

天然水体有毒有机污染物毒性监测样品前处理*

马梅 王毅 王子健

(中国科学院生态环境研究中心环境水化学国家重点实验室, 北京 100085)

摘要 应用水样直接测试、 CH_2Cl_2 萃取和被动式半渗透膜采样技术(triolein-SPMD)富集洋河宣化至官厅水库沿线水样中污染物, 并进行 *P. Phosphoreum* T3 和 *Vibrio-tinghaiensis* sp. Nov-Q67 发光菌急性毒性测试, 分析探讨不同样品前处理方式对毒性测试结果的影响. 结果显示由原河水样品直接进行的发光菌急性毒性测试会受水体中共存物质的干扰, 将毒性掩盖, 表现为刺激发光. 采用 CH_2Cl_2 萃取样品和 triolein-SPMD 富集样品后再进行毒性检验, 宣化段和下游河段存在有机有毒污染物的毒性. 用 triolein-SPMD 富集的样品, 2 种发光菌检验结果有较好的相关性($\text{EC}_{50,13} = 1.47 \text{ EC}_{50, Q67} + 63.16, r^2 = 0.9848$). 本文结合 triolein-SPMD 的优点, 推荐用该方法作为环境有毒有机污染物毒性监测的选择性样品前处理手段.

关键词 溶剂萃取, 半渗透膜被动采样, 发光菌, 急性毒性.

Sample Pretreatment for Toxic Assessment of Organic Pollutants in River Water*

Mei Ma Yi Wang Zijian Wang

(State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences,

Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

Abstract The aim of this research is to verify influences of sample pretreatment on toxic assessment of organic pollutants. Luminescent bacteria *P. phosphoreum* T3 and *Virbio-tinghaiensis* sp. Nov-Q67 were applied to assay the acute toxicity and river water pretreated with either liquid-liquid extraction using dichloromethane or sequestration by a triolein filled semi-permeable membrane device (triolein-SPMD). The results indicated clearly that substances that lead to stimulating effects influenced the toxic assay performed on original water. After extraction with CH_2Cl_2 or preconcentration with triolein-SPMD, acute toxicity of organic pollutants in river water can be monitored. When triolein-SPMD was applied, both toxic assays by *P. phosphoreum* T3 and *Virbio-tinghaiensis* sp. Nov-Q67 gave an accordant result ($\text{EC}_{50,13} = 1.47 \text{ EC}_{50, Q67} + 63.16, r^2 = 0.9848$). Based on the comparison, triolein-SPMD was recommended for sequestration of organic pollutants from river water for toxic assessment.

Keywords liquid-liquid extraction, triolein-SPMD, luminescent bacteria, acute toxicity.

90年代发展起来的半渗透膜被动式采样装置(triolein-SPMD)其中充入的中性类脂和半渗透膜的结构特点,使其能够较好地模拟水生生物富集水体有机污染物的过程^[1,2],对水体中污染物进行富集. triolein-SPMD不仅经济有效,而且可以在恶劣的环境中长期进行监测,克服了传统采用方法仅仅记录瞬时污染状况而不具有代表性的缺点.

将不同样品采集或富集技术作为生物毒性测试的样品前处理手段,应用于环境样品的生物监测是值得关注的问题之一.目前鲜见不同

采样或富集方法对毒性测试的结果影响差异报道.本文针对有机物污染较为严重的张家口地区洋河到官厅水库流域,应用溶剂萃取和 triolein-SPMD 采样技术富集水中有机污染物用 T3 发光菌 (*P. phosphoreum* T3) 和 Q67 (*Vibrio-tinghaiensis* sp. Nov-Q67) 发光菌进行急性毒性测试,并与原河水样品毒性测试结果

* 国家自然科学基金资助项目(Project Supported by the National Natural Science Foundation of China): 29637010 和中国科学院资源与生态环境研究重点项目资助
作者简介: 马梅(1967~),女,博士研究生,助理研究员
收稿日期: 1998-12-02

进行对比. 探讨了非极性有机有毒污染物对水样急性毒性的贡献, 对不同采集或富集方法对测试结果的影响进行了讨论.

1 实验部分

1.1 水样采集及溶剂萃取

沿洋河设置 5 个采样点(图 1), 每个样点采集 2~3L 水样, 经 0.45 μm 膜过滤后取其中 2L 用 CH_2Cl_2 萃取, 用无水硫酸钠脱水, 高纯氮气吹干后用一定体积的 DMSO(A. R. Sigma Co.) 溶解, 配制所需浓度, 低温保存, 用于生物毒性实验.



图 1 宣化洋河采样点分布图

1.2 triolein-SPMD 采样器的制备及样品采集

将聚乙烯膜制成的三面塑封的袋用环己烷浸泡 24h, 以去除其中的杂质. 用氮气吹干后每个充入 40 μl 三油酸脂(Triolein, 95%), 立即放入 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中密封保存备用^[1].

在 5 个样点各放入 4~5 个 triolein-SPMD 采样器, 28d 后取出低温密封保存, 送回实验室^[3]. 分别用蒸馏水和酸洗后, 放入环己烷中透析 24h, 透析液用无水硫酸钠脱水, 用高纯氮气吹干后用一定体积的 DMSO(A. R., Sigma) 溶解, 低温保存, 用于生物毒性实验.

1.3 常规指标测定和化学分析

使用美国 Hach 公司的水质测定仪(DREL/2010, Water Quality Laboratory) 对水样进行了色度、浊度、pH、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 和 COD 的测定. 化学分析用 HP 5890 / 5971A 型 GC-MS 系统进行(SIM 模式), 分析中采用了 2 根 HP-5 的石英毛细管柱相接(总长 55m) 和选择性离子

扫描模式来提高分辨率和检测灵敏度, 标样均为分析纯.

1.4 发光菌急性毒性测试及数据处理

P. phosphoreum sp. T3 发光菌冻干粉由中科院南京土壤所提供, *Vibrio-tinghaiensis* sp. Nov-Q67 由华东师范大学提供, 分别用实验室建立的毒性测试方法进行毒性测试^[4,5]. 对原水样直接用稀释水稀释后进行毒性测试, 对 DM-SO 溶解的样品, 则取不同体积的样品加入稀释水后配制成测试液进行毒性测试. 溶解测试过程中保持样品溶液中 DMSO 浓度不超过 1%.

本研究中, 毒性用导致发光菌半数抑制(EC_{50}) 相当的原水样的富集倍数表示. 对毒性小于 EC_{50} 的样品, 用回归方法外推求得 EC_{50} . 当水样用 CH_2Cl_2 萃取富集时, 由 EC_{50} 所对应的 DMSO 体积可以推算出对应的原水样体积及富集倍数. 当水样用 triolein-SPMD 富集时, 对大部分污染物的采样体积在 0.5~10L \cdot (d \cdot g) $^{-1}$ 之间, 采样速率取决于化合物的脂水分配系数、环境温度、在聚乙烯膜中扩散速率和采样器表面淤积程度^[1]. 为了简便表示, 本文采用 5L \cdot (d \cdot g) $^{-1}$ 这一平均采样速率.

2 结果与讨论

2.1 水样水质指标和优先污染物的测定

洋河各点水样常规指标测定结果表明(表 1), 宣化地区工业废水色度、浊度、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 含量及 COD 各项指标明显高于其它各点, 其中色度和 COD 值超过废水综合排放标准(GB8978-88). 生活污水各项常规指标均未超过排放标准. 除工业废水和生活污水外其它各样点的常规指标中, 仅 COD 值超过地面水环境质量标准(GB3838-88).

洋河各河段水样中的优先控制污染物化学分析结果表明, 污染主要来自宣化地区, 但是在洋河水库到鸡鸣驿段还有其它污染源.

2.2 原河水样品的发光菌急性毒性检验

对原河水样品进行的 T3 发光菌急性毒性测试结果表明(图 2), 污染最为严重的工业废水反而表现出强烈的刺激发光作用, 相对发光

表 1 洋河主要采样点水质常规及
优先控制污染物浓度¹⁾

项目	工业 废水	生活 污水	洋河 水库	响水 铺	鸡鸣 驿
色度	608	46	49	62	61
浊度	195	2	8	7	7
pH	8.1	8.0	7.9	7.8	8.0
$\text{NH}_3\text{-N}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	25.0	5.9	12.5	12.7	11.4
$\text{COD}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	244.5	94.0	35.8	55.2	45.7
$\text{PCB}/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0.081	0.092	0.056	0.064	0.089
$\text{PAH}/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	1.2	1.2	1.7	0.3	0.5
苯系物/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	35.5	46.1	125.6 ²⁾	2.4	12.2
阿特拉津/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0.1	nd	0.1	0.1	nd
乙草胺/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	nd	nd	0.2	0.1	0.1

1) 水中优先控制污染物浓度数据取 CH_2Cl_2 萃取获得的数据
2) 存在高浓度甲苯

率接近 180%。工业废水主要来自宣化农药厂、造纸厂、焦化厂、化肥厂、啤酒厂、皮革公司和制药厂, 其中化肥厂排水中较高的氨氮含量可能是引起刺激发光作用的主要原因。宣化生活污水表现出微弱的毒性作用, 与工业废水汇合后, 流入洋河水库, 在向下游迁移过程中这种刺激发光作用逐渐减弱。几乎所有的样品均未表现出明显的毒性效应, 相对发光抑制率均未超过 50%。对比水质测定结果可以看出, T3 发光菌在各点样品中的相对发光率与 $\text{NH}_3\text{-N}$ 有较好的相关性, 表明对原水样进行的 T3 发光菌急性毒性测试时, 较高的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 值是影响测试结果的主要因素。在这种情况下, 水体中的有毒物质的抑制发光作用可能会受到掩盖。对于原河水样品进行的 Q67 发光菌毒性测试结果, 各点样品均表现出强的刺激发光作用。并且在下游的响水铺和鸡鸣驿 2 点与 T3 发光菌的测试结果呈现出相反的结果, 表现出刺激发光作用逐渐增强。这可能是 2 种发光菌的测试体系不同造成的。2 种发光菌的测试体系的差别在于, T3 发光菌的测试体系中存在着大量的氯离子 (2% ~ 3% NaCl), 而 Q67 发光菌的测试体系完全模拟了天然淡水的组成^[4], 因而前者的测试体系中高含量的 Cl^- 有可能使某些化合物的形态发生变化从而改变其毒性^[5]。

结合化学分析结果(表 1) 可以看出, 主要优先控制污染物浓度在宣化地区明显高于下游

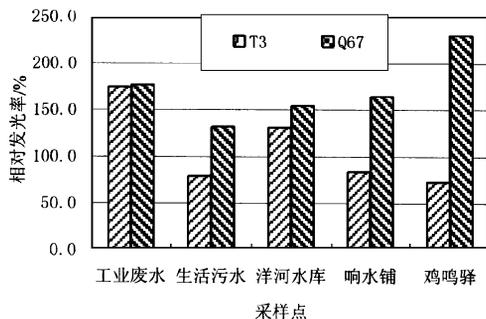


图 2 宣化洋河原水样发光菌毒性检验

河段。已有的化学分析结果不能准确反映出宣化下游河段毒性升高的规律, 但是可以看出洋河水库到鸡鸣驿段还有其它污染源, 如导致 PCB 污染物浓度升高(表 1)。毒性测试结果支持洋河水库下游存在其他导致急性毒性的物质排放。

2.3 CH_2Cl_2 萃取样品发光菌急性毒性检验

以 2L 水样用 CH_2Cl_2 萃取得到的样品进行的 T3 发光菌毒性测试结果显示, 工业废水和生活污水毒性最强, 下游各样点的毒性明显减弱。用 Q67 发光菌毒性测试结果显示, 毒性经历了一个逐渐降低后, 下游各样点的毒性明显增加。目前已有的实验数据尚不能解释以 CH_2Cl_2 萃取富集时 T3 和 Q67 发光菌毒性测试结果之间的不同。

2.4 Triolein-SPMD 富集样品发光菌急性毒性检验

以各样点 triolein-SPMD 中富集的样品进行的 T3 发光菌急性毒性测试结果表明(表 2), 工业废水表现出很强的毒性, 与生活污水汇合后在洋河水库毒性有明显缓解, 但在向下游迁移过程中毒性又有明显增强。对于 Q67 发光菌测试, 除生活污水外(无数据), 毒性变化的趋势和 T3 发光菌急性毒性测试结果类似, 相关性十分显著 ($\text{EC}_{50, \text{T3}} = 1.47 \text{ EC}_{50, \text{Q67}} + 63.16$, $r^2 = 0.9848$)。2 组毒性测试结果的差异表现了不同物种对有毒物质的敏感程度不同, 以及体系中加入 Cl^- 对测试的影响。根据富集机理, triolein-SPMD 可以有效地富集水体中以极低浓度存在的疏水性化合物, 因此上述结果表明, 在

宣化地区和洋河水库下游均存在疏水性有毒化合物的排放. 当用 Q67 发光菌进行毒性测试时, 用 CH_2Cl_2 萃取和用 triolein-SPMD 富集样

品所得到的结果有可比性, 工业废水毒性最强, 而在洋河水库下游各点, 毒性逐渐增强.

2.5 小结

表 2 不同富集样品方法及 2 种发光菌毒性测试的 $\text{EC}_{50}^{\text{D}}$

样品来源	原水样		CH_2Cl_2 萃取		Triolein-SPMD 富集	
	T3	Q67	T3	Q67	T3	Q67
工业废水	*	*	8.5	17.5	4	64.5
生活污水	1.7	*	24.6	20.8	37	nd
洋河水库	*	*	83.0	26.6	80	180.5
响水铺	2.0	*	79.9	15.4	43	124.0
鸡鸣驿	1.0	*	87.9	12.3	24	106.9

1) EC_{50} 以引起 50% 抑制原水的浓缩倍数表示; nd 为缺少数据; * 测试结果为刺激发光

(1) 对天然水样直接进行发光菌和藻类等毒性测试会受到共存物质刺激发光或刺激生长的影响, 结果不能真实反映水体中有毒物质的影响. 例如对 $\text{NH}_3\text{-N}$ 或 $\text{PO}_4\text{-P}$ 含量高的水体, 由于其刺激发光或作为营养物质的作用掩盖了毒性作用, 可能会导致错误的毒性测试结论. 因此在进行天然水样毒性评估时, 最好能结合一定的分离手段以排除大量物质的干扰从而明确是否存在毒性排放, 以及产生毒性的原因.

(2) 用萃取和 triolein-SPMD 2 种富集方法得到的样品, 其毒性测试结果有一定的差异. 这种差异可能是 2 种富集方法的富集机理不同造成的. CH_2Cl_2 萃取方法对所有污染物以近似相同的浓缩倍数浓缩(假定萃取完全), 其中的有机物浓度取决于水和有机相的体积比. Triolein-SPMD 是被动采样方式, 主要采集亲脂类型的污染物, 采样速率(当 $\lg K_{ow} < 6$ 时)取决于化合物的脂水分配系数. 因此, 表 2 用不同方法和同一种生物测试所得结果不同, 可解释为不同采样方法之间的区别, 可以看出在大部分样点中亲脂性有机污染物的急性毒性不大. 同时, 由于 CH_2Cl_2 萃取方法得到的样品代表的是采样瞬间, 具有一定的偶然性, 而 Triolein-SPMD 监测的是近 1 个月内的平均结果, 较好地避免了偶然因素的影响, 结果应该更具代表性.

(3) 通过对不同采样和样品富集方法的比较, 可以认为应用 triolein-SPMD 进行的水体

有机物的富集及对富集样品进行的急性生物毒性测试, 能够较好地监测到宣化河水中的亲脂有机污染物及其毒性, 是一种可行的毒性鉴定和毒性评估配套方法.

参 考 文 献

- 1 Sabaliunas D and Sodergren A. Use of Semi-Permeable Membrane Devices to Monitor Pollutants in Water and Assess their effects: A Laboratory test and field Verification. *Environmental Pollution*, 1997, **96**(2): 195 ~ 205
- 2 Sodergren A. Solvent-Filled Dialysis Membranes Simulate Uptake of Pollutants by Aquatic Organisms. *Environ. Sci. Technol.*, 1987, **21**(9): 855 ~ 859
- 3 Jon A Lebo et al. Use of the Semi-permeable Membrane Device as an in Situ Sampler of Waterborne Bioavailable PCDD and PCDF Residues at Sub-parts-per Quadrillion Concentrations. *Environ. Sci. Technol.*, 1995, **29**: 2886 ~ 2892
- 4 Ma Mei et al. Application of new type of fresh water luminescent bacterium (*Vibrio qinghaiensis* sp. -Q67) for toxicity bioassay. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 1998, **18**(1): 86 ~ 91
- 5 Bulich A A. In: L L Markings and R A Kimerle eds. *Aquatic Toxicology*. STP 667. American Society for Testing and Materials. Philadelphia, PA USA: 1979, 98 ~ 106
- 6 Ma Mei et al. Assessment of the pollutant state by toxic bioassay of water samples from Baiyangdian catchment. *China Environmental Science*, 1995, **15**(3): 166 ~ 170
- 7 Wang Zijian et al. Preliminary ecotoxicological assessment of sediment samples from Lean River estuary near Poyang Lake. *Environmental Chemistry*, 1993, **12**(5): 342 ~ 346