ISSN 0250-3301 CODEN HCKHDV

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第34卷 第9期

Vol.34 No.9

2013

中国科学院生态环境研究中心 主办

科学出版社 出版

中国期刊方阵 双奖期刊 中华人民共和国新闻出版总署

环境科学
(HUANJING KEXUE)
ENVIRONMENTAL SCIENCE
第34卷 第9期
2013年9月15日

目 次

利用PUF被动采样技术研究长三角城市群大气中多环芳烃的时空分布及来源 …… 张利飞,杨文龙,董亮,史双昕,周丽,张秀蓝,李玲玲,钮珊,黄业茹(3339)
FTIR对大气颗粒物$PM_{2.5}$中硝酸盐的定量分析 …… 刘娜,魏秀丽,高闽光,徐亮,焦洋,李胜,童晶晶,程巳阳(3347)
福建茫荡山地区春季大气O_3、HONO、HCHO、H_2O_2对·OH的贡献率研究 …… 刘昊,王会祥(3352)
水体类固醇雌激素污染现状研究进展 …… 都韶婷,金崇伟,刘越(3358)
嘉兴市地表水中兽用抗生素的污染现状调查 …… 闾幸,余卫娟,兰亚琼,李立,吕升,叶朝霞,张永明,刘锐,陈吕军(3368)
上海食用鱼中短链氯化石蜡的污染特征 …… 姜国,陈来国,何秋生,孟祥周,封永斌,黄玉妹,唐才明(3374)
水体环境内毒素活性的鲎法定量检测及影响因素研究 …… 张灿,刘文君,张明露,田芳,孙雯,钱令嘉,战锐(3381)
四环素类抗生素对淡水绿藻的毒性作用 …… 徐冬梅,王艳花,饶桂维(3386)
光照对东海典型赤潮藻生长及硝酸还原酶活性的影响 …… 李鸿妹,石晓勇,丁雁雁,唐洪杰(3391)
围隔实验中浒苔在不同营养盐条件下的生长比较 …… 庞秋婷,李凤,刘湘庆,王江涛(3398)
长江口及邻近海域浮游植物色素分布与群落结构特征 …… 赖俊翔,俞志明,宋秀贤,韩笑天,曹西华,袁涌铨(3405)
长江中下游湖泊超微型真核藻类遗传多样性研究 …… 李胜男,史小丽,谢薇薇,龚伊,孔繁翔(3416)
峡谷型水源水库的氮、磷季节变化及其来源分析 …… 黄廷林,秦昌海,李璇(3423)
九龙江河流-库区系统沉积物磷特征及其生态学意义 …… 鲁婷,陈能汪,陈朱虹,王龙剑,吴杰忠(3430)
氮在高含沙水向人工浅水湖泊补水期间的变化规律 …… 陈友媛,申宇,杨世迎(3437)
石灰石和黄铁矿-石灰石人工湿地净化河水的研究 …… 张菁,李睿华,李杰,胡俊松,孙茜茜(3445)
杭州湾潮滩湿地3种优势植物碳氮磷储量特征研究 …… 邵学新,李文华,吴明,杨文英,蒋科毅,叶小齐(3451)
滇池优势挺水植物茭草和芦苇降解过程中DOM释放特征研究 … 谢理,杨浩,渠晓霞,朱元荣,鄢元波,张明礼,吴丰昌(3458)
自来水处理工艺对溶解相中全氟化合物残留的影响 …… 张鸿,陈清武,王鑫璇,柴之芳,沈金灿,杨波,刘国卿(3467)
J市饮用水氯消毒副产物分析及其健康风险评价 …… 李晓玲,刘锐,兰亚琼,余素林,文晓刚,陈吕军,张永明(3474)
水中硫酸根及溶解氧质量浓度变化对管垢金属元素释放的影响 …… 吴永丽,石宝友,孙慧芳,张枝焕,顾军农,王东升(3480)
重金属捕集剂对水中微量Hg(Ⅱ)的处理研究 …… 胡运俊,盛田田,薛晓芹,谭丽莎,徐新华(3486)
聚合氯化铁-聚(环氧氯丙烷-二甲胺)复合絮凝剂在模拟水处理中的混凝特性研究 …… 刘新新,杨忠莲,高宝玉,王燕,岳钦艳,李倩(3493)
镁铝复合脱色絮凝剂的微观结构形态及絮凝机制 …… 桑义敏,常雪红,车越,谷庆宝(3502)
钴掺杂铁酸铋活化过硫酸盐降解水中四溴双酚A的研究 …… 欧阳磊,丁耀彬,朱丽华,唐和清,廖海星(3507)
以海泡石为载体的双金属多相类芬顿催化剂的制备及表征 …… 宿程远,李伟光,刘兴哲,王恺尧,王勇(3513)
氧化还原介体调控亚硝酸盐反硝化特性研究 …… 赵丽君,马志远,郭延凯,席振华,杜海峰,刘晓宇,郭建博(3520)
缓释碳源滤料滤池用于二级出水的深度脱氮 …… 唐蕾,李彭,左剑恶,袁琳,李再兴(3526)
微膨胀对好氧颗粒污泥脱氮过程中N_2O产生量的研究 …… 陈丽丽,高大文(3532)
Fenton试剂与CPAM联合调理对污泥脱水效果的影响研究 …… 马俊伟,刘杰伟,曹芮,岳东北,王洪涛(3538)
高效厌氧氨氧化颗粒污泥的动力学特性 …… 唐崇俭,熊蕾,王云燕,郑平(3544)
内蒙古温带草原氮沉降的观测研究 …… 张菊,康荣华,赵斌,黄永梅,叶芝祥,段雷(3552)
湘中矿区不同用地类型面源Cd输出负荷的原位实验研究 …… 刘孝利,曾昭霞,陈喆,铁柏清,陈求稳,叶长城(3557)
蠡湖沉积物重金属形态及稳定性研究 …… 王书航,王雯雯,姜霞,宋倩文(3562)
密云县境内潮河流域土壤重金属分析评价 …… 于洋,高宏超,马俊花,李迎霞,莫罹,孔彦鸿(3572)
西北干旱区黄河沿岸典型工业带表土磁性特征及其环境意义 …… 许淑婧,张英,余晔,王博,夏敦胜(3578)
复合稳定剂对砷污染土壤的稳定研究 …… 王浩,潘利祥,张翔宇,李萌,宋宝华(3587)
湖南下水湾铅锌尾矿库优势植物重金属含量及富集特征 …… 何东,邱波,彭尽晖,彭亮,胡凌雪,胡瑶(3595)
安太堡露天矿复垦地不同人工植被恢复下的土壤酶活性和肥力比较 …… 王翔,李晋川,岳建英,周小梅,郭春燕,卢宁,王宇宏,杨生权(3601)
三苯基锡的微生物降解及其对降解菌的影响 …… 叶锦韶,田云,尹华,彭辉,黄捷,麻榆佳(3607)
二氯甲烷降解菌*Methylobacterium rhodesianum* H13的分离鉴定及降解特性研究 …… 刘洪霞,朱润晔,欧阳杜娟,庄庆丰,陈东之,陈建孟(3613)
引物选择对污泥微生物多样性分析的影响 …… 徐爱玲,吴等等,宋志文,任杰,夏岩,董珊珊,刘梦(3620)
钙铝类水滑石衍生复合氧化物的SO_2储存性能研究 …… 曹琳,王海林,解强(3627)
基于转运站满负荷的北京市新东西城区生活垃圾物流优化方案研究 …… 袁京,李国学,张红玉,罗一鸣(3633)
重金属污染土壤治理与生态修复论坛会议论文
多证据分析技术在场地重金属污染评价中的应用研究 …… 姜林,钟茂生,朱笑盈,姚珏君,夏天翔,刘辉(3641)
我国城市不同功能区地表灰尘重金属分布及来源 …… 李晓燕,刘艳青(3648)
黄河下游滩区开封段土壤重金属分布特征及其潜在风险评价 …… 张鹏岩,秦明周,闫江虹,胡长慧,赵亚平(3654)
青岛北站规划区原场地表层土壤重金属污染研究 …… 朱磊,贾永刚,潘玉英(3663)
某铅蓄电池厂土壤中铅的含量分布特征及生态风险 …… 郑立保,陈卫平,焦文涛,黄锦楼,魏福祥(3669)
某铅冶炼厂对周边土壤质量和人体健康的影响 …… 周小勇,雷梅,杨军,周广东,郭广慧,陈同斌,万小铭,梁琪,乔鹏炜(3675)
某铅蓄电池厂表土不同粒径中铅分布规律研究 …… 岳希,孙体昌,黄锦楼(3679)
原位生物稳定固化技术在铬污染场地治理中的应用研究 …… 张建荣,李娟,许伟(3684)
淋洗剂对多金属污染尾矿土壤的修复效应及技术研究 …… 朱光旭,郭庆军,杨俊兴,张晗芝,魏荣菲,王春雨,Marc Peters(3690)
铅蓄电池厂污染土壤中重金属铅的清洗及形态变化分析 …… 任贝,黄锦楼,苗明升(3697)
超声波辅助化学萃取对某工业场地铅污染土壤修复效果研究 …… 王鑫杰,黄锦楼,刘志强,岳希(3704)
摩擦清洗修复铅污染土壤的参数优化及清洗效率评价 …… 杨雯,黄锦楼,彭会清,李思拓(3709)
土壤重金属钝化修复剂生物炭对镉的吸附特性研究 …… 郭文娟,梁学峰,林大松,徐应明,王林,孙约兵,秦旭(3716)
无机稳定剂对重金属污染土壤的化学稳定修复研究 …… 曹梦华,祝玺,刘黄诚,王琳玲,陈静(3722)
《环境科学》征稿简则(3404) 《环境科学》征订启事(3444) 信息(3492, 3551, 3696, 3715)

水体环境内毒素活性的鲎法定量检测及影响因素研究

张灿[1,2,3],刘文君[1*],张明露[1,4],田芳[1],孙雯[5],钱令嘉[3],战锐[3]

(1. 清华大学环境学院,北京 100084; 2. 军事医学科学院卫生学环境医学研究所,天津 300050; 3. 军事医学科学院基础医学研究所,北京 100850; 4. 北京工商大学食品学院,北京 100048; 5. 首都医科大学附属友谊医院泌尿外科,北京 100050)

摘要: 内毒素是革兰氏阴性菌和某些蓝藻细胞壁上的脂多糖复合物,是常见的外源性致热原,具有强免疫刺激能力,与人类多种疾病密切相关. 本研究采用最低检测限为 0.03 EU·mL^{-1}的动态浊度东方鲎(*Tachypleus* Amebocyte Lysate,TAL)试剂,对不同水体环境样品的内毒素活性定量检测,分析了 pH 值和无机盐对 TAL 试验检测结果的影响. 结果表明 pH 值在 6.0 ~ 8.4 范围内适合进行内毒素检测,过酸条件引起检测结果的抑制,过碱条件引起检测结果的增强,检测前可用无热原 Tris-HCl(pH = 7.4)溶液调节 pH. 当 NaCl、Na_2SO_4、$CaCl_2$、$MgCl_2$ 和 KCl 浓度小于 50 mg·L^{-1}时不会干扰内毒素的检测,当浓度升高至1 000 ~ 10 000 mg·L^{-1}时引起抑制效果. 浓度为 2.5 mg·L^{-1}的 $FeCl_3$、$Fe_2(SO_4)_3$、$AlCl_3$ 和 $Al_2(SO_4)_3$ 即可以引起强烈抑制效果,内毒素活性的实测值已经严重偏离实际值. 采用动态浊度 TAL 试验检测超纯水、自来水和景观用水的内毒素活性,结果表明所检测的超纯水的内毒素活性 < 0.06 EU·mL^{-1},自来水的内毒素活性为 0.46 EU·mL^{-1},景观用水的内毒素活性为 432.68 EU·mL^{-1}.

关键词:内毒素; 鲎试验; 无机盐; pH 值; 饮用水; 水环境

中图分类号: X171.5 **文献标识码**: A **文章编号**: 0250-3301(2013)09-3381-05

Detection of Endotoxin Activity in Water Environment and Analysis of Influence Factors for TAL Assay

ZHANG Can[1,2,3], LIU Wen-jun[1], ZHANG Ming-lu[1,4], TIAN Fang[1], SUN Wen[5], QIAN Ling-jia[3], ZHAN Rui[3]

(1. School of Environment, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 2. Institute of Hygiene and Environmental Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Tianjin 300050, China; 3. Institute of Basic Medicine Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China; 4. School of Food and Chemical Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing, 100048, China; 5. Department of Urology, Affiliated Beijing Friendship Hospital of Capital Medical University, Beijing 100050, China)

Abstract: Endotoxins, derived from cell walls of most Gram-negative bacteria and some cyanobacteria, are common pyrogen and highly immunogenic molecules, and related to many diseases. In this paper, a detection method for endotoxin activity in water environment using kinetic-turbid assay of *Tachypleus* Amebocyte Lysate (TAL) was established, the influence of pH and salts on TAL assay was investigated. Results showed that it was favorable for TAL assay in the pH range of 6.0-8.4, at low pHs, inhibition results were observed and opposite results were obtained at high pHs. The pH should be adjusted by Tris-HCl(pH = 7.4) buffer before the endotoxin detection. No significant interference was shown in the detection of water containing NaCl, Na_2SO_4, $CaCl_2$, $MgCl_2$ and KCl with a concentration of less than 50 mg·L^{-1}, however, the inhibition occurred at the concentration up to 1 000-10 000 mg·L^{-1}. Only 2.5 mg·L^{-1} of $FeCl_3$, $Fe_2(SO_4)_3$, $AlCl_3$ and $Al_2(SO_4)_3$ caused significant inhibition. Endotoxin activities of ultrapure water, tap water and recreational water were detected by TAL assay, and their endotoxin activities were < 0.06 EU·mL^{-1}, 0.46 EU·mL^{-1} and 432.68 EU·mL^{-1}, respectively.

Key words: endotoxin; TAL assay; saline; pH value; drinking water; water environment

内毒素,又称热原,是革兰氏阴性菌和部分蓝藻细胞壁上的脂多糖复合物,主要由菌体死亡解体时释放[1]. 内毒素是常见的外源性致热原,具有强免疫刺激能力,与人类多种疾病密切相关. 机体对内毒素反应极为敏感,Elin 等[2]报道 0.1 ~ 0.5 ng·kg^{-1}内毒素进行体内注射可以引起人体的发热反应. 因此,血液透析用水、制药用水等医疗用水由于直接与血液接触,其中的内毒素活性最早得到关注并已经严格控制[3,4]. 目前国内外尚没有将内毒素活性列入饮用水和再生水水质标准,但是国外研究中饮用水和水环境中内毒素污染通过饮用、呼吸等暴露途径引起的机体健康风险开始得到关注.

收稿日期: 2012-12-05; **修订日期**: 2013-03-11
基金项目: 国家自然科学基金项目(50978142,51008303)
作者简介: 张灿(1975 ~),女,博士,主要研究方向为饮用水和医疗用水水质安全,E-mail:zhangcancqu@163.com
* 通讯联系人,E-mail:wjliu@tsinghua.edu.cn

目前,国外研究关于水体环境如地表水、水源、自来水、污水的内毒素污染水平有少量报道,如日本淀川的内毒素活性为 311 ~2 430 EU·mL^{-1}[5]; 加拿大蒙特利尔的 13 个地表水源的内毒素活性为 32 ~1 188 EU·mL^{-1}[6]; 芬兰的水源在蓝藻暴发后内毒素活性达到 20 ~38 000 EU·mL^{-1}[7]; 科威特海水淡化后的自来水内毒素活性为 2.4 ~ 33.8 EU·mL^{-1}[8]; 污水处理厂出水内毒素活性可达 10^4 EU·mL^{-1}[9].

目前药典规定的内毒素检测方法是鲎法,又称鲎试验. 鲎是栖生于海洋中的一种古老的节肢动物,已存在大约 3.5 亿年, 有“活化石”之称. 其中美洲鲎(*Limulus* Amebocyte Lysate, LAL)和东方鲎(*Tachypleus* Amebocyte Lysate, TAL)两种用于生产鲎试剂,我国多采用 TAL 试剂. 1963 ~ 1964 年 Levin 和 Bang 最早报道鲎试验(又称 LAL/TAL 试验),其机制是鲎血中阿米巴细胞与内毒素发生一系列酶促反应导致凝集反应[10]. LAL/TAL 试验属于生物毒性测试方法,不是精确的分析方法,一些非内毒素分子如 Beta-葡聚糖也能引起相似的凝集现象. LAL/TAL 试剂为鲎血的提取物,属于生物试剂,样品中化学物质、蛋白和其他试剂容易对其产生影响. 药典明确规定,测试内毒素之前必须首先确定样品对 LAL/TAL 试验的抑制/增强效果[11]. LAL/TAL 试验中常用的消除干扰方法是样品的多倍稀释,并控制加标回收率在 50% ~200% 之内[11]. 但是对于含有严重干扰因子的样品,多倍稀释后内毒素活性可能会极低,甚至不能达到 LAL/TAL 试剂的最低检测限,这样仍难以保证合适的回收率. 因此干扰严重且不易去除的样品不适于采用 LAL/TAL 试验. 目前的相关研究中,绝大多数采用 LAL/TAL 试验测试水体环境的内毒素活性. 与药典规定的可以采用 LAL/TAL 试验检测的药品和医疗器械相比,饮用水和水环境样品成分复杂,干扰因素明显增多. 本研究采用动态浊度 TAL 试验定量检测不同环境水体样品的内毒素活性,探讨了 pH 值和无机盐对 TAL 试验的影响,并对超纯水、自来水和景观用水 3 种水样的内毒素活性进行测试.

1 材料与方法

1.1 玻璃器皿

无热原稀释试管(15 mm ×100 mm)、无热原反应试管(8 mm ×75 mm)和无热原移液器吸头购买自湛江安度斯生物公司. 其他玻璃器皿经铬酸浸泡 24 h,热自来水冲洗,超纯水冲洗,马弗炉干烘 350 ~ 400℃ 2 h 去除热原.

1.2 仪器与试剂

内毒素定量检测采用 ATI320-06 动态试管仪及配套软件(Lab Kinetic 公司,英国). pH 值测定采用酸度计(Pb-21, Sartorius 公司,德国). 余氯测定采用便携式余氯仪(HACH 公司,美国). Mill-Q 纯水机(Millipore 公司,美国). 另外,还需要涡旋混合器、马弗炉、移液器.

动态浊度法 TAL 试剂(最低检测限 0.03 EU·mL^{-1})、内毒素检查用水(<0.003 EU·mL^{-1})和无热原 Tris-HCl(pH7.4)缓冲溶液购买自湛江安度斯生物公司. 内毒素工作标准品(control standard endotoxin, CSE, 批号 150601, 90 EU/支)购买自中国药品生物制品检定所(北京). 化学试剂如 NaCl、Na_2SO_4、$CaCl_2$、$MgCl_2$、KCl、$MnCl_2$、$FeCl_3$、$Fe_2(SO_4)_3$、$AlCl_3$、$Al_2(SO_4)_3$ 和 $Na_2S_2O_3$ 为分析纯. 无热原 HCl 和 NaOH 溶液由内毒素检查用水配制.

1.3 动态浊度 TAL 试验检测内毒素活性

采用动态浊度 TAL 试验定量检测内毒素活性,将 0.1 mL TAL 试剂加入反应管,加入 0.1 mL 样品混合均匀,立即放入 ATI320-06 动态试管仪进行检测. 样品和 TAL 试剂在 37℃ 温育条件下发生凝集反应, ATI320-06 动态试管仪及软件生成每个样品的反应动态曲线,记录反应试管在波长 405 nm 处达到 95% 透光率的达限时间. 样品的达限时间和所含内毒素活性负相关,根据标准曲线来确定样品内毒素活性. 每个样品采用 2 个平行样,并以 0.1 EU·mL^{-1} CSE 溶液作为阳性对照,记录回收率、稀释倍数、达限时间等其他参数. 样品测试 3 次取均值. 试验结果应满足以下条件:① 标准曲线中阴性对照的达限时间长于最低活性 (0.031 25 EU·mL^{-1})的达限时间. ②标准曲线相关系数 R 大于 0.98. ③ 平行样的变异系数不得大于 10%. ④ 根据药典规定,加标回收率在 50% ~200% 之间认为稀释倍数合适,没有明显的干扰[11].

1.4 影响因素试验

(1)pH 值影响试验 将配制的 CSE 溶液分装至无热原玻璃容器,采用无热原 NaOH 或者 HCl 溶液调节水样 pH 值至 3.0、4.0、6.0、7.4、8.4、10.0 和 11.0,检测内毒素活性.

(2)无机盐影响试验 将配制的 CSE 溶液分装至无热原玻璃容器,与不同浓度的无机盐溶液混合均匀后,检测内毒素活性.

1.5　水样采集和预处理

超纯水样品取自 Mill-Q 纯水机出水. 自来水样品取自北京市清华大学校内的自来水. 景观用水样品取自清华大学校内的某人工湿地景观用水水池，其主要工艺为雨水贮存并回用. 采样结束后立刻进行内毒素检测. 为防止自来水和景观用水的残留消毒剂对内毒素测试干扰，先投加 0.01%（质量比）硫代硫酸钠来淬灭，然后用无热原 Tris-HCl（pH 7.4）溶液调节 pH 值.

2　结果与分析

2.1　标准曲线的建立和可靠性验证

将 CSE 溶液稀释为 2.0、1.0、0.25 和0.031 25 EU·mL^{-1}这 4 种活性，将 0.1 mL TAL 试剂加入反应管后，加入 0.1 mL CSE 溶液混合均匀，立即放入 ATI320-06 动态试管仪进行检测. 每个 CSE 样品采用 2 个平行样. 采用内毒素检查用水作为阴性对照. 以平均达限时间的对数为纵坐标，以内毒素活性的对数为横坐标绘制标准曲线，并得到回归方程：$\lg t = 2.860\,8 - 0.268\,8\lg C$（相关系数 $R = 0.997\,7$）式中，t 为透光率 95% 的达限时间（s）；C 为内毒素活性（EU·mL^{-1}）.

标准曲线的可靠性分析结果见表 1. 试验结果表明：①阴性对照的达限时间为 >2 220 s，大于最低活性（0.031 25 EU·mL^{-1}）达限时间. ②标准曲线的相关系数 R 大于 0.98. ③2 个平行样的变异系数 < 10%. 因此，该标准曲线成立.

表 1　TAL 试验标准曲线的可靠性分析

Table 1　Analysis on reliability of the standard curve for TAL assay

内毒素标准溶液 /EU·mL^{-1}	反应时间 /s	变异系数 /%	内毒素测定值 /EU·mL^{-1}
2.0	616	0.11	1.84
2.0	617		
1.0	723	0.68	1.00
1.0	730		
0.25	990	2.04	0.30
0.25	1 019		
0.031 25	1 835	3.90	0.03
0.031 25	1 939		
阴性对照	>2 220	0.00	
阴性对照	>2 220		

2.2　pH 值对 TAL 试验的影响

不同 pH 值对 TAL 试验检测内毒素的影响如图 1 所示，其中干扰系列：不调节 pH 值直接检测内毒素，对照系列：采用无热原 Tris-HCl（pH 7.4）溶液调节 pH 值后检测内毒素，即样品中内毒素的实际值. 在 pH 6.0 ~ 8.4 范围内，pH 对内毒素检测的影响不大，pH 值接近中性或者动物体液环境（pH 7.4）时最利于 LAL/TAL 试验中酶促反应的发生. 干扰系列中，pH 3.0 时内毒素活性的实测值降低为 1.24 EU·mL^{-1}；pH 11.0 时内毒素活性的实测值升高至 2.25 EU·mL^{-1}，表明过酸条件引起抑制效果，过碱条件引起增强结果. 这是因为过酸过碱条件明显破坏 LAL/TAL 试验的酶活性，降低酶促反应速度. 但是碱性条件下 LAL/TAL 试验有增强效果，这是因为 LAL/TAL 试剂中含有一定数量的 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 用来保持试剂的分散性，OH^- 的增多会影响 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的状态，导致 LAL/TAL 试剂分散性差，引起反应产物聚集导致增强结果. 对照系列中，采用无热原 Tris-HCl（pH 7.4）溶液调节 pH 值后，pH 3.0 ~ 4.0 和 pH 10.0 ~ 11.0 范围内毒素活性的实测值仅略低于初始的内毒素活性，这是因为配制不同 pH 值的 CSE 溶液过程中添加 HCl 或者 NaOH 导致内毒素有少量分解.

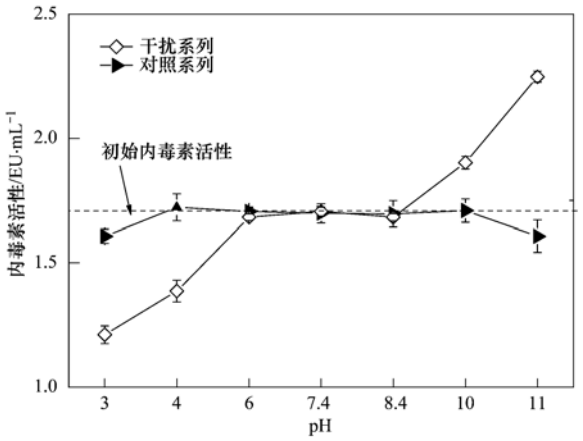

图 1　pH 值对 TAL 试验的影响

Fig. 1　Influences of pH on TAL assay

2.3　无机盐对 TAL 试验的影响

常见无机盐对 TAL 试验检测内毒素的影响如图 2 和图 3 所示. 不同浓度的 NaCl、Na_2SO_4、KCl、$CaCl_2$ 和 $MgCl_2$ 对 TAL 试验的影响如图 2 所示，在浓度 <50 mg·L^{-1}时对检测影响不大，当浓度升高至 1 000 ~ 10 000 mg·L^{-1}时有明显抑制效果，其中 KCl 和 NaCl 的抑制作用轻微，$CaCl_2$ 和 $MgCl_2$ 的抑制效果明显. 在样品处理中，经常使用 0.9% 生理盐水来保持微生物活性，但是本研究表明9 000 mg·L^{-1}的 NaCl 会轻微抑制 LAL/TAL 试验结果. 不同浓度的 $MnCl_2$、$FeCl_3$、$Fe_2(SO_4)_3$、$AlCl_3$ 和 $Al_2(SO_4)_3$ 对 TAL 试验的影响如图 3 所示，在浓度 <30 mg·L^{-1}时明显抑制 TAL 试验，其中 $MnCl_2$ 的抑制效果较弱，

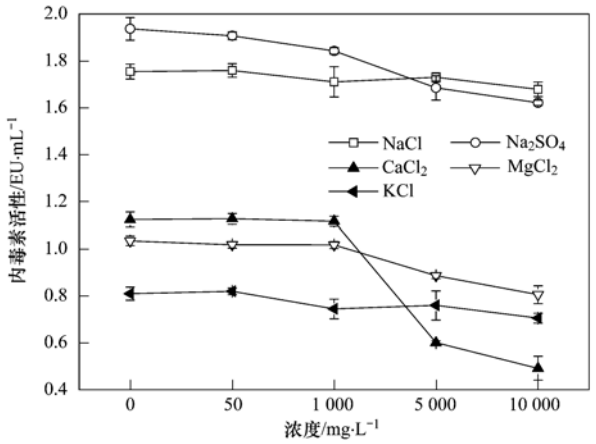

图 2 NaCl、Na_2SO_4、$CaCl_2$、$MgCl_2$ 和 KCl 对 TAL 试验的影响

Fig. 2 Influences of NaCl, Na_2SO_4, $CaCl_2$, $MgCl_2$ and KCl on TAL assay

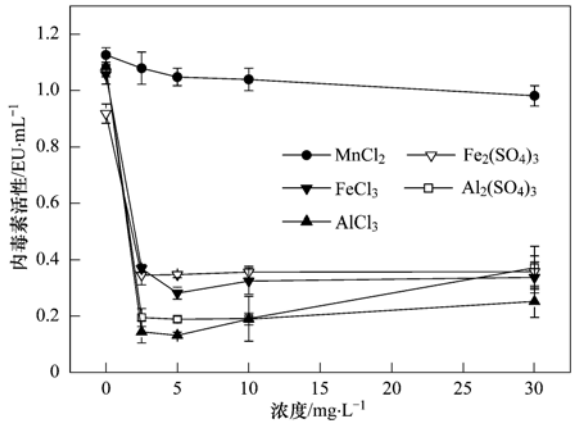

图 3 $MnCl_2$、$FeCl_3$、$Fe_2(SO_4)_3$、$AlCl_3$ 和 $Al_2(SO_4)_3$ 对 TAL 试验的影响

Fig. 3 Influences of $MnCl_2$, $FeCl_3$, $Fe_2(SO_4)_3$, $AlCl_3$ and $Al_2(SO_4)_3$ on TAL assay

$FeCl_3$、$Fe_2(SO_4)_3$、$AlCl_3$ 和 $Al_2(SO_4)_3$ 的抑制效果强烈,仅 2.5 $mg·L^{-1}$的 $FeCl_3$、$Fe_2(SO_4)_3$、$AlCl_3$ 和 $Al_2(SO_4)_3$ 即能引起强烈抑制,内毒素活性的实测值远远偏离实际含量. 随着浓度的增加,$FeCl_3$、$Fe_2(SO_4)_3$、$AlCl_3$ 和 $Al_2(SO_4)_3$ 这 4 种无机盐的抑制作用减缓,这是因为其具有絮凝作用,对 TAL 试剂和内毒素的反应产物起到凝聚作用,从而影响透光率不均匀导致增强效果. $MnCl_2$ 不具有絮凝作用,所以随着浓度的增加,$MnCl_2$ 对 TAL 试验的抑制没有减缓趋势.

无机盐对 LAL/TAL 试验的干扰主要是蛋白质的盐析作用破坏了 LAL/TAL 试剂的酶活性,降低酶促反应的速度. 其次,也可能有盐类引起 pH 值的过酸过碱导致 LAL/TAL 试验干扰. 结合图 2 和图 3 的结果看,一价阳离子(K^+ 和 Na^+)的抑制作用最弱,二价阳离子(Mg^{2+}、Ca^{2+} 和 Mn^{2+})的抑制作用次之,三价阳离子(Fe^{3+} 和 Al^{3+})的抑制作用最强,这表明无机盐对 TAL 试验的干扰程度与阳离子价态有关. 内毒素的生物活性基团是类脂 A 的酰胺基和磷酸基团,不同种类和价态的阳离子能够影响磷酸基团的组分,从而影响内毒素的检测结果. 因此,在 LAL/TAL 试验中,必须严格控制添加含三价阳离子的无机盐,或者高浓度的一价阳离子二价阳离子的无机盐,如果样品中本身含有,应该进行多倍稀释,如果仍不能达到 50% ~200% 的回收率,则不适宜采用 LAL/TAL 试验.

2.4 实际应用

本研究采用动态浊度 TAL 试验对超纯水、自来水、景观用水这 3 种水样进行内毒素测试. 结果表明,所检测超纯水的内毒素活性 <0.06 $EU·mL^{-1}$,清华大学校内自来水的内毒素活性为 0.46 $EU·mL^{-1}$,清华大学校内某景观用水的内毒素活性为 432.68 $EU·mL^{-1}$. 由表 2 可见,样品加标回收率在 50% ~200% 之间,说明试验结果可靠. 所检测的景观用水的内毒素污染水平高,经过无热原检查用水1 200倍稀释后,才能达到 50% ~200% 加标回收率范围. 景观用水中成分复杂,具有多种干扰因素,但是其内毒素活性也很高,采用无热原检查用水 1 200倍稀释后内毒素活性仍然远远高于 TAL 试剂的最低检测限(0.03 $EU·mL^{-1}$),而且稀释后的干扰因子对 TAL 试验的影响效果不明显,因此检测结果可靠.

表 2 不同水样的内毒素检测结果

Table 2 Endotoxin detection of different water samples

样品	稀释倍数	测定值 /EU·mL⁻¹	加标量 /EU·mL⁻¹	回收率/%
超纯水	2	<0.06	0.25	124.5
自来水	2	0.46	0.25	108.3
景观用水	200	—	0.25	277.2
	600	—	0.25	216.8
	1 200	432.68	0.25	132.8

3 结论

本研究采用动态浊度 TAL 试验定量检测不同水样的内毒素活性,分析了 pH 值和无机盐对 TAL 试验的影响. 结果表明, pH 值在 6.0 ~8.4 范围内适合进行内毒素检测,过酸条件引起检测结果的抑制,过碱条件明显引起检测结果的增强. 当 NaCl、Na_2SO_4、$CaCl_2$、$MgCl_2$ 和 KCl 浓度小于 50 $mg·L^{-1}$ 条件时,不会引起内毒素检测的干扰,当浓度升高至 1 000 ~10 000 $mg·L^{-1}$ 范围可以引起抑制. $FeCl_3$、

$Fe_2(SO_4)_3$、$AlCl_3$ 和 $Al_2(SO_4)_3$ 的浓度在 2.5 $mg\cdot L^{-1}$时引起强烈的抑制效果,内毒素活性的实测值已经严重偏离实际含量. 无机盐对 TAL 试验的干扰程度与阳离子价态有关,一价阳离子(K^+ 和 Na^+)的抑制作用最弱,二价阳离子(Mg^{2+}、Ca^{2+} 和 Mn^{2+})的抑制作用次之,三价阳离子(Fe^{3+} 和 Al^{3+})的抑制作用最强. 采用动态浊度 TAL 试验对超纯水、自来水和景观用水的内毒素活性进行定量检测,结果表明所检测的超纯水的内毒素含量 < 0.06 $EU\cdot mL^{-1}$,自来水的内毒素活性为 0.46 $EU\cdot mL^{-1}$,景观用水的内毒素含量为 432.68 $EU\cdot mL^{-1}$.

参考文献:

[1] Stewart I, Schluter P J, Shaw G R. Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health-a review [J]. Environmental Health, 2006, **5**: 7.

[2] Elin R J, Wolff S M, McAdam K P, *et al*. Properties of reference *Escherichia coli* endotoxin and its phthalylated derivative in humans[J]. The Journal of Infectious Diseases, 1981, **144**(4): 329-336.

[3] Anderson W B, Slawson R M, Mayfield C I. A review of drinking-water-associated endotoxin, including potential routes of human exposure[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2002, **48**(7): 567-587.

[4] Hindman S H, Favero M S, Carson L A, *et al*. Pyrogenic reactions during haemodialysis caused by extramural endotoxin [J]. Lancet, 1975, **2**(7938): 732-734.

[5] Ohkouchi Y, Ishikawa S, Takahashi K, *et al*. Factors associated with endotoxin fluctuation in aquatic environment and characterization of endotoxin removal in water treatment process [J]. Environmental Engineering Research, 2007, **44**: 247-254.

[6] Annadotter H, Cronberg G, Nystrand R, *et al*. Endotoxins from cyanobacteria and gram-negative bacteria as the cause of an acute influenza-like reaction after inhalation of aerosols[J]. Ecohealth, 2005, **2**(3): 209-221.

[7] Gehr R, Uribe S P, Baptista I F D, *et al*. Concentrations of endotoxins in waters around the island of Montreal, and treatment options[J]. Water Quality Research Journal of Canada, 2008, **43**(4): 291-303.

[8] Abdulraheem A, Mustafa S, Al-Saffar N, *et al*. Detection of bacterial endotoxin in drinking tap and bottled water in Kuwait [J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2012, **184**(12): 7323-7328.

[9] O'Toole J, Sinclair M, Jeavons T, *et al*. Alternative water sources and endotoxin [J]. Water Science and Technology, 2008, **58**(3): 603-607.

[10] Levin J, Bang F B. Clottable protein in Limulus-its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin[J]. Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica, 1968, **19**(1): 186-197.

[11] 中国国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2005. vol(Ⅱ): 76-82.

HUANJING KEXUE

Environmental Science (monthly)

Vol. 34 No. 9

Sep. 15, 2013

CONTENTS

PUF Passive Air Sampling of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Atmosphere of the Yangtze River Delta, China: Spatio-Temporal Distribution and Potential Sources ····· ZHANG Li-fei, YANG Wen-long, DONG Liang, *et al.* (3339)

Quantitative Analysis of Nitrate in Atmospheric Particulates $PM_{2.5}$ with Fourier Transform Infrared Spectroscopy ····· LIU Na, WEI Xiu-li, GAO Min-guang, *et al.* (3347)

Study on Contribution Factor to Atmospheric ·OH by O_3, HONO, HCHO and H_2O_2 in Spring at Mangdang Mountain, Fujian Province ····· LIU Hao, WANG Hui-xiang (3352)

A Review on Current Situations of Steroid Estrogen in the Water System ····· DU Shao-ting, JIN Chong-wei, LIU Yue (3358)

A Study on the Veterinary Antibiotics Contamination in Groundwater of Jiaxing ····· LÜ Xing, YU Wei-juan, LAN Ya-qiong, *et al.* (3368)

Contamination Characteristics of Short-Chain Chlorinated Paraffins in Edible Fish of Shanghai ····· JIANG Guo, CHEN Lai-guo, HE Qiu-sheng, *et al.* (3374)

Detection of Endotoxin Activity in Water Environment and Analysis of Influence Factors for TAL Assay ····· ZHANG Can, LIU Wen-jun, ZHANG Ming-lu, *et al.* (3381)

Cellular Response of Freshwater Green Algae to the Toxicity of Tetracycline Antibiotics ····· XU Dong-mei, WANG Yan-hua, RAO Gui-wei (3386)

Illumination's Effect on the Growth and Nitrate Reductase Activity of Typical Red-Tide Algae in the East China Sea ····· LI Hong-mei, SHI Xiao-yong, DING Yan-yan, *et al.* (3391)

Compare the Growth of *Enteromorpha prolifera* Under Different Nutrient Conditions ····· PANG Qiu-ting, LI Feng, LIU Xiang-qing, *et al.* (3398)

Phytoplankton Pigment Patterns and Community Structure in the Yangtze Estuary and Its Adjacent Areas ····· LAI Jun-xiang, YU Zhi-ming, SONG Xiu-xian, *et al.* (3405)

Genetic Diversity of Picoeukaryotic Phytoplankton in the Lakes Along the Middle-lower Reaches of the Yangtze River ····· LI Sheng-nan, SHI Xiao-li, XIE Wei-wei, *et al.* (3416)

Studies on Seasonal Variation and Sources of Nitrogen and Phosphorus in a Canyon Reservoir Used as Water Source ····· HUANG Ting-lin, QIN Chang-hai, LI Xuan (3423)

Characteristics of Sediment Phosphorus in the Jiulong River-Reservoir System and Its Ecological Significance ····· LU Ting, CHEN Neng-wang, CHEN Zhu-hong, *et al.* (3430)

Variation of Nitrogen During the High Suspended Sediments Concentration Water Supply in an Artificial Shallow Lake ····· CHEN You-yuan, SHEN Yu, YANG Shi-ying (3437)

Limestone and Pyrite-Limestone Constructed Wetlands for Treating River Water ····· ZHANG Jing, LI Rui-hua, LI Jie, *et al.* (3445)

Dynamics of Carbon, Nitrogen and Phosphorus Storage of Three Dominant Marsh Plants in Hangzhou Bay Coastal Wetland ····· SHAO Xue-xin, LI Wen-hua, WU Ming, *et al.* (3451)

Dissolved Organic Matter Release of *Zizania caduciflora* and *Phragmites australis* from Lake Dianchi ····· XIE Li, YANG Hao, QU Xiao-xia, *et al.* (3458)

Influence of Tap Water Treatment on Perfluorinated Compounds Residue in the Dissolved Phase ····· ZHANG Hong, CHEN Qing-wu, WANG Xin-xuan, *et al.* (3467)

Study on Chlorinated Disinfection Byproducts and the Relevant Health Risk in Tap Water of J City ····· LI Xiao-ling, LIU Rui, LAN Ya-qiong, *et al.* (3474)

Effect of the Change in Sulphate and Dissolved Oxygen Mass Concentration on Metal Release in Old Cast Iron Distribution Pipes ····· WU Yong-li, SHI Bao-you, SUN Hui-fang, *et al.* (3480)

Research on Low-level Hg(Ⅱ) Removal from Water by the Heavy Metal Capturing Agent ····· HU Yun-jun, SHENG Tian-tian, XUE Xiao-qin, *et al.* (3486)

Coagulation Characteristics of Polyferric Chloride-Poly (Epichlorohydrin-Dimethylamine) Composite Flocculant for Simulated Water Treatment ····· LIU Xin-xin, YANG Zhong-lian, GAO Bao-yu, *et al.* (3493)

Microstructure Morphology and Flocculation Mechanism of the Decolorizing Flocculant Poly-aluminum(Ⅲ)-magnesium(Ⅱ)-sulfate ····· SANG Yi-min, CHANG Xue-hong, CHE Yue, *et al.* (3502)

Efficient Degradation of Tetrabromobisphenol A in Water by Co-doped $BiFeO_3$ ····· OUYANG Lei, DING Yao-bin, ZHU Li-hua, *et al.* (3507)

Preparation Bimetallic Heterogeneous Fenton-Like Catalyst as Sepiolite Supported and Its Surface Chemical Characterization ····· SU Cheng-yuan, LI Wei-guang, LIU Xing-zhe, *et al.* (3513)

Nitrite Denitrification Characteristics with Redox Mediator ····· ZHAO Li-jun, MA Zhi-yuan, GUO Yan-kai, *et al.* (3520)

Advanced Nitrogen Removal Using Innovative Denitrification Biofilter with Sustained-Release Carbon Source Material ····· TANG Lei, LI Peng, ZUO Jian-e, *et al.* (3526)

N_2O Production in Nitrogen Removal by Micro-expansion of Granular Sludge ····· CHEN Li-li, GAO Da-wen (3532)

Sludge Dewaterability with Combined Conditioning Using Fenton's Reagent and CPAM ····· MA Jun-wei, LIU Jie-wei, CAO Rui, *et al.* (3538)

Kinetic Characteristics of High-rate ANAMMOX Granules ····· TANG Chong-jian, XIONG Lei, WANG Yun-yan, *et al.* (3544)

Monitoring Nitrogen Deposition on Temperate Grassland in Inner Mongolia ····· ZHANG Ju, KANG Rong-hua, ZHAO Bin, *et al.* (3552)

Non-Point Loads of Soluble Cadmium by *in situ* Field Experiment with Different Landuses, in Central Hunan Province Mining Area ····· LIU Xiao-li, ZENG Zhao-xia, CHEN Zhe, *et al.* (3557)

Heavy Metal Speciation and Stability in the Sediment of Lihu Lake ····· WANG Shu-hang, WANG Wen-wen, JIANG Xia, *et al.* (3562)

Analysis and Evaluation of Heavy Metals Along the Chaohe River in Miyun County ····· YU Yang, GAO Hong-chao, MA Jun-hua, *et al.* (3572)

Magnetic Properties of Topsoils in Typical Industrial Belt Along the Yellow River in Arid Regions in Northwest China and Their Environmental Significance ····· XU Shu-jing, ZHANG Ying, YU Ye, *et al.* (3578)

Study on Composite Stabilization of Arsenic (As) Contaminated Soil ····· WANG Hao, PAN Li-xiang, ZHANG Xiang-yu, *et al.* (3587)

Heavy Metal Contents and Enrichment Characteristics of Dominant Plants in a Lead-Zinc Tailings in Xiashuiwan of Hunan Province ····· HE Dong, QIU Bo, PENG Jin-hui, *et al.* (3595)

Comparison of Soil Fertility Among Open-pit Mine Reclaimed Lands in Antaibao Regenerated with Different Vegetation Types ····· WANG Xiang, LI Jin-chuan, YUE Jian-ying, *et al.* (3601)

Biodegradation of Triphenyltin and Its Effect on *Klebsiella pneumoniae* ····· YE Jin-shao, TIAN Yun, YIN Hua, *et al.* (3607)

Isolation and Degradation Characteristics of Dichloromethane-Degradation Bacterial Strain by *Methylobacterium rhodesianum* H13 ····· LIU Hong-xia, ZHU Run-ye, OUYANG Du-juan, *et al.* (3613)

Effect of Different Primers on Microbial Community of Activated Sludge ····· XU Ai-ling, WU Deng-deng, SONG Zhi-wen, *et al.* (3620)

Reaction of SO_2 over CaAl Mixed Oxides Derived from Hydrotalcites Samples ····· CAO Lin, WANG Hai-lin, XIE Qiang (3627)

Optimization for MSW Logistics of New Xicheng and New Dongcheng Districts in Beijing Based on the Maximum Capacity of Transfer Stations ····· YUAN Jing, Li Guo-xue, ZHANG Hong-yu, LUO Yi-ming *et al.* (3633)

Application of Multiple Lines of Evidence Analysis Technology in the Assessment of Sites Contaminated by Heavy Metals ····· JIANG Lin, ZHONG Mao-sheng, ZHU Xiao-ying, *et al.* (3641)

Heavy Metals and Their Sources in Outdoor Settled Dusts in Different Function Areas of Cities ····· LI Xiao-yan, LIU Yan-qing (3648)

Study on Distribution Characteristics and Potential Ecological Risk of Soil Heavy Metals in the Yellow River Beach Region in Kaifeng City ····· ZHANG Peng-yang, QIN Ming-zhou, YAN Jiang-hong, *et al.* (3654)

Study on Pollution Evaluation of Heavy Metal in Surface Soil of the Original Site of Qingdao North Station ····· ZHU Lei, JIA Yong-gang, PAN Yu-ying (3663)

Distribution Characteristics and Ecological Risk of Pb in Soils at a Lead Battery Plant ····· ZHENG Li-bao, CHEN Wei-ping, JIAO Wei-tao, *et al.* (3669)

Effect of Lead on Soil Quality and Human Health Around a Lead Smeltery ····· ZHOU Xiao-yong, LEI Mei, YANG Jun, *et al.* (3675)

Distribution Characteristics of Lead in Different Particle Size Fractions of Surface Soil of a Lead-acid Battery Factory Contaminated Site ····· YUE Xi, SUN Ti-chang, HUANG Jin-lou (3679)

Research on the Application of *In-situ* Biological Stabilization Solidification Technology in Chromium Contaminated Site Management ····· ZHANG Jian-rong, LI Juan, XU Wei (3684)

Research on the Effect and Technique of Remediation for Multi-Metal Contaminated Tailing Soils ····· ZHU Guang-xu, GUO Qing-jun, YANG Jun-xing, *et al.* (3690)

Analysis of Washing Efficiency and Change in Lead Speciation in Lead-contaminated Soil of a Battery Factory ····· REN Bei, HUANG Jin-lou, MIAO Ming-sheng (3697)

Remediation Efficiency of Lead-Contaminated Soil at an Industrial Site by Ultrasonic-assisted Chemical Extraction ····· WANG Xin-jie, HUANG Jin-lou, LIU Zhi-qiang, *et al.* (3704)

Parameters Optimization and Cleaning Efficiency Evaluation of Attrition Scrubbing Remediation of Pb-Contaminated Soil ····· YANG Wen, HUANG Jin-lou, PENG Hui-qing, *et al.* (3709)

Adsorption of Cd^{2+} on Biochar from Aqueous Solution ····· GUO Wen-juan, LIANG Xue-feng, LIN Da-song, *et al.* (3716)

Effect of Inorganic Amendments on the Stabilization of Heavy Metals in Contaminated Soils ····· CAO Meng-hua, ZHU Xi, LIU Huang-cheng, *et al.* (3722)

《环境科学》第 6 届编辑委员会

主　编：欧阳自远

副主编：赵景柱　郝吉明　田　刚

编　委：（按姓氏笔画排序）

万国江　王华聪　王凯军　王绪绪　田　刚　田　静　史培军

朱永官　刘志培　汤鸿霄　陈吉宁　孟　伟　周宗灿　林金明

欧阳自远　赵景柱　姜　林　郝郑平　郝吉明　聂永丰　黄　霞

黄　耀　鲍　强　潘　纲　潘　涛　魏复盛

环 境 科 学

（HUANJING KEXUE）

（月刊　1976 年 8 月创刊）

2013 年 9 月 15 日　34 卷　第 9 期

ENVIRONMENTAL SCIENCE

（Monthly　Started in 1976）

Vol. 34　No. 9　Sep. 15, 2013

主　　管	中国科学院	**Superintended** by	Chinese Academy of Sciences
主　　办	中国科学院生态环境研究中心	**Sponsored** by	Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences
协　　办	（以参加先后为序） 北京市环境保护科学研究院 清 华 大 学 环 境 学 院	**Co-Sponsored** by	Beijing Municipal Research Institute of Environmental Protection School of Environment, Tsinghua University
主　　编	欧 阳 自 远	**Editor-in -Chief**	OUYANG Zi-yuan
编　　辑	《环境科学》编辑委员会 北京市 2871 信箱（海淀区双清路 18 号，邮政编码：100085） 电话：010-62941102，010-62849343 传真：010-62849343 E-mail：hjkx@ rcees. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn	**Edited** by	The Editorial Board of Environmental Science（HUANJING KEXUE） P. O. Box 2871, Beijing 100085, China Tel：010-62941102, 010-62849343; Fax：010-62849343 E-mail：hjkx@ rcees. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn
出　　版	科 学 出 版 社 北京东黄城根北街 16 号 邮政编码：100717	**Published** by	Science Press 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
印 刷 装 订	北京北林印刷厂	**Printed** by	Beijing Bei Lin Printing House
发　　行	科 学 出 版 社 电话：010-64017032 E-mail：journal@ mail. sciencep. com	**Distributed** by	Science Press Tel：010-64017032 E-mail：journal@ mail. sciencep. com
订　购　处	全国各地邮电局	**Domestic**	All Local Post Offices in China
国外总发行	中国国际图书贸易总公司 （北京 399 信箱）	**Foreign**	China International Book Trading Corporation（Guoji Shudian）, P. O. Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号：ISSN 0250-3301 / CN 11-1895/X　　**国内邮发代号**：2-821

国 内 定 价：90.00 元　　**国外发行代号**：M 205

国 内 外 公 开 发 行