

分析与监测

城镇排水内分泌干扰物综合毒性效应的CALUX检测方法

贾瑞宝, 孙韶华, 逯南南, 许燕, 孙莉, 王明泉, 赵清华
(山东省城市供排水水质监测中心, 山东 济南 250021)

摘要: 针对当前城镇水环境中日益严重的内分泌干扰物(EDCs)污染,参照已取得ISO 17025认证、美国环保局(EPA)批准的荧光素酶表达基因法(CALUX),研究建立了污水和污泥中二噁英、雌激素、雄激素、肾上腺皮质激素等四类主要EDCs的综合毒性效应检测方法,并通过重复试验对方法的精密度进行了验证。结果表明,CALUX方法作为一种EDCs综合毒性效应的快速生物检测方法,具有较好的灵敏度、重现性、可靠性,可作为仪器分析的有效补充方法。

关键词: 内分泌干扰物; 荧光素酶表达基因法; 综合毒性效应; 污水; 污泥

中图分类号: TU992 **文献标识码:** C **文章编号:** 1000-4602(2018)18-0109-05

Detection of Comprehensive Toxicity Effect of Endocrine Disruptors in Urban Drainage by CALUX Bioassay

JIA Rui-bao, SUN Shao-hua, LU Nan-nan, XU Yan, SUN Li, WANG Ming-quan,
ZHAO Qing-hua

(Shandong Province City Water Supply and Drainage Water Quality Monitoring Center, Jinan 250021, China)

Abstract: In view of the increasing pollution of endocrine disruptors (EDCs) in the urban water environment, the Chemical-Luciferase Gene Expression (CALUX) test method, which was certified by the International Organization for Standardization (ISO 17025) and approved by the U. S. Environmental Protection Agency (EPA), was taken as a reference to establish the detection method for comprehensive toxicity of the increasingly serious pollution of endocrine disrupting chemicals (EDCs) in water environment, biological screening assay of EDCs including dioxin, estrogen, androgen and adrenaline in sewage and sludge. The precision and standard addition recovery of the method was verified. The results showed that CALUX bioassay was a rapid biological method with good sensitivity, reproducibility and maneuverability for comprehensive toxicity effect screening of EDCs. CALUX bioassay could be used as an effective supplement to the classic instrument analysis method.

Key words: EDCs; CALUX; comprehensive toxicity effect; sewage; sludge

内分泌干扰物(Endocrine Disrupting Chemicals, EDCs),是一类干扰生物体内分泌系统的外源性化

基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2015ZX07406005); 山东省泰山学者建设工程专项(ts201712084); 泉城“5150”引才倍增计划

通信作者: 贾瑞宝 E-mail: jiaruibao68@126.com

学物质,环境中的 EDCs 会对生物体造成严重的危害,甚至低浓度条件下(ng/L 浓度水平)对动物和人类的生殖与健康作用也不容忽视^[1~4]。EDCs 广泛存在于杀虫剂、增塑剂、洗涤剂等产品中,大量的 EDCs 经工业废水和生活污水排放进入城市污水处理系统,而现有污水常规处理工艺不能完全去除水中的 EDCs,其在出水中的浓度为 $\text{ng/L} \sim \mu\text{g/L}$ 的水平^[5,6]。EDCs 通过城市污水排放进入水环境,对整个水生态系统及饮用水安全带来了强大冲击。污泥是污水处理过程中不可避免的副产物,污泥中含有大量的有机物、氮和磷,所以常被作为肥料使用^[7]。随着污泥的农用 EDCs 可能会在土壤环境中积累起来,对环境和人类健康产生潜在的危害^[8,9]。

当前,饮用水及污水中 EDCs 的检测方法多采用高效液相色谱(HPLC)、气相色谱(GC)、液相色谱-质谱联用(LC-MS)、气相色谱-质谱联用(GC-MS)等仪器分析方法^[10~12],仪器分析法只能检测样品中已知的单项 EDCs,对未知物的检测无法实现,且 EDCs 对生物体的联合作用非常复杂,在一定程度上,对 EDCs 的生物综合毒性效应的检测更能表现水体受污染的程度。荧光素酶表达基因法(CALUX)作为一种高效快速的生物分析方法,已取得 ISO 17025 认证,美国立法敦促美国环保局(EPA)批准,被欧盟、美国、日本等国广泛用于各种 EDCs 的筛选检测,并成为部分国家的水质检测标准。国内有研究者采用 CALUX 技术对饮用水中的 EDCs 进行了分析^[13,14],但 CALUX 技术应用于城镇排水系统中 EDCs 的研究鲜有报道。笔者研究建立了污水、污泥中四种类型 EDCs 检测的 CALUX 法,并在实际污水及污泥样品检测中进行了应用验证。

1 材料与方法

1.1 设备与材料

设备:微孔板式化学发光仪(德国 Berthold CentroLB960XS3);生物安全柜(新加坡 ESCO 公司 AC2-4S1);二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司 HERA cell 150i);组织培养用显微镜(日本奥林巴斯株式会社 CKX41)。

材料:螺纹瓶、样品收集瓶、组织培养板(Schott 公司);试验所用 CALUX 细胞以及标准物质浓度系列(2,3,7,8-TCDD、雌二醇、二氢睾酮、地塞米松)(荷兰 BDS 公司);细胞生长培养基、测定培养基与磷酸盐缓冲液(PBS)(美国 GIBCO 公司);正己烷、

乙酸乙酯(美国 Dikmapure 公司);二甲亚砜(DMSO)(天津科密欧公司);硅胶(Sigma 公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 样品采集

使用棕色试剂瓶进行污水及污泥的样品采集,所有采样瓶在使用前均使用氢氧化钠进行充分清洗并经无水乙醇漂洗,采集后水样置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱避光保存,并在 24 h 内对样品进行处理。

1.2.2 样品前处理

水样:在 500 mL 螺纹瓶中量取 250 mL 水样,加入 50 mL 正己烷(乙酸乙酯)在振荡器上以 200 r/min 振荡 60 min,静置使两相分层,然后将上层液相小心地转入干净的 50 mL 玻璃试管中,重复振荡萃取两次,氮吹蒸发后用正己烷(乙酸乙酯)将收集瓶中的富集物质转移至 1.5 mL 小瓶中,再通以平缓的 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 氮气气流吹干,并用 DMSO 定容至 25 μL 。

泥样:在 100 mL 螺纹瓶中称取 9.0 g 污泥样本,加入一定量的水和异丙醇,在振荡器上以 200 r/min 振荡 10 min,加入 30 mL 正己烷(乙酸乙酯)以 200 r/min 振荡 60 min,静置分层后,将上层移入干净的收集瓶中氮吹蒸发;然后重复振荡萃取两次,用正己烷(乙酸乙酯)将收集瓶中的富集物质转移至 1.5 mL 小瓶中,再通以平缓的 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 氮气气流吹干,并用 DMSO 定容至 25 μL 。

用于进行二噁英综合毒性效应检测的样品需要采用硫酸硅胶对样品进行净化,以排除多环芳烃类物质对试验的干扰。

1.2.3 样品的 CALUX 检测

① 植板

将具备检测条件的细胞悬浮于培养基中,保证其同质、均匀,然后将细胞悬浮液植入 96 孔组织培养板中,置于二氧化碳培养箱中进行不少于 16 h 的培养。

② 染毒

制备含特定剂量参照化合物和样品的培养基,并使培养基充分混匀。将 96 孔组织培养板中原有培养基仔细移出,再用上述制备好的培养基填充至每个微孔中,置于二氧化碳培养箱中培养 24 h。

③ 测定

将 96 孔板置于微孔板式化学发光仪上进行测定,制作标准工作曲线。经数据处理分析后,得到样品中不同 EDCs 的综合毒性效应。

2 结果与讨论

2.1 方法验证

分别以 2,3,7,8 - TCDD、17β - 雌二醇、二氢睾酮、地塞米松 4 种物质为参照化合物,按照建立的二噁英、雌激素、雄激素、肾上腺皮质激素综合毒性效应进行测试,不同参照化合物的相对光单位(RLU)与其浓度在一定范围内呈线性或对数关系。其中 2,3,7,8 - TCDD 的相对光单位(RLU)与其浓度呈线性关系,17β - 雌二醇、二氢睾酮、地塞米松的相对光单位(RLU)与其浓度呈对数关系,相关系数 R^2 均在 0.99 以上(见图 1)。同样用 2,3,7,8 - TCDD、17β - 雌二醇、二氢睾酮、地塞米松 4 种物质进行加标回收试验,结果见表 1。可见,回收率为 83% ~ 130%。平行样测定的相对标准偏差见表 2,范围为 9.50% ~ 16.19%。因此,CALUX 法的准确度和精密度均符合要求,可用于二噁英、雌激素、雄激素、肾上腺皮质激素 4 种类型的综合毒性效应检测。

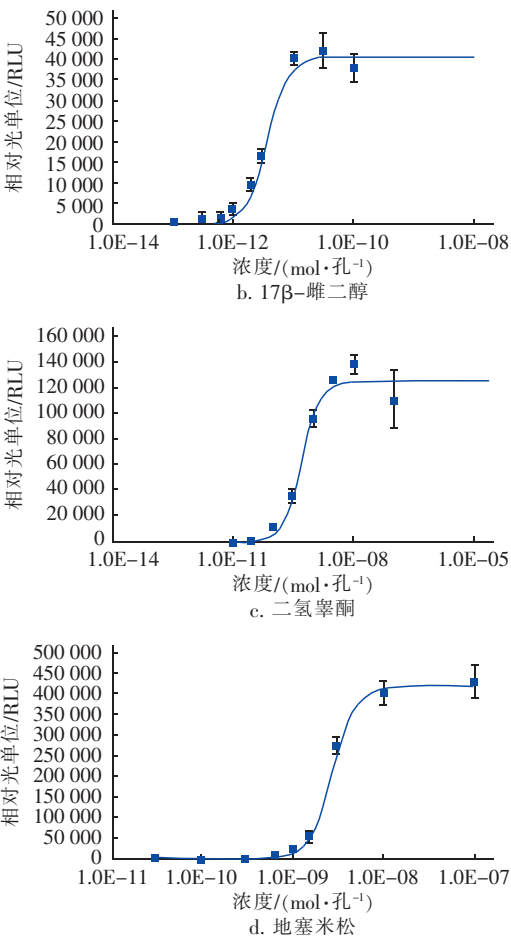
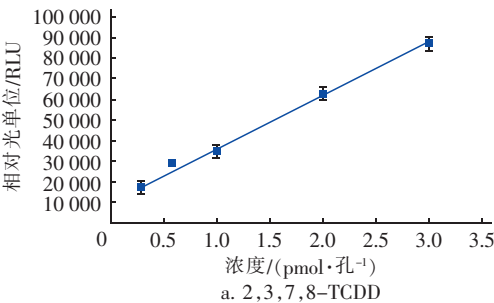


图 1 工作曲线
Fig. 1 Working curve

表 1 加标回收试验结果

Tab. 1 Results of standard adding recovery test

标准物质	EDCs 类型	萃取方式	加标浓度/ (ng · L ⁻¹)	回收率/%	相对标准偏差/%
2,3,7,8 - TCDD	二噁英	液液萃取 (LLE)	0.6	—	13.76
17β - 雌二醇	雌激素	固相萃取 (SPE)	1.0	83 ~ 97	10.72
二氢睾酮 (DHT)	雄激素	固相萃取 (SPE)	1 000	100 ~ 122	9.2
地塞米松 (DEX)	肾上腺素	固相萃取 (SPE)	1 900	92 ~ 130	6.3

表 2 精密度测试结果

Tab. 2 Precision test results

项 目	二噁英/ (ng 2,3,7,8 - TCDD TEQ · L ⁻¹)	雌激素/ (ng E2 EEQ · L ⁻¹)	雄激素/ (ng DHT EEQ · L ⁻¹)	肾上腺素/ (ng DEX EEQ · L ⁻¹)
平行 1 Sample 1	0.070	0.51	0.56	55
平行 2 Sample 2	0.077	0.57	0.85	53
平行 3 Sample 3	0.054	0.61	0.75	53
平行 4 Sample 4	0.077	0.49	0.62	44
平行 5 Sample 5	0.058	0.47	0.72	57

注: 二噁英、雌激素、雄激素、肾上腺素的相对标准偏差分别为 15.94%、11.00%、16.19%、9.50%。

2.2 方法应用

在利用 CALUX 法系统评价环境污染物的内分泌干扰效应时,通常是以某种代表性的化合物作为参照,样品的内分泌干扰效应均归结到参照化合物的毒性当量表示,研究中二噁英、雌激素、雄激素、肾上腺皮质激素综合毒性效应测定结果分别以 2,3,7,8-TCDD、17 β -雌二醇、二氢睾酮、地塞米松的毒性当量值来表示。利用优化建立的 CALUX 检测方法对某污水厂进、出水及污泥样品进行了测试,结果见表 3。可见四种类型的内分泌干扰效应在污水厂进水中均有检出,而出水及污泥样品中有部分内分泌干扰综合毒性效应检出,表明现有污水处理工艺对内分泌干扰物去除能力有限,与隋倩、孙艳等^[15,16]关于中国城市污水处理厂二级处理出水中内分泌干扰物研究结论基本一致。

表 3 不同类型样品内分泌干扰物综合毒性效应测试

Tab.3 Comprehensive toxicity test of endocrine disruptors for different samples

样品	类型	二噁英/ (ng 2,3,7,8-TCDD TEQ · L ⁻¹)	雌激素/ (ng E2 EEQ · L ⁻¹)	肾上腺素/ (ng DEX EEQ · L ⁻¹)	雄激素/ (ng DHT EEQ · L ⁻¹)
1	进水	0.094	31	69	1.3
2		0.074	46	23	8.7
3	出水	0.070	<0.013 6	39	<0.29
4		0.030	<0.013 6	24	<0.29
5	污泥	3.1	0.037	<3.9	<0.29
6		3.2	0.050	<3.9	<0.29

3 结论

优化建立了污水及污泥二噁英、雌激素、雄激素、肾上腺皮质激素四种综合毒性效应的 CALUX 检测方法,并对方法的准确度和精密度进行了验证评估,结果表明 CALUX 技术可用于污水和污泥样品中 EDCs 综合毒性效应的快速检测。污水和污泥样品中均有内分泌干扰综合毒性效应检出,表明现有污水处理工艺对内分泌干扰物去除能力有限。未来研究中,将生物方法同仪器分析方法联用,采取先通过 CALUX 技术进行内分泌干扰综合毒性效应快速半定量筛选,后利用高分辨质谱仪器准确定量的方式可更有针对性地开展水环境中内分泌干扰物的筛查鉴定工作。

参考文献:

- [1] Kavlock R J. Overview of endocrine disruptor research activity in the United States[J]. Chemosphere, 1999, 39(8): 1227-1236.
- [2] 安立会,雷坤,刘颖,等. 辽东湾野生四角蛤蜊性畸变调查[J]. 中国环境科学, 2014, 34(1): 259-265.
An Lihui, Lei Kun, Liu Ying, et al. Investigation the intersex of wild Mactraveriformis from Liaodong Bay [J]. China Environmental Science, 2014, 34(1): 259-265 (in Chinese).
- [3] Snyder S A. Emerging chemical contaminants: Looking for greater harmony [J]. J Am Water Works Assoc, 2014, 106(8): 38-52.
- [4] Ye X Y, Zhou X L, Wong L Y, et al. Concentrations of bisphenol A and seven other phenols in pooled sera from 3-11 year old children: 2001-2002 national health and nutrition examination survey [J]. Environ Sci Technol, 2012, 46(22): 12664-12671.
- [5] Sarmah A K, Northcott G L, Leusch F, et al. A survey of endocrine disrupting chemicals (EDCs) in municipal sewage and animal waste effluents in the Waikato Region of New Zealand [J]. Sci Total Environ, 2006, 355(1/3): 135-144.
- [6] Andersen H R, Siegrist H, Halling-Sorensen B, et al. Fate of estrogens in a municipal sewage treatment plant [J]. Environ Sci Technol, 2003, 37(18): 4021-4026.
- [7] Guo L, Zhang B, Xiao K, et al. Levels and distributions of polychlorinated biphenyls in sewage sludge of urban wastewater treatment plants [J]. Journal of Environmental Sciences (China), 2009, 21(4): 468-473.
- [8] 柯真山,李雪梅,李建坡. 城市污水处理厂污泥中多氯二苯并二噁英/呋喃的分布特征 [J]. 环境化学, 2011, 30(4): 874-879.
Ke Zhenshan, Li Xuemei, Li Jianpo. Distribution of PCDDs and PCDFs in sewage sludges from wastewater treatment plants in Beijing [J]. Environmental Chemistry, 2011, 30(4): 874-879 (in Chinese).
- [9] 郑雄,陈银广. 污水厂污泥中类二噁英类物质污染水平的研究进展 [J]. 化工进展, 2008, 27(12): 1954-1958.
Zheng Xiong, Chen Yinguang. Advances in study of concentration of dioxin-like compounds in sewage sludge [J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2008, 27(12): 1954-1958 (in Chinese).
- [10] Cai Y Q, Jiang G B, Liu J F, et al. Multi-walled carbon nanotubes packed cartridge for the solid-phase extraction of several phthalate esters from water samples and their determination by high performance liquid chromatogra-

- phy[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 494(1/2): 149 – 156.
- [11] Shin H S, Park C H, Park S J, *et al.* Sensitive determination of bisphenol A in environmental water by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection after cyanomethylation[J]. *J Chromatogr A*, 2001, 912(1): 119 – 125.
- [12] Martnez R C, Gonzalo E R, Ruiz P R. Determination of endocrine-disrupting compounds in cereals by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-mass spectrometry – Study of background contamination[J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1137(2): 207 – 215.
- [13] 王明泉, 李圭白, 贾瑞宝, 等. 城市水系统雌激素综合毒性效应的 CALUX 分析法优化[J]. *中国给水排水*, 2015, 31(23): 72 – 76.
- Wang Mingquan, Li Guibai, Jia Ruibao, *et al.* Optimization of CALUX bioassay for analysis of comprehensive toxicity effect of estrogens in urban water system[J]. *China Water & Wastewater*, 2015, 31(23): 72 – 76 (in Chinese).
- [14] 贾瑞宝, 孙韶华, 张诺, 等. 水库型水源水中污染物综合激素效应及工艺去除特性研究[J]. *给水排水*, 2016, 42(3): 26 – 30.
- Jia RuiBo, Sun Shaohua, Zhang Nuo, *et al.* Study on comprehensive toxicity effect and removal process of pollutants in reservoir water resource [J]. *Water & Wastewater Engineering*, 2016, 42(3): 26 – 30 (in Chinese).
- [15] 隋倩, 黄俊, 余刚. 中国城市污水处理厂内分泌干扰物控制优先性分析[J]. *环境科学*, 2009, 30(2): 384 – 390.
- Sui Qian, Huang Jun, Yu Gang. Priority analysis for controlling endocrine disrupting chemicals in municipal wastewater treatment plants of China[J]. *Environmental Science*, 2009, 30(2): 384 – 390 (in Chinese).
- [16] 孙艳, 黄璜, 胡洪营, 等. 污水处理厂出水中雌激素活性物质浓度与生态风险水平[J]. *环境科学研究*, 2010, 23(12): 1488 – 1493.
- Sun Yan, Huang Huang, Hu Hongying, *et al.* Concentration and ecological risk level of estrogenic endocrine-disrupting chemicals in the effluents from wastewater treatment plants[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2010, 23(12): 1488 – 1493 (in Chinese).



作者简介:贾瑞宝(1968 –), 男, 山东费县人, 工学博士, 研究员, 山东省(济南)供排水监测中心主任、山东省给水处理工程技术研究中心主任、国家城市供水(排水)监测网济南监测站站长, 主要研究方向为供排水监测及饮用水安全保障技术, 长期从事“城市水安全”领域基础应用研发和成果转化工作, 研究建立了适于我国湖库型水源供水系统“全流程监测 – 多级屏障处理”技术体系, 先后获国务院政府特殊津贴专家、全国优秀科技工作者、国家“百千万人才工程”人选、国家有突出贡献中青年专家、山东省“泰山学者”等荣誉称号。

E – mail: jiaruibao68@126. com

收稿日期: 2018 – 03 – 23

绿水青山就是金山银山