 $0.06 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$,微滤工艺对类雌激素物质没有明显的去除效果。



1. 总进水 2. 二沉出水 3. 二沉出水 + 超滤 4. 二沉出水 + 超滤 + 反渗透 5. 二沉出水 + 微滤 6. 二沉出水 + 活性炭

图3 污水处理厂进、出水及不同深度处理工艺出水雌激素效应测试结果

Fig.3 Estrogen test result of the samples from different advanced treatment units

已知的环境内分泌干扰物包括非极性的二噁英、呋喃和多氯联苯,弱极性的有机氯农药以及极性的有机磷农药、氨基甲酸酯类农药和烷基酚等。本工作所评价的污水处理厂和后续深度处理工艺对前2类类激素物质的去除效果不明显。

同时注意到,对总提取物测试所观察到的效应水平低于3个组分分别测试观察到的雌激素效应加

和值,表明不同性质的雌激素物质在复合污染体系中存在相互拮抗作用。该结果说明生物毒性测试中应该采用样品分级方法,以避免出现假阳性或假阴性的结果。

3 结论

本文提出用成组生物毒性测试方法评价水处理工艺对不同类型有毒有机污染物的去除效果,并通过北京市北小河污水处理厂进、出水,以及经过不同深度处理工艺技术后回用于奥运公园的生态风险评价,讨论了技术适用性。研究认为北小河污水处理厂进水中存在明显的具有急性细胞毒性、Ah受体效应和雌激素效应的物质,且主要存在于极性组分中。水厂生物处理工艺对急性毒性物质,特别是非极性急性毒性物质和类二噁英物质有一定的去除效果,对类雌激素物质去除效果不好。对出厂水进行4种不同工艺深度处理,微滤和反渗透工艺不能有效去除有毒有机污染物,超滤和活性炭对不同物质均有较好的去除效果。其中,超滤对非极性、具有急性毒性特征的物质和类雌激素物质去除效果最好,活性炭处理对极性、具有急性毒性特征的物质和Ah受体效应物质的去除效果最好。同时提出,对复合污染体系进行生物毒性测试,不同组分之间可能存在相互作用,需要采用样品分级方法。

参考文献:

[1] 石淑倩,姜志凯,翟海霞.我国城市污水回用现状及前景[J].环境技术,2002,(2):35~38.
[2] U.S.EPA(EPA-821-R-02-013).Short-term Methods for Estimation the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms[R].Fourth Edition,October 2002.
[3] 马梅,王毅,王子健.天然水体有毒有机污染物毒性监测的样品前处理方法研究[J].环境科学,1999,20(6):80~83.
[4] Ma Mei,Wang Zijian,Shang Wei,Wang Chunxia,Wang Wenhua.Mutagenicity and acute toxicity of waters from different treatment processes in Beijing waterworks[J].Environmental and Science and Health,2003,35(10):88~96.
[5] Isabelle Valentin,Murielle Philippe,Jean-Claude Lhuguenot,et al.Uridine uptake inhibition as a cytotoxicity test for a human hepatoma cell line(HepG2 cells):comparison with the neutral red assay[J].Toxicology,2001,158:127~139.
[6] Wang Chunxia,Wang Yi,Kiefer F,Yediler A,et al.Ecotoxicological and chemical characterization of selected treatment process effluences of municipal sewage treatment plant[J].Ecotoxicology and Environmental Safety,2003,56:211~217.
[7] Routledge E J,Sumpter J P.Estrogenic activity of Surfactants and Some of Their Degradation Products Assessed Using a Recombinant Yeast Screen[J].Environmental Toxicology and Chemistry,1996,15(3):241~248.
[8] Wang Yi,Wang Zijian,Ma Mei,Wang Chunxia,Mo Zheng.Monitoring priority pollutants in a sewage treatment process by dichloromethane extraction and triolein-semipermeable membrane device(SPMMD)[J].Chemosphere,2001,43:339~346.
[9] 沈蕾,林国芳,沈建华.Ah受体及其多态性问题[J].癌变·畸变·突变,1999,11(1):57~59.
[10] 王咏,王春霞,王子健,徐静波[J].硝基芳烃对鲤鱼肝微粒体EROD的体外诱导[J].环境科学,2001,22(4):111~113.
[11] 马梅,王毅,王子健.城市污水生物处理过程中有毒有机污染物浓度及毒性变化的规律[J].工业水处理,1999,19(6):9~12.