

利用化学分析和生物测试方法比较研究污染土壤中芳烃受体效应物质的积累

禹果¹, 吴文勇², 刘洪禄², 肖睿洋¹, 王春霞^{1*}, 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. 北京市水利科学研究所, 北京 100044)

摘要:长期使用污水或再生水灌溉的潜在生态风险已经引起普遍关注,但是少有研究持久性有机有毒物质在土壤中积累所产生的慢性毒性.采用 7-乙氧基-异吩噻唑酮-脱乙酰基酶(EROD)方法测试了北京郊区某再生水灌溉土壤中的芳烃受体效应物质,并用 2,3,7,8-TCDD 标定出相应的二噁英毒性当量(TEQ_{bio}).同时利用化学分析得到的土壤中 16 种多环芳烃(PAHs)的含量,根据文献报道毒性当量因子(TEF)换算成二噁英的毒性当量(TEQ_{PAHs}).分析生物测试的结果,发现灌溉土壤中芳烃受体效应物质的毒性当量浓度最高达 97.4 ng/kg,明显高于地下水灌溉背景土壤(56.0 ng/kg).通过化学分析和计算得到的 TEQ_{PAHs}所占 TEQ_{bio}的比重则由背景土壤的 10.3% 增加到 78.6%.因此,再生水灌溉导致芳烃受体效应物质在土壤中累积,其中相当一部分是由于 16 种优先控制 PAHs 在土壤中累积引起.

关键词:污染土壤; EROD 生物测试; 多环芳烃; 毒性当量

中图分类号: X131.3; X833 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3301(2006)09-1820-05

Comparative Study on Accumulation of Ah-Receptor Agonists in Contaminated Soil Based on EROD Bioassay and Chemical Analysis

YU Guo¹, WU Wen-yong², LIU Hong-lu², XIAO Rui-yang¹, WANG Chun-xia¹, WANG Zi-jian¹

(1. State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China; 2. Beijing Hydraulic Research Institute, Beijing 100044, China)

Abstract: The potential ecological risk by wastewater or reclaimed water for irrigation is of great concerns in recent years, but little work was done on the chronic toxicities through long term accumulation of persistent organic chemicals in soil. In present work, concentration of Ah-receptor agonists in soil organic extract was measured by an ethoxyresorfin *O*-deethylase (EROD) bioassay, which was calibrated and expressed by the 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (2,3,7,8-TCDD) toxic equivalent (TEQ_{bio}). Simultaneously, 16 PAHs in soil were analyzed and their TEQs (total as TEQ_{PAHs}) were calculated according to their toxic equivalent factors (TEFs) cited from literature. By bioassay, it was found that the concentration level of Ah-receptor agonists in soil irrigated using reclaimed water could be as high as 97.4 ng/kg, which was obviously higher than that in background soil using ground water irrigation regime (56.0 ng/kg). In comparing the results from bioassay and chemical analysis, the percentage of TEQ_{PAHs} in TEQ_{bio} increased from 10.3% in background soil to 78.6% in the soil irrigated by reclaimed water. Use of reclaimed water for irrigation could result in the accumulation of Ah-receptor agonists in soil, and a major part of them in this case could be attributed to the accumulation of 16 priority PAHs in soils.

Key words: contaminated soil; EROD bioassay; PAHs; TEQ

由于我国水资源短缺问题突出,在北方地区普遍采用污水灌溉解决农田需水问题,近年来则逐步采用再生水灌溉.然而,污水处理厂二级出水中仍然含有大量持久性有毒物质^[1],会随着灌溉进入土壤,产生积累^[2].其中在生物体内能够诱导 P450 1A 家族酶活性的芳烃受体效应物质^[3]大多具有致癌、致畸和致突变性,是优先控制的重点.已经发现具有显著芳烃受体效应的物质包括共平面二噁英、呋喃、多氯联苯和多环芳烃,评价污染土壤中这类持久性慢性毒性物质的方法主要依赖化学分析.

生物体内特征酶活性的变化可以作为外源污染物作用下的生物标记物,用来诊断环境污染状况.其

中,离体 EROD 测试中酶活性的变化反映了环境样品中芳烃受体效应物质的浓度水平^[3,4]. EROD 测试已经广泛用于原油污染、工业废水和城市污水等环境样品中类二噁英物质^[3~5].但是针对污水或再生水灌溉土壤中芳烃受体效应物质的累积,并因此产生的生态健康风险研究则十分少见.

本文结合了 EROD 测试方法以及化学分析方

收稿日期:2005-09-30;修订日期:2005-11-04

基金项目:北京市科技计划项目(H030730040330);国家自然科学基金项目(40471129)

作者简介:禹果(1980~),男,硕士研究生,主要研究方向为污水及再生水灌溉土壤生态毒理学, E-mail: yuguodaxia@126.com

* 通讯联系人, E-mail: cxwang@mail.nsf.gov.cn

法,将化学分析所得到的不同浓度的一类物质(PAHs)用其毒性当量因子(TEF)折算成单一化合物(2,3,7,8-TCDD)浓度,并将此结果与经 EROD 测试得到的 2,3,7,8-TCDD 浓度进行比较.通过毒性当量化处理,对再生水灌溉土壤中引起芳烃受体效应的主要物质进行了甄别与确认.

1 材料与方法

1.1 样品采集与前处理

土壤样品于 2005-01 采自北京郊区某温室实验地.温室实验设计如下:温室长 56m,宽 5.5m,将温室沿长度方向隔成 9 段,扣除进口保护区 2m 外,每段长度为 6m,共设计 9 个试验小区,试验小区分季节种植不同农作物,采样时种植作物为樱桃萝卜.每个小区净面积为 $6.0\text{m} \times 5.0\text{m}$.耕层土壤为当地农用地轻壤土.试验共设计了 3 种灌溉处理方式:①再生水灌溉;②地下水、再生水(1:1)混合灌溉;③地下水灌溉,每种灌溉方式设计 3 个平行.灌溉时间 2a,每年灌溉量约为 120 m^3 .

用 S 形采样法采集 3 个不同灌溉方式和不同小区的 3 个平行样品,共计 9 个土壤样品,保存于不锈钢制饭盒内,立即送回实验室于 -20°C 保存.

同时采集储存于井窖内的再生水样品 10 L,再生水来源于附近污水处理厂的二级处理出水.盛于洁净棕色玻璃器皿内,12 h 内运回实验室,经 $0.7\text{ }\mu\text{m}$ 玻璃纤维滤膜过滤后,用 HLB 柱富集并用二氯甲烷分 3 次洗脱,每次 5 mL.取 1/5 洗脱液(即 2L 水样)留待化学分析,剩余 4/5 洗脱液(即 8 L 水样)用高纯氮气吹至 $10\text{ }\mu\text{L}$,加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ DMSO 溶剂置换后作为样品储备液以待生物测试.

将土壤样品冷冻干燥(FD-1 冷冻干燥机,北京博医康技术公司),研磨后过 2 mm 筛.取 25 g 用二氯甲烷:丙酮(体积比为 1:1)的混合液 200 mL,在索氏提取器中先浸泡 24 h 后抽提 48 h,并用活化铜片脱硫.提取液在旋转蒸发仪(瑞士 Büchi)上浓缩至约 1 mL,加入 10 mL 二氯甲烷,再次浓缩至 1 mL,取 1/5 提取液(即 5g 土壤)留待化学分析,剩余 4/5 土壤提取液(20 g 土壤)转移到小瓶中,用高纯氮气将提取液吹至 $10\text{ }\mu\text{L}$ 后,加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ DMSO 溶剂置换后作为样品储备液以待生物测试.

将留待化学分析的水样洗脱液和土样提取液经硅胶/氧化铝层析柱(顶部有约 1 g 无水硫酸钠用于除水)进行分级净化,分别用 15 mL 正己烷、70 mL 正己烷和二氯甲烷混合液(体积比 7:3)洗出烷烃和

芳烃(多环芳烃和有机氯),芳烃组分以 100 mL 鸡心瓶收集并在旋转蒸发仪上浓缩至约 1 mL,以 10 mL 正己烷定量转移至 K-D 浓缩器中,氮气(0.25 L/min)吹至 0.2 mL 待测.

1.2 EROD 测试方法

鼠肝癌细胞由 American Type Culture Collection 惠赠.将细胞置于含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, 含 1.0 g/L D-Glucose, 3.7 g/L N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamine, Berlin, Germany), 10% (体积分数)胎牛血清, $100\text{ units}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素, 以及 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 链霉素的培养液内,于湿度 80%, CO_2 浓度 5%, 37°C 下培养.具体操作如下:用胰蛋白酶将细胞从培养瓶瓶壁上洗脱后,用培养液调节细胞密度为 $1.5 \times 10^4/\text{mL}$ 左右.于 96 孔培养板每孔加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 此培养液,置于 37°C , 5% CO_2 培养箱 (Sanyo, Japan) 内培养 24 h,待单层细胞铺满孔底面积的 70%~80% 后即可.弃去孔内培养液,加入含有待测样品与 2,3,7,8-TCDD 标准储备液的培养液.2,3,7,8-TCDD 标准储备液浓度梯度范围满足测定其最后测定 EROD 酶活与浓度呈剂量-效应关系.将加入样品的细胞置于培养箱内培养 72 h 后按本实验室已有的实验方法^[6,7],并参考 Donato 的方法^[8]测定 EROD 酶活.蛋白质含量测定采用 Bradford 法^[9],实验中用二甲亚砜(DMSO)作为空白对照.

样品的芳烃受体效应物质总浓度水平用 2,3,7,8-TCDD 标定.通过将样品的 EROD 酶活与实验中测定的 TCDD 标准储备液的剂量-EROD 酶活关系曲线对比后得到 TEQ_{bio} . TCDD 剂量-EROD 酶活关系曲线由以下函数方程用最小二乘法进行拟合:

$$Y = \frac{A - D}{1 + (X/c)^B} + D \quad (1)$$

式(1)中, Y: EROD 酶活性; X: 2,3,7,8-TCDD 浓度,即诱导剂量; A: EROD 酶活性最低值; B: 回归曲线中点的斜率; c: 半数最大 EROD 酶活性时 2,3,7,8-TCDD 标准液浓度,即 EC_{50} 值; D: EROD 酶活性最高值.

1.3 化学分析和 TEQ_{PAHs} 计算

多环芳烃定量分析在 GC 6890/MS 5973 (美国 Agilent) 上进行,采用 SIM 模式(selected ion monitoring mode),色谱柱为 HP-5 石英毛细管柱($30\text{ m} \times 0.25\text{ mm} \times 0.25\text{ }\mu\text{m}$, 美国 Agilent),载气为高纯氮气.炉温从 80°C 升至 200°C ,升温速率为 $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$,保持 5 min 然后按 $3^\circ\text{C}/\text{min}^{-1}$ 的速率从

200℃升温至 300℃,无分流进样 1 μL.采用 16 种 PAH 标准物质(Cat. No.48905-U, Supelco Co.),并按 Method-8310 (U. S. Environmental Protection Agency)方法定量.将化学分析测得 16 种 PAHs 浓度折算成等当量的 2,3,7,8-TCDD 后得到各样品的 TEQ_{PAHs}值:

$$TEQ_{PAHs} = \sum (PAH_i \times TEF_i) \quad (2)$$

式(2)中 PAH_i 为仪器分析所测定的 16 种多环芳烃浓度,TEF_i 对应多环芳烃的毒性当量因子,其值引自文献[10].

表 1 再生水与地下水常规水质指标检测数据比较

Table 1 Comparison between compositions of the reclaimed water and the groundwater

灌溉水类型	总磷 /mg·L ⁻¹	全盐 /mg·L ⁻¹	pH	氯离子 /mg·L ⁻¹	BOD ₅ /mg·L ⁻¹	COD /mg·L ⁻¹	粪大肠杆菌 /个·L ⁻¹
地下水	0.172	3 600	7.82	83.8	0.072	0.12	未检出
再生水	1.42	16 100	7.89	1 576	39.0	82.1	102

由表 1,除氯离子外,再生水各项检测常规指标均符合中华人民共和国农业灌溉水质标准(GB5084-92).但再生水的 BOD₅ 与 COD 均远高于地下水,结果表明再生水中含有较多的有机物质.

2.2 再生水及其灌溉土壤 EROD 测试结果

再生水与土壤的 EROD 测试结果如图 1 所示,每种土壤的 EROD 测试结果取同类 3 个土壤样品测试结果的平均值.

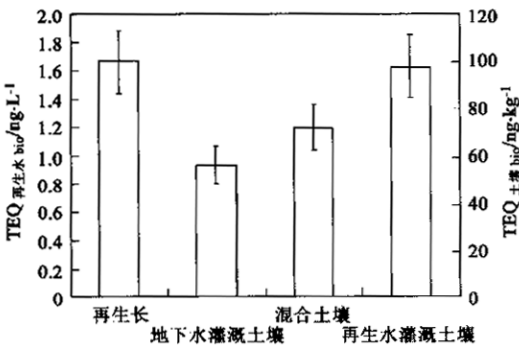


图 1 再生水及土壤 EROD 测试结果
Fig. 1 Results of EROD bioassay

由于 3 种不同灌溉方式中,灌溉用水量基本一致.EROD 测试的结果表明,虽然再生水中的芳烃受体效应物质浓度很低,但是通过灌溉作用在土壤中产生了积累.在图 1 中,完全使用再生水灌溉土壤的 TEQ_{bio}值明显高于使用地下水灌溉土壤的 TEQ_{bio}值,而混合灌溉土壤的 TEQ_{bio}值介于两者之间,再生水灌溉使得土壤中的 TEQ_{bio}增加了 70% 以上.用软件 SPSS 13.0 将 3 组不同灌溉类型土壤的 TEQ_{bio}

1.4 质量控制

基质加标实验:将 D10-菲作为多环芳烃回收率指示物,在干净水样与土壤样品中加入 D10-菲,掺混浓度与实际样品中 PAHs 浓度预估值接近,按照上述操作方法前处理与分析,平行 3 次,所有数据均用回归率校正,样品多环芳烃的回收率均大于 80%.

2 结果与讨论

2.1 再生水及地下水水质

再生水常规检测数据如表 1 所示.

值进行 *t* 检验,结果表明再生水灌溉土壤的 TEQ_{bio}与地下水灌溉土壤的 TEQ_{bio}相比具有显著性差异(*p*<0.05),说明再生水灌溉土壤中芳烃受体效应物质相对地下水灌溉土壤而言已有明显增加.

但是与其它地区不同类型土壤中的芳烃受体效应物质相比(表 2)^[12],本文所研究土壤的芳烃受体效应物质的污染水平相对较低,即便是完全采用再生水灌溉,土壤中的 TEQ_{bio}也低于发达国家的工业以及农业用地土壤中的芳烃受体物质水平.但再生水灌溉土壤的 TEQ_{bio}值已高于部分地区森林土壤,林地土壤的芳烃受体物质水平,表明再生水灌溉可以使得芳烃受体效应物质得以在土壤中富集,因此目前相对较低水平的 TEQ_{bio}值并不代表长期使用再生水灌溉后芳烃受体效应物质不会继续积累,还需要长期观察来确认.

表 2 不同地区土壤中芳烃受体效应物质浓度的比较

Table 2 Comparison of TEQ concentrations in soils of different areas

地区	不同土壤类型	芳烃受体物质水平/ng·kg ⁻¹
俄罗斯	工业区	1~20
西班牙	工业区	450
西德	林地	5.4~112
	工业区	280~290
韩国釜山	焚烧炉附近	23.78
日本	城区土壤	0.3~9.4
	森林土壤	0.6~13
	稻田土壤	4.5~230
本研究	地下水及再生水灌溉土壤	56~98

2.3 再生水灌溉对土壤 TEQ 贡献的估算

根据再生水的使用量以及灌溉时间,可以估算

出再生水灌溉对于土壤 TEQ 的贡献值 TQ,其值可以根据式(3)进行估算:

$$TQ = (TEQ_{rec} \times V \times t) / (\rho \times S \times H) \quad (3)$$
式(3)中 TEQ_{rec} 为 EROD 测试得到再生水的 TEQ_{bio} 值,EROD 测试结果为 1.67 ng/L; V 为每年再生水灌溉量(120 m^3); t 为灌溉时间(2 a); ρ 为土壤密度,取土壤平均密度为 $1.2 \times 10^6\text{ g/m}^3$; S 为实验土壤小区净面积($6.0\text{ m} \times 5.0\text{ m}$); H 为采样土壤平均深度(0.2 m).

根据以上公式可以计算出 TQ 约为 55.67 ng/kg,同再生水灌溉土壤的 TEQ_{bio} 与地下水灌溉土壤 TEQ_{bio} 的差值 41.4 ng/kg 相比,两者处于同一数量级且数值接近,说明土壤中芳烃受体效应物质的累积与再生水灌溉有关,同时表明 EROD 测试可以有效地快速筛选土壤中芳烃受体效应物质的浓度水平.

2.4 再生水及土壤中16种多环芳烃的组成

根据化学分析的结果得到样品中低环(2~3 环)与高环(4~6 环)多环芳烃占总多环芳烃的百分比,如图 2 所示.

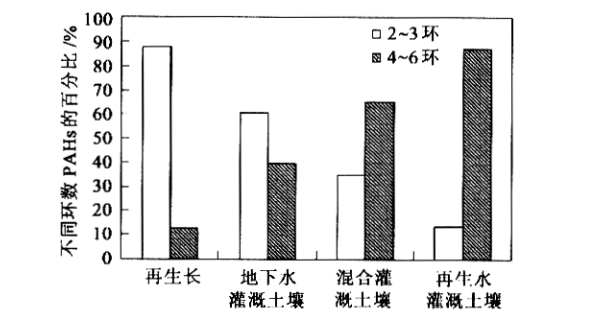


图 2 再生水与土壤中 PAHs 的组成

Fig. 2 Composition of the PAHs in soils and reclaimed water

从图 2 中可以看出,虽然再生水中主要以低环 PAHs 为主,但是随着再生水灌溉量的增加,土壤中高环多环芳烃占总多环芳烃的百分比也随之增加.其中再生水灌溉土壤中的高环 PAHs 已经占到总 PAHs 的 80% 以上,地下水灌溉土壤中的高环 PAHs 仅占总 PAHs 的 40% 左右.这一结论表明再生水灌溉使得在土壤中累积的 PAHs 主要是高环的 PAHs.有研究表明,低环 PAHs 由于化合物自身结构的原因从而不能引起芳烃受体效应^[13],因此高环 PAHs 在土壤中的累积结果说明,土壤提取液芳烃受体效应的增强可能是因为高环 PAHs 在土壤中累积所致.

2.5 再生水灌溉土壤中多环芳烃对芳烃受体效应的贡献

EROD 测试结果通常被认为代表了二噁英类物质的浓度水平^[3~5].但是已经有实验证据表明环境中的 PAHs 也是重要的芳烃受体效应物质^[10],其对土壤中芳烃受体效应物质的贡献率可以根据通过比较 TEQ_{bio} 值与 TEQ_{PAHs} 值得出.图 3 为 TEQ_{PAHs} 与 TEQ_{bio} 的比值图,结果用百分数表示.

图 3 反映了土壤中 PAHs 对于 EROD 测试结果得到的土壤中芳烃受体效应的贡献率.随着灌溉中使用的再生水量的增加,再生水灌溉已经使得多环芳烃类物质在土壤中得到富集,土壤的 TEQ_{PAHs} 也随着增加,并且随着灌溉中使用的再生水量的增加, TEQ_{PAHs} 占 TEQ_{bio} 的比重也随之增加.混合灌溉的土壤 TEQ_{PAHs} 占其 TEQ_{bio} 的 40.2%,介于再生水灌溉与地下水灌溉之间,而再生水灌溉土壤的 TEQ_{PAHs} 占其 TEQ_{bio} 的近 80%,远高于地下水灌溉土壤 TEQ_{PAHs} 占其 TEQ_{bio} 的 10.3%.

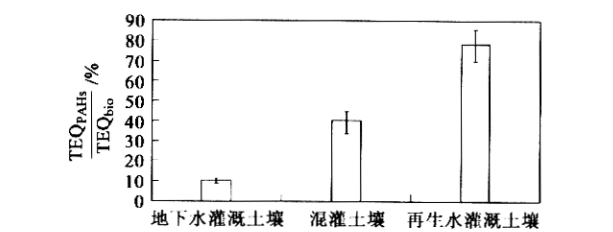


图 3 TEQ_{PAHs} 占 TEQ_{bio} 的百分比

Fig. 3 Percentage of the TEQ_{PAHs} accounting for the TEQ_{bio}

对上述 3 组数据进行 t 检验,结果显示再生水灌溉土壤、混灌土壤的 (TEQ_{PAHs}/TEQ_{bio}) 值与作为对照的地下水灌溉土壤的 (TEQ_{PAHs}/TEQ_{bio}) 值相比均具有显著性差异 ($p < 0.01$).说明结果表明多环芳烃在土壤中的累积是造成土壤 TEQ_{bio} 增大的主要原因之一,多环芳烃是再生水灌溉土壤中主要的芳烃受体效应物质之一.已有研究表明,污水灌溉可以使得多环芳烃类物质在土壤中累积,从而增大土壤的遗传毒性^[11].本文研究证明再生水中的 PAHs 可以在再生水灌溉的土壤中积累,应该予以重视.

3 结论

EROD 生物测试可以用于快速筛选土壤中芳烃受体效应物质的浓度水平,与化学分析和毒性当量方法配合应用,可说明已知芳烃受体效应物质的贡

献. 在本研究中,发现再生水灌溉导致土壤中芳烃受体效应物质的积累,且主要是灌溉水中的多环芳烃类物质.

参考文献:

- [1] Chen Y, Wang C X, Wang Z J, *et al.* Assessment of the contamination and genotoxicity of the soil irrigated with wastewater [J]. *Plant and Soil*, 2004, **261**: 189~196.
- [2] Ma M, Wang Z J, Shang W, *et al.* Mutagenicity and acute toxicity of waters from different treatment processes in Beijing waterworks [J]. *Environmental and Science and Health*, 2003, **35**(10): 88~96.
- [3] Poland A, Knutson J C. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity [J]. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1982, **22**: 517~544.
- [4] 徐盈, 吴文忠, 张甬元. 利用 EROD 生物测试法快速筛选二噁英类化合物[J]. *中国环境科学*, 1996, **16**(4): 279~284.
- [5] Wan X Q, Ma T W, Wu W Z, *et al.* EROD activities of a primary cell culture of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) hepatocytes exposed to polychlorinated aromatic hydrocarbons[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2004, **58**: 84~89.
- [6] Ma M, Wang C X, Wang Z J. Assessing toxicities of hydrophobic organic pollutants in Huaihe River by using two types of sampling and bioassays[J]. *J. Environmental Science and Health (A)*, 2005, **40**(2):331~242.
- [7] 陈盈盈, 马梅, 赛道建, 等. 利用成组生物测试方法评估不同深度处理工艺出水的生态安全性. *环境科学*, 2005, **26**(1): 100~103.
- [8] Donato M T, Gomezlechon M J, Castell J V A. Microassay for measuring cytochrome P450 1A1 and cytochrome P450 11B1 activities in intact human and rat hepatocytes cultured on 96-well plates [J]. *Anal. Biochem.*, 1993, **213**: 29~33.
- [9] Bradford M M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding[J]. *Anal. Biochem.*, 1976, **72**: 248~254.
- [10] Willett K L, Gardinali P R, Serianco J L, *et al.* Characterization of the H4IIE rat hepatoma cell bioassay for evaluation of environmental samples containing polynuclear aromatic hydrocarbons(PAHs)[J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1997, **32**(4):442~448.
- [11] Behnisch P A, Hosoe K, Brouwer A, *et al.* Screening of dioxin-like toxicity equivalents for various matrices with wildtype and recombinant rat hepatoma H4IIE cells [J]. *Toxicol. Sci.*, 2002, **69**: 125~130.
- [12] 李常清, 陈左生, 李伟, 等. 土壤中的二噁英类物质污染及其污染源[J]. *地球与环境*, 2004, **32**(2): 63~69.
- [13] Albertus T C Bosveld, Paul A F de Bie, Nico W Van den Brink, *et al.* In vitro EROD induction equivalency factors for the 10 PAHs generally monitored in risk assessment studies in The Netherlands [J]. *Chemosphere*, 2002, **49**: 75~83.