

微囊藻毒素在大型潜流人工湿地中的去除效果

范亮¹, 黄津辉²

(1. 重庆交通大学 河海学院, 重庆 400074; 2. 南开大学 环境科学与工程学院, 天津 300071)

摘要: 在优化酶联免疫吸附分析方法(ELISA)的基础上,测定了人工湿地系统中的微囊藻毒素浓度,考察了大型潜流人工湿地对北方城市河道水体中微囊藻毒素的去除效果。结果表明,优化后的ELISA法能够准确测定水体中低浓度的微囊藻毒素,准确性>76%。人工湿地进水中的微囊藻毒素浓度呈季节性变化,5月—6月浓度最高,其次是9月—11月、7月—8月,3月—4月浓度最低;人工湿地对微囊藻毒素的去除率在47.03%~87.22%之间,平均为59.25%。不同植物组合(芦苇/千屈菜/鸢尾、香蒲/千屈菜/花叶芦荻/鸢尾、芦苇/千屈菜)湿地单元对水体中微囊藻毒素的去除无显著差异,平均去除率分别为58.9%、57.5%、62.0%,低浓度微囊藻毒素的去除与潜流人工湿地的植被生长状况无显著性关系。

关键词: 大型潜流人工湿地; 微囊藻毒素; 酶联免疫吸附分析方法

中图分类号: TU992 **文献标识码:** C **文章编号:** 1000-4602(2018)13-0086-05

Removal Effect of Microcystins by a Large-scale Subsurface Flow Constructed Wetland

FAN Liang¹, HUANG Jin-hui²

(1. School of River and Ocean Engineering, Chongqing Jiaotong University, Chongqing 400074, China; 2. College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: Based on optimized enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), microcystins (MCs) concentration and their removal efficiency from urban water body in northern China by a large-scale subsurface flow constructed wetland system was studied. The results showed that the optimized ELISA could accurately determine the low concentration of MCs with accuracy higher than 76%. The MCs concentration in influent of the constructed wetland varied seasonally: the concentrations were the highest from May to June, the next were September to November and July to August, and concentrations were the lowest from March to April. The removal rates of MCs were between 47.03% and 87.22% with an average removal rate of 59.25%. Wetland units with different vegetation combinations (*Phragmites communis*/*Lythrum salicaria*/*Iris tectorum*, *Typha latifolia*/*Lythrum salicaria*/*Arundo donax* var. *versicolor*/*Iris tectorum*, and *Phragmites communis*/*Lythrum salicaria*) did not show significant impacts on the removal of MCs in water body, where the average removal rates were 58.9%, 57.5% and 62.0% respectively. There was no significant relationship between the removal of low concentration MCs and the

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFC0400700)

通信作者: 黄津辉 E-mail: huangj@nankai.edu.cn

vegetation growth of the subsurface constructed wetland.

Key words: large-scale subsurface flow constructed wetland; microcystin; ELISA

近年来随着水体富营养化的日益加剧,蓝藻水华暴发带来的微囊藻毒素(MCs)污染成为一个令人关注的环境问题^[1]。目前,水体中微囊藻毒素的测定方法主要有化学分析方法和生物化学分析方法^[2~4],其中,生物化学分析方法主要包括酶联免疫吸附分析法(ELISA)、蛋白磷酸酶抑制分析法(PPIA)、免疫检测法、蛋白磷酸酶抑制法-比色法、放射性免疫法等,相比化学分析方法,分析速度快且灵敏度较高。ELISA 法操作过程简便快速,特异性好、灵敏度高,检测成本较低,是现代分析检测技术发展的一个方向^[5]。笔者在对 ELISA 方法进行优化后,可以准确测定痕量微囊藻毒素并以较高的准确率通过了美国科学公司(Abraxis)的样品盲测。

目前对人工湿地系统去除水体中氮、磷等污染物的研究较多,而对去除微囊藻毒素的研究较少^[6,7],且大多在实验室进行,对大型人工湿地的长期监测研究目前还很缺乏。我国北方的河道和湖泊在秋季藻毒素浓度常常较高^[8,9],而此时人工湿地的运行效果常常低于夏季高温微生物生长活跃的时期,因此考察人工湿地的全年长期运行效果有比较重要的意义。笔者对大型潜流人工湿地系统进水口和 3 个出水口的微囊藻毒素浓度进行了长达 1 年的连续监测,研究了该系统对水体中低浓度微囊藻毒素的去除效果。

1 材料与方法

1.1 潜流人工湿地系统

该人工湿地位于天津市滨海新区,在 2016 年 5 月份开始运行,旨在提升城市河道现状水质,达到景观水质要求。人工湿地总长为 1 000 m、宽为 55 m,总面积为 5.5 hm²。河道水自流进入提水泵池,沉淀后的河水通过有压管道及利用阀门的调节作用均匀进入每个潜流湿地单元。潜流单元由下行池和上行池两个在底部连通的单元组成(见图 1),湿地底部用混凝土密封。人工湿地的水力负荷为 0.35 m³/(m²·d),水力停留时间为 1.2 d,由 7 个潜流湿地单元组成,各湿地单元上、下行水池基质上种植不同的植物,植被密度为 16 株/m²。各湿地单元系统填充基质为不同粒径的砾石,自上而下分别是粒径为 0.5~5 mm 的碎石、5~10 mm 的砾石和 0.5~1

cm 的米石,填料深度分别为 0.4、0.4 和 0.5 m。湿地单元 1~4 处理出水经出水口 1 排入原河道,湿地单元 5 和 6 处理出水经出水口 2 排入原河道,湿地单元 7 处理出水经出水口 3 排入原河道。

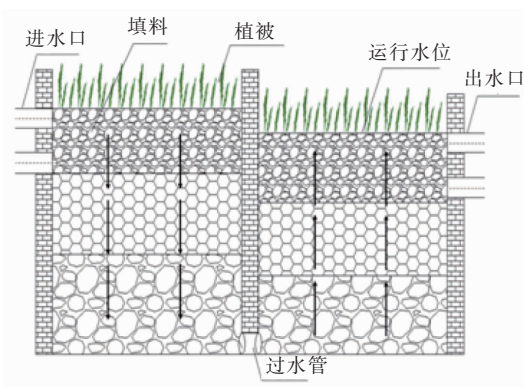


图 1 潜流人工湿地局部设计示意

Fig. 1 Schematics of subsurface flow constructed wetland

1.2 试验水样采集和保存

试验水样取自潜流人工湿地的进水口和 3 个出水口,样品采集在晴天进行,采样时间为 2016 年 10 月—2017 年 11 月,其中 2016 年 12 月和 2017 年 1 月、2 月由于人工湿地停止运行而没有采样,采样频率为 1~2 次/月,根据天气调整。使用透明玻璃样品瓶进行微囊藻毒素样品的采集,用冰袋冰冻运回实验室。样品放在 -20 ℃ 冰箱中冰冻保存待测。

1.3 微囊藻毒素的检测

采用 ELISA 方法测定水样中的微囊藻毒素浓度,通过试验条件和标准曲线拟合优化 ELISA 方法。比较了待测溶液在振荡和不振荡(厂家建议)培养条件下的检测结果,并对 4 参数、双对数和对数曲线的拟合结果进行了评估。

① 水样预处理。测定前将待测水样冻融两次,待水样恢复至室温后,从采样瓶中取出 200 μL 水样于 1.5 mL 离心管中,在 5 000 r/min 下离心 3 min,取上清液进行测定。

② 水样测定。使用酶标仪在 450 nm 下测定空白微量滴定板的吸光度。将 50 μL 的标准溶液、质量控制标液、操作空白和待测水样加入到空的微量滴定板。使用 8 通道移液枪快速加入抗体溶液(50 μL)。在旋涡混合仪中振荡培养(400 r/min,下同)30 min,使用 250 μL 清洗液洗涤微量滴定板 5

次。加入 100 μL 共轭溶液,旋涡混合仪振荡培养 90 min,清洗液清洗(同上)。随后,加入 100 μL 底物溶液在黑暗处反应 25 min,底物通过酶结合物转化成蓝色化合物。最后,加入 50 μL 停止液终止反应。在 15 min 内于 450 nm 下测定溶液吸光度。

③ 结果分析。标准样品的吸光度值除以空白溶液的吸光度值得到标准样品的吸光度比值。将标准样品的浓度与吸光度比值做成标准曲线。

2 结果与分析

2.1 ELISA 方法优化

经振荡培养后的标准溶液,拟合得到的标准曲线确定系数(r^2)明显高于不振荡培养。振荡处理中,4 参数曲线的 $r^2 > 0.990$,优于双对数曲线和对数曲线(见图 2,NSK 代表不振荡,SK 代表振荡,下同)。振荡培养标准溶液的准确度较高,较不振荡培养更接近样品真实值,振荡培养的 4 参数曲线拟合结果准确度高于双对数曲线和对数曲线(见图 3),表明通过振荡培养,4 参数曲线拟合的试验结果准确度高。

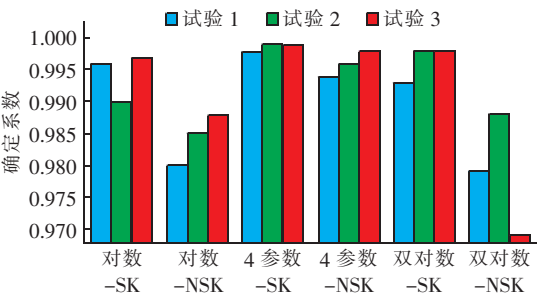


图 2 不同处理标准曲线的确定系数

Fig. 2 Determination coefficient of standard curve of different tests

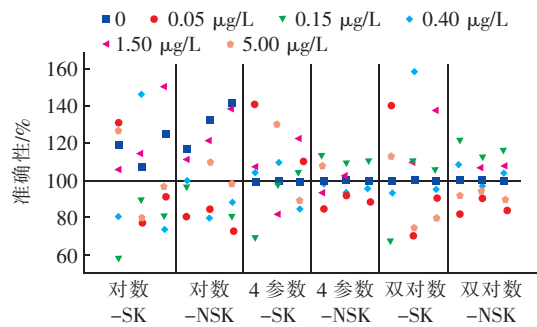


图 3 不同处理标准溶液的准确性

Fig. 3 Results accuracy of different tests on standard solution

2.2 ELISA 方法准确性测定

美国 EPA 已认证 Abraxis 的 No. 520011 试剂盒具有较高的准确性,本试验使用的 ELISA 试剂盒是高灵敏度的 No. 520011 SAES。盲测试验结果见表 1,各样品准确性达到 80% 以上,美国 Abraxis 公司反馈的盲测结果全部满意,表明试验操作具有较高的准确性。

表 1 Abraxis 公司盲测试验结果

Tab. 1 Blind test results of Abraxis Company

样 品	样品真值/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	加标物质	盲测值/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	准确性/ 性/%
17MC-TK-1	1.5	MC-LR, MC-LA, MC-YR	1.53	98
17MC-TK-2	0	无	0	100
17MC-TK-3	0.5	MC-LR	0.42	84
17MC-TK-4	2	MC-LR, MC-YR	1.92	96
17MC-TK-5	1.25	MC-LR	1.18	94.4
17MC-TK-6	3	MC-LR, MC-RR, MC-YR	3.24	92

本研究通过测定 ELISA 试剂盒提供的空白样品($n = 32$)来确定其检出限(LOD)和定量限(LOQ),分别为 0.011、0.032 $\mu\text{g/L}$ 。选取介于检出限和定量限以及低于检出限的人工湿地样品进行加标回收测定,样品中加入等体积的浓度为 1.5 $\mu\text{g/L}$ 的 MC-LR 标准物质,测定人工湿地中的低浓度微囊藻毒素,结果见表 2,可以看出,ELISA 试剂盒测定低浓度微囊藻毒素的准确性高于 76%,满足试验要求。

表 2 加标回收法测定人工湿地中的低浓度微囊藻毒素

Tab. 2 Determination of trace MCs in constructed wetland by addition recovery method

样品真值/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	平均加标浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	加标回收率/%
0.016	0.579	76.12
0.012	0.644	85.11
0.002	0.612	81.48
0.001	0.584	77.77

2.3 MCs 浓度的季节性变化

对微囊藻毒素(MCs)长达 1 年的监测数据显示,河道原水中的 MCs 浓度在 5 月和 6 月达到最高,分别为 0.099 和 0.093 $\mu\text{g/L}$;秋季 10 月和 11 月的 MCs 浓度次之,分别为 0.085、0.049 $\mu\text{g/L}$ (2016 年)和 0.06、0.054 $\mu\text{g/L}$ (2017 年),分析原因,主要

是秋季藻类死亡后,胞内 MCs 释放到水体中,造成 MCs 浓度升高;3 月和 4 月的 MCs 浓度较低,分别为 0.027 和 0.014 $\mu\text{g/L}$ (见图 4)。高振美^[10]和王靖国^[11]等人在研究太湖水体 MCs 的季节变化特征时也发现了类似的规律。由此可知,微囊藻毒素的季节变化较大,10 月份北方已进入深秋季节,温度显著下降,人工湿地的处理效率相对有所降低,而微囊藻毒素浓度不降反升,这给人工湿地的运行带来了一定的考验。

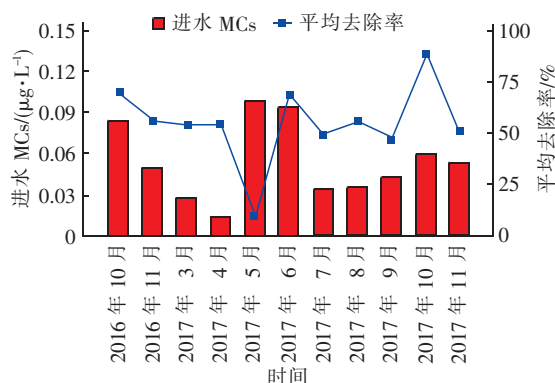


图4 人工湿地系统进水 MCs 浓度及其去除率

Fig. 4 Influent concentration and removal effect of MCs in constructed wetland

2.4 人工湿地系统对 MCs 的去除效果

如图 4 所示,人工湿地对 MCs 有一定的去除效果,5 月份由于河水倒灌入湿地,造成 MCs 去除率仅为 10%。除了 5 月份以外(下同),MCs 去除率在 47.03% ~ 87.22% 之间,平均为 59.25%。通过不同月份的 MCs 去除率进行方差分析,得到 $F = 5.86 > 2.30 (p = 0.05)$,说明不同月份的 MCs 去除率有显著性差异。2017 年 10 月的 MCs 去除率最高,平均为 87.22%;2017 年 9 月的 MCs 去除率最低,平均为 47.03%。此外,2016 年 10 月、11 月和 2017 年 6 月、10 月、11 月的进水 MCs 浓度比其他月份要高,MCs 去除率同时也较高,表明人工湿地系统对 MCs 的去除效果比较稳定,并不因环境温度的影响而有较大的波动。

吴振斌等^[6]以发生水华的鱼塘水作为进水灌溉人工湿地系统,系统内分别种植芦苇/水葱组合和茭白/石菖蒲组合,一周后测得两套人工湿地对 MCs 的去除率分别为 68.5%、34.6%。本试验结果表明,潜流人工湿地能够稳定去除低浓度 MCs,与前人的研究结果基本一致。潜流人工湿地系统对水体中

MCs 的去除可能主要是通过湿地单元内基质吸附、植物根系微环境的物理截留和絮凝沉淀以及微生物的降解作用来实现。

2.5 不同植物组合方式对 MCs 的去除效果

香蒲、千屈菜、花叶芦荻、鸢尾和芦苇是常用的人工湿地植物,本人工湿地系统选取不同的植物组合:湿地单元 1~4 采用芦苇/千屈菜/鸢尾组合(组合 I),湿地单元 5 和 6 采用香蒲/千屈菜/花叶芦荻/鸢尾组合(组合 II),湿地单元 7 采用芦苇/千屈菜组合(组合 III)。相同运行条件下,不同植被组合湿地单元对水体中 MCs 的去除率如图 5 所示。通过方差分析表明,不同植物组合湿地单元对 MCs 的去除效果全年没有显著差异,植被组合 I、II 和 III 人工湿地单元对 MCs 的平均去除率分别为 58.9%、57.5%、62.0%,表明常用的人工湿地植物对痕量 MCs 的去除率影响不显著,在兼顾观赏价值、食用价值及生物多样性的情况下,可进行一定的套种和间种。湿地单元的植被在 3 月份基本没有生长,4 月份开始逐渐生长。经 t 检验,3 种植被组合方式在 3 月份的 MCs 去除率与其他月份无显著差异,表明潜流人工湿地对低浓度 MCs 的去除与植被生长状况无显著关系。

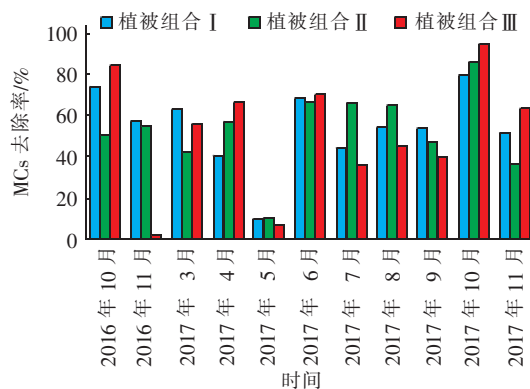


图5 不同植被组合湿地单元对 MCs 的去除效果

Fig. 5 Removal of MCs by constructed wetland units with different plants

3 结论

① 优化后的酶联免疫分析方法能够准确测定水体中痕量的微囊藻毒素,准确性 $> 76\%$,满足试验测定要求。

② 对大型潜流人工湿地系统的 MCs 浓度进行长达 1 年的监测,河道水体中的 MCs 浓度呈季节性变化:5 月—6 月 $>$ 9 月—11 月 $>$ 7 月—8 月 $>$ 3

月—4月,人工湿地对MCs的去除率在47.03%~87.22%之间,平均为59.25%。

③ 本研究中不同植物组合方式(芦苇/千屈菜/鸢尾、香蒲/千屈菜/花叶芦荻/鸢尾、芦苇/千屈菜)的人工湿地单元对水体中微囊藻毒素的去除效果全年无显著差异,平均去除率分别为58.9%、57.5%、62.0%。

参考文献:

- [1] 冯小刚. 环境中微囊藻毒素的检测、提纯及其紫外光助催化降解的研究[D]. 南京:东南大学,2006.
Feng Xiaogang. Determination, Purification and Degradation by Photo-advanced Oxidation of Microcystins [D]. Nanjing: Southeast University, 2006 (in Chinese).
- [2] Foss A J, Aubel M T. Using the MMPB technique to confirm microcystin concentrations in water measured by ELISA and HPLC (UV, MS, MS/MS) [J]. *Toxicon*, 2015, 104: 91–101.
- [3] Pu H P, Cai Q, Pan X J. Sensitive determination of total microcystins in water by derivatization – gas chromatography – mass spectrometry [J]. *Adv Mater Res*, 2014, 955/959: 1321–1325.
- [4] Ikehara T, Imamura S, Oshiro N, *et al.* A protein phosphatase 2A (PP2A) inhibition assay using a recombinant enzyme for rapid detection of microcystins [J]. *Toxicon*, 2008, 51(8): 1368–1373.
- [5] 余天莉,蒲朝文,何军. 饮用水中微囊藻毒素快速检测方法的应用研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2007, 17(2): 298, 322.
Yu Tianli, Pu Chaowen, He Jun. Study on application of fast detective method for microcystins in drinking water [J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2007, 17(2): 298, 322 (in Chinese).
- [6] 吴振斌,陈辉蓉,雷腊梅,等. 人工湿地系统去除藻毒素研究[J]. *长江流域资源与环境*, 2000, 9(2): 242–247.
Wu Zhenbin, Chen Huirong, Lei Lamei, *et al.* Study of the effect of constructed wetland on the removal of microcystins [J]. *Resources and Environment in the Yangtze Basin*, 2000, 9(2): 242–247 (in Chinese).
- [7] 樊新源,高和气,汤峰,等. 水生植物塘预处理巢湖源水中试研究[J]. *中国给水排水*, 2010, 26(21): 58–61.
Fan Xinyuan, Gao Heqi, Tang Feng, *et al.* Pretreatment of Chaohu Lake source water by hydrophyte pond [J]. *China Water & Wastewater*, 2010, 26(21): 58–61 (in Chinese).
- [8] 李慧敏,杜桂森,姜树君,等. 官厅水库的微囊藻毒素及其与水环境的相关性[J]. *生态学报*, 2010, 30(5): 1322–1327.
Li Huimin, Du Guisen, Jiang Shujun, *et al.* The correlation of microcystins and water environment factors in Guanting Reservoir [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30(5): 1322–1327 (in Chinese).
- [9] 郑和辉,钱城,邵兵,等. 北京密云水库富营养化和微囊藻毒素污染水平初步调查分析[J]. *卫生研究*, 2007, 36(1): 75–77.
Zheng Hehui, Qian Cheng, Shao Bing, *et al.* Preliminary survey on water eutrophication and microcystins level in Beijing Miyun Reservoir [J]. *Journal of Hygiene Research*, 2007, 36(1): 75–77 (in Chinese).
- [10] 高振美,赵中华,张波,等. 太湖梅梁湾水体微囊藻毒素含量的季节变化特征及其影响因素研究[J]. *生态环境学报*, 2011, 20(6/7): 1063–1067.
Gao Zhenmei, Zhao Zhonghua, Zhang Bo, *et al.* Seasonal variation of microcystins concentration and influencing factors in Meiliang Bay, Lake Taihu [J]. *Ecology and Environment*, 2011, 20(6/7): 1063–1067 (in Chinese).
- [11] 王靖国,邹华,张强,等. 太湖微囊藻毒素的时空分布特征[J]. *环境科学研究*, 2014, 27(7): 696–703.
Wang Jingguo, Zou Hua, Zhang Qiang, *et al.* Spatial and temporal distribution of microcystin in Taihu Lake [J]. *Research of Environmental Sciences*, 2014, 27(7): 696–703 (in Chinese).



作者简介:范亮(1991—),男,河北邢台人,硕士研究生,研究方向为水环境监测。

E-mail: 2538957551@qq.com

收稿日期:2018-02-27