

体外生物测试工具在评价污水污泥毒性效应中的应用

尹杰¹ 苏磊² 张效伟³ 何苗⁴ 李娟英^{1,*}

(1. 上海海洋大学水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心, 上海 201306;

2. 华东师范大学河口海岸学国家重点实验室, 上海 200062;

3. 南京大学环境学院污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京 210093;

4. 清华大学环境学院环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 北京 100084)

摘要 以上海地区7处典型污水处理厂产生的污水污泥为研究对象, 利用体外生物测试工具, 检测了污水污泥有机提取液的基线毒性、遗传毒性、雌激素效应和芳香烃受体效应水平, 并结合化学分析对某些能引起毒性效应的有机污染物进行确认。结果表明, 污水污泥有机提取液的基线毒性强度为 $133 \sim 3\,401 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; 遗传毒性强度从未检出到 $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; 雌激素效应当量均低于 $0.02 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1}$; 芳香烃受体效应强度为 $73 \sim 6\,838 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。与国内外相关研究比较发现, 基线毒性、遗传毒性、雌激素效应水平均较低, 仅芳香烃受体效应水平接近于国内外污水污泥中芳香烃受体效应的水平。在对芳香烃受体效应水平的检测中发现: S1点检出的化学物质可以解释污水污泥70%的类二恶英效应, 其中多环芳烃(PAHs)尤其是PAHs的单体BkF占主导地位, 而其余样点则不到10%的效应可以被解释, 因此有待进一步对其余样点的化学污染物进行分析和确认。

关键词 基线毒性; 遗传毒性; 雌激素效应; 芳香烃受体效应; 污水污泥

中图分类号 X820.6 文献标识码 A 文章编号 1673-9108(2016)12-7387-09 DOI 10.12030/j.cjee.201508048

Application of in vitro biological test tool in assessing toxic effect of sewage sludge

YIN Jie¹ SU Lei² ZHANG Xiaowei³ HE Miao⁴ LI Juanying^{1,*}

(1. Shanghai Collaborative Innovation Center for Aquatic Animal Genetics and Breeding, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. State Key Laboratory of Estuarine and Coastal Research, East China Normal University, Shanghai 200062, China; 3. State Key Laboratory of

Pollution Control and Resources Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, China; 4. State Key

Joint Laboratory of Environment Simulation and Pollution Control, School of Environment, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract The baseline toxicity (BT), genetic toxicity (GT), estrogen effect (EE), and Ah-receptor (AhR) levels in sewage sludge from seven typical wastewater treatment plants (WWTPs) in Shanghai were measured and identified via in vitro bioassay and chemical analysis. The toxic equivalent quantities in this study for BT, GT, EE, and AhR were $133 \sim 3\,401 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, not detected $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, less than $0.02 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1}$, and $73 \sim 6\,838 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1}$, respectively. The toxicity effects from BT, GT, and EE were low compared to global levels, while the AhR level was comparable to that reported from various WWTPs. In addition, the compounds detected with these instruments can explain the 70% dioxin-like effect, especially for BkF, which was the dominant congener in S1. However, less than 10% of the effect can be explained in other samples, which means further fractionation and analysis on chemical in sewage sludge.

Key words baseline toxicity; genetic toxicity; estrogen effect; aromatic hydrocarbon receptor; sewage sludge

生活水平的提高导致了大量污水的排放, 为量也日益增多^[1]。但在污水处理过程中, 许多痕有效解决污水排放问题, 污水处理厂的规模和数量有毒有机物如二恶英类、环境激素等^[2-4]不能被

基金项目: 国家海洋局公益项目子课题(201105010-10)

收稿日期: 2015-08-07; 修订日期: 2015-09-22

作者简介: 尹杰(1992—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 环境化学。E-mail: 894598793@qq.com

* 通讯联系人, E-mail: jyli@shou.edu.cn

有效去除并最终吸附到污水污泥中,上述物质普遍具有难降解性、生物积累性和“三致”效应,因此污水污泥的不合理的处理处置可能对生态环境和人体健康造成严重的影响^[5]。现代先进的化学分析技术虽然可以解决部分化学物质的检测,但不能检测污泥中所有的污染物,也不能直接、全面地反映各种有毒物质对环境及生物的综合影响^[6],而生物毒性测试则可作为化学分析有效的补充手段。

与传统化学分析方法仅能分析有限种类的污染物相比,基于效应的体外生物测试工具在细胞和分子水平上对有毒污染物进行分析,可以表征样品中所有能对细胞产生效应的物质,并以浓度相加的方式进行叠加^[7],不仅具有简便经济、易于操作的优点,且能对多批量、多种类、低浓度的有毒污染物进行筛选^[8],因此得到了广泛的应用。对于非特异性毒性,BABBIN等^[9]使用虹鳟鱼细胞研究污水污泥的细胞毒性并提出应该更多地应用特异性毒性终点解释实际毒性效应;对于特异性毒性研究,LIU等^[10]调查比较了北京地区污水污泥中内分泌干扰物以及芳香烃受体水平,认为堆肥处理会对上述效应水平产生一定影响;李莉^[11]也对北京地区污水污泥的内分泌干扰效应,芳香烃受体水平以及遗传毒性效应进行了全面调查并且发现经不同工艺处理后,污水污泥的毒性效应普遍降低。此外,研究人员等^[12-13]在将体外生物测试用于饮用水、回用水、生活污水、工业废水及降雨径流等水质的研究中时发现,与常规化学分析方法相比,生物测试法的检出限与之相当甚至更低,且结果的重复性很好。

TANG等^[14]和ESCHER等^[15]还以澳大利亚饮用水水质标准中的有机污染物阈值为基础,建立了基于细胞毒性和氧化应激的体外生物测试方法评价标准。然而,由于土壤、沉积物及污水污泥中污染物成分复杂且含有很多未知污染物,对体外生物测试的影响较大,因此目前还未有建立基于体外效应的综合评价标准。

本研究运用多种体外生物测试工具,对污水污泥有机提取液的基线毒性、遗传毒性、雌激素效应和芳香烃受体水平进行检测,获得相应的毒性当量水平并研究了化学检测到的污染物对特异性毒性效应的贡献,对上海地区污水污泥的潜在生物毒性进行筛选和评价,以期对污水污泥的处理处置提供参考依据。

1 实验材料与方法

1.1 污水污泥的采集与预处理

本研究所使用污水污泥取自上海市南汇区,浦东新区,金山区,嘉定区以及宝山区等5个区的7处典型污水处理厂(图1),以编号S1~S7表示,污水处理厂的基本运行参数与污泥出厂性质的相关信息如表1^[17]所示。

体外测试所用样品为污水污泥的有机提取液,提取方法同沉积物^[18],简述如下:将采集到的污泥冷冻干燥后称取5 g包入滤纸,用100 mL有机溶剂($V_{\text{丙酮}}:V_{\text{正己烷}}=1:1$)索氏提取24 h,温度65℃,同时加入足量铜片以除硫。提取完毕后,将收集到的有机溶液经旋转蒸发和氮吹浓缩,定容至1 mL,放入-80℃冰箱冷藏备用。

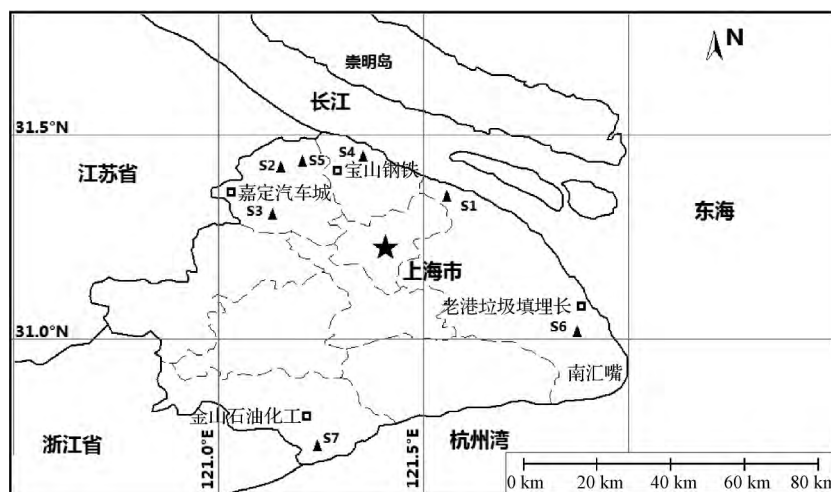


图1 污水处理厂地理分布

Fig. 1 Geographical distribution of wastewater plants

表 1 污水处理厂基本运行参数与污泥性质

Table 1 Basic parameters of wastewater treatment plants and sewage sludge characteristic					
采样点编号	污水处理规模/(万 t·d ⁻¹)	污水处理工艺	污水比例%	有机质/(g·kg ⁻¹)	硫化物/(g·kg ⁻¹)
S1	50	AO	15(生活污水)	206	0.032
S2	13	倒置 A ² O	10(生活污水)	218	0.23
S3	10	倒置 A ² O	50(汽车工业)	159	1.1
S4	40	传统活性污泥	60(钢铁工业)	189	0.042
S5	5	倒置 A ² O	70(汽车工业)	122	0.058
S6	10	A ² O	50(混合)	182	2.5
S7	10	AO	50(化工)	209	3.8

1.2 体外生物测试方法

本研究所使用的体外生物测试方法包括基线毒性测试,芳香烃受体测试,遗传毒性测试和雌激素效应测试。测试使用的细胞系及测试目标化合物等信息如表 2 所示。

表 2 体外毒性测试方法信息
Table 2 Information of in vitro toxicity testing methods

体外测试类型	测试用细胞系	目标化合物	目标化合物的作用模式	毒性强度	参考文献
基线毒性	费氏弧菌	所有造成细胞毒性的物质	样品中化学物质的细胞毒性对费氏弧菌的发光抑制	3,5-二氯酚浓度 (5.6±1.5) mg·L ⁻¹	[9]
芳香烃受体	H4IIE-luc 细胞系	类二恶英效应物质	样品中芳香烃受体特异性绑定的荧光表达	2,3,7,8-四氯二苯并二恶英 (5.6±1.5) ng·L ⁻¹	[20]
遗传毒性	重组鼠伤寒沙门氏菌	DNA 损伤物质	样品中遗传毒性物质诱导细胞修复机制特异性反应表达	4-硝基喹啉-1-氧化物 (374±145) μg·L ⁻¹	[21]
雌激素效应	重组酵母	雌激素效应物质	样品中雌激素受体特异性绑定的荧光表达	雌二醇 (31±12) ng·L ⁻¹	[22]

1.2.1 基线毒性测试

基线毒性的测试在 96 孔板上完成 [9],板中配置阳性对照(3,5-DCP)和空白对照(2% NaCl 溶液)。于复苏后发光细菌菌液中暴露 15 min 后使用多功能酶标仪检测发光强度 L_s (样品发光量)和 L_b (空白组发光量),读数结束后,按照式(1)计算发光抑制率 I ,使用 S 型 4 参数方程对 I 和样品及阳性对照的对数浓度做非线性拟合获得对应的半数效应浓度($EC_{50\text{样品}}$ 和 $EC_{50(3,5\text{-DCP})}$)。实验设置 3 组平行。

$$I = 1 - \frac{L_s}{L_b}$$

(1)

1.2.2 芳香烃受体测试

实验前将传至第 7 代左右的 H4IIE-luc 细胞系在 384 孔板中(75 μL)预配养 24 h,于板中配置阳性对照(2,3,7,8-TCDD),空白对照(细胞培养基)和 DMSO 对照(DMSO),暴露 72 h 后用多功能酶标仪检测荧光值 L [24]。首先将实验中阳性对照获得的最大荧光量设为 $L_{\max}$,按照式(2)计算出样品与阳性对照相对于 2,3,7,8-TCDD 的最高荧光量的百分比($TCDD_{\max},\%$)。使用 S 型 4 参数方程对百分比($TCDD_{\max},\%$)和样品及阳性对照的对数浓度做非线性拟合获得对应的半数效应浓度($EC_{50\text{样品}}$ 和 $EC_{50(TCDD)}$)。实验设置 4 组平行。

$$TCDD_{\max} = \frac{L}{L_{\max}} \times 100\%$$

(2)

1.2.3 遗传毒性测试

实验前将复苏完毕的测试菌液预配养 2~4 h,($OD_{600} \approx 0.2$)。板中配置阳性对照(4-NQO),阴性对照(菌液培养基)和空白对照(菌液培养基)。读数结束后,按照式(3)计算生长因子 G 并将 G 代入式(4)计算诱导率(IR) [21]。使用线性回归对 IR 和样品及阳性对照的浓度做线性拟合获得诱导率为 1.5 时的剂量($IR_{1.5\text{样品}}$ 和 $IR_{1.5(4\text{-NQO})}$)。实验设置 3 组平行。

$$G = \frac{A_{600}(\text{样品}) - A_{600}(\text{空白})}{A_{600}(\text{阴性}) - A_{600}(\text{空白})}$$

(3)

$$IR = \frac{A_{420}(\text{样品}) - A_{420}(\text{空白})}{A_{420}(\text{阴性}) - A_{420}(\text{空白})} \cdot \frac{1}{G}$$

(4)

1.2.4 雌激素效应测试

实验前将复苏完毕的测试菌液预配养 24 h ($OD_{600} \approx 0.6$)^[22]。板中配置阳性对照(E2),阴性对照(酵母培养基)和空白对照(酵母培养基)。读数结束后按照式(5)计算半乳糖苷酶活性 K ,其中, T 为酶反应时间; V 为测定时溶液体积, D 为稀释倍率,本研究中为加入碳酸钠后与加入测试缓冲液前的体系体积。按照本实验实际情况,上述参数分别取 30 min,0.2 mL,6.6。使用 S 型 4 参数方程对 K 和样品及阳性对照的对数浓度做非线性拟合获得对应的半数效应浓度($EC_{50\text{样品}}$ 和 EC_{50E2})。实验设置 3 组平行。

$$K = \frac{B_{420}(\text{样品}) - B_{420}(\text{空白})}{T \cdot V \cdot B_{600}(\text{样品})} \cdot D \quad (5)$$

1.3 基于体外测试方法的毒性当量计算(TEQ_{bio})

本实验获得的基线毒性、芳香烃受体效应、遗传毒性、雌激素效应的毒性强度(TEQ_{bio})分别用 3,5-DCP-EQ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),TCDD-EQ($\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1}$),4-NQO-EQ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)和 E2-EQ($\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$)。其计算如式(6)所示。

$$TEQ_{\text{bio}} = \frac{EC_{50(3,5\text{-DCP})}, EC_{50(\text{TCDD})}, EC_{50(E2)} \text{ 或 } IR_{1.5(4\text{-NQO})}}{EC_{50\text{样品}} \text{ 或 } IR_{1.5\text{样品}}} \quad (6)$$

2 结果与讨论

2.1 污水污泥有机提取液的基线毒性

基线毒性反应了测试体系中能对细胞膜产生破坏的所有污染物浓度之和,它以发光细菌为指示微生物,以发光强度的变化为指标,测定环境中有毒有害物质的生物毒性,从而对环境中的污染物质进行监测和污染风险评价。本研究中 7 处污水污泥样品的有机提取液均对费氏弧菌产生明显的发光抑制,最高暴露浓度孔中的抑制率全部达到了 100%,计算得到的 3,5-DCP-EQ 为 133 ~ 3 401 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (图 2),其中 S2 显著高于其他样点。然而 S2 已被明确检测出来的有机污染物(PCBs、PAHs、PCDD/Fs、有机氯农药以及有机磷农药等)的含量并不明显高于其他样点^[23],该现象说明污水污泥有机提取液中某些未检出的化学物质贡献了较大的基线毒性。此外,本研究中污水污泥有机提取液的基线毒性数量级水平也与国内外一些学者的研究结果相当^[19,23-25],说明污染水平较高,对环境的危害应该引起重视。

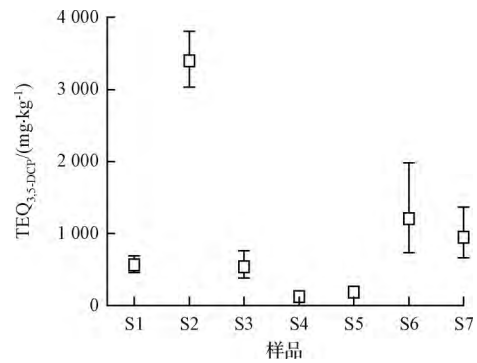


图 2 污水污泥样品的基线毒性

Fig. 2 Baseline toxicity of sewage sludge samples

2.2 污水污泥有机提取液的遗传毒性

遗传毒性泛指一切对细胞的遗传物质 DNA 造成损伤的行为,其毒性物质会引起被试动物的一系列疾病反应,如造成急性毒性、先天畸形、遗传性疾病、癌症、免疫性疾病等。本研究大部分污水污泥样品均可以检出直接遗传毒性(表 3),4-NQO-EQ 浓度从未检出到 25 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,其中 S3 点最高。有报道认为一些种类的 PAHs 会给生物体带来直接遗传毒性,尤其是一些致癌性 PAHs^[26]。然而 S3 点的致癌性 PAHs 基本未检出,相比于高 PAHs 污染的 S7^[23],2 处的遗传毒性当量基本相当,表明了 S3 点一部分未检出的化学物质可能对毒性效应产生了较高的贡献,如具有明显 DNA 损伤的芳香胺和硝基芳烃等^[27]。

为了与其他学者研究结果比较,表 2 除了计算 4-NQO-EQ,同时给出最高暴露强度下每孔的污泥加入量及其诱导率 R ,一般认为诱导率 $R > 2$ 可判定遗传毒性阳性。肖睿洋等^[28]对天津使用污水灌溉的土壤的遗传毒性调查结果表明,超过 50% 的污染土壤样品在每孔干土壤量 4 ~ 7 mg 时即检出诱导率阳

表 3 污水污泥有机提取液的遗传毒性

Table 3 Genotoxicity of sewage sludge organic extract

样点	4-NQO-EQ/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	最高暴露强度污泥量/ ($\text{mg} \cdot \text{孔}^{-1}$)	诱导率 IR
S1	25 ± 4.6	6.7	3.1 ± 0.36
S2	8 ± 2.1	6.3	1.7 ± 0.2
S3	25 ± 14	6.4	2.6 ± 0.1
S4	9.3 ± 1.5	6.1	1.7 ± 0.2
S5	14 ± 2.7	6.2	2.0 ± 0.38
S6	ND	5	<2
S7	24 ± 4.9	5.9	2.6 ± 0.43

注: ND 表示未检出。

性。类似地,禹果等^[29]对北京地区长期地下水灌溉的土壤调查结果也表明,当每孔干土壤量在 3 ~ 30 mg 时可检出遗传毒性阳性。相比而言,本研究尽管污水污泥中可以检出遗传毒性物质,但该水平基本相当或低于受污染土壤,带来的环境风险可能较低。

2.3 污水污泥有机提取液的雌激素效应水平

雌激素是环境内分泌干扰物中的一大类,这类物质进入人和动物体内后可模拟细胞内雌激素作用或改变该雌激素活性、干扰内分泌系统的正常功能,可导致生殖功能障碍、生长发育异常、出生缺陷、代谢紊乱和某些与激素有关的生殖系肿瘤等。本研究污水污泥有机提取液中的雌激素效应水平较低,所有样品的效应全部处于阳性对照最低浓度组的效应值以下(图 3),根据阳性对照值估计得到样品的 E2-EQ 浓度低于 0.02 ng · g⁻¹,该结果明显低于 LIU 等^[10]对北京地区污水污泥 E2-EQ 的浓度水平(0.9 ~ 6.8 ng · g⁻¹)和德国报道的污水污泥中通过化学检出的 E2-EQ 的浓度水平(17 ng · g⁻¹),说明本研究污水污泥样品中的雌激素效应物质的含量水平相对安全。

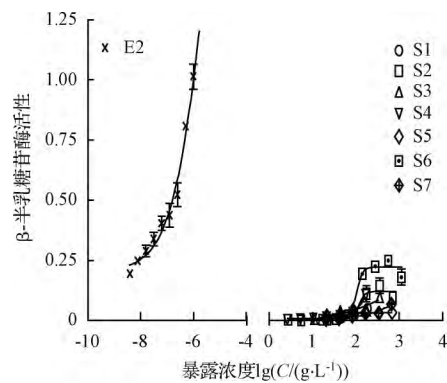


图 3 污水污泥有机提取液的雌激素效应曲线
Fig. 3 Dose-response curve for estrogenic effect in sewage sludge organic extract

2.4 污水污泥有机提取液的芳香烃受体水平

世界各地污水污泥中已经被报道不同程度检出如 PAHs^[30], PCDD/Fs^[31] 和 PCBs^[32] 等典型的二恶英及二恶英类芳香烃受体物质,这些物质的毒性作用通过芳香烃受体等一系列信号分子介导表现,但上述研究主要基于化学分析,并不能反映所有具有类二恶英效应物质的总量,同时,关于污水污泥中芳香烃受体总量的报道也较少。本研究中,7 处污水污泥样品均可以诱导 H4IIE-luc 细胞系统荧光报告基因的表达,计算得到的 TCDD-EQ 为 73 ~ 6 838

ng · kg⁻¹, 尽管该结果低于北京和瑞典污水污泥中芳香烃受体的含量,但却高于大部分报道的土壤以及天然沉积物近 1 ~ 2 个数量级(表 4),说明污水污泥对具有芳香烃受体效应物质的富集程度高于天然沉积物和土壤,该结果可能与污水中本身存在的高含量芳香烃受体效应物质有关。在所有样品中, S7 中的芳香烃受体浓度接近 7 000 ng · kg⁻¹, 接近北京和瑞典污水污泥中芳香烃受体报告的最高点,约为天然沉积物和土壤的 20 倍,且该值也显著高于其他污泥样品(73 ~ 703 ng · kg⁻¹)。由于 S7 地处金山,主要接纳上海地区典型的石油化工工业园区内产生的废水,因此接纳废水特征与 S7 点污泥中高含量的芳香烃受体效应密切相关,有必要对其排放进行进一步控制。

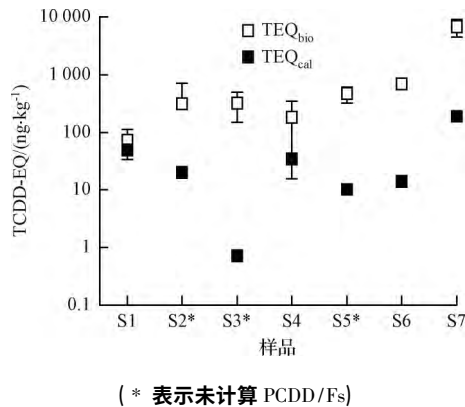
表 4 不同地区污水污泥、土壤和沉积物中的芳香烃受体水平
Table 4 Level of Ah receptor agonists in sewage sludge, soils and sediments from different areas

样品类型	TEQ _{bio} /(ng · kg ⁻¹)	国家/地区	参考文献
污水污泥	73 ~ 6 838	本研究	—
	1 390 ~ 6 740	北京	[3]
	10 ~ 8 300	瑞典 ¹⁾	[33]
	22 ~ 3 900	日本 ¹⁾	[34]
土壤	3.4 ~ 10	中国黄海东部沿岸	[35]
	3.4 ~ 23	韩国西部沿岸	[36]
	3.0 ~ 380	中国台州电子拆解厂	[36]
沉积物	542 ~ 6 834	天津海河	[37]
	39 ~ 324	长江口	[38]
	18 ~ 35	太湖梅良湾	[39]
	45 ~ 248	德国 Elbe 河口	[40]
	110 ~ 1 400	德国多瑙河	[41]

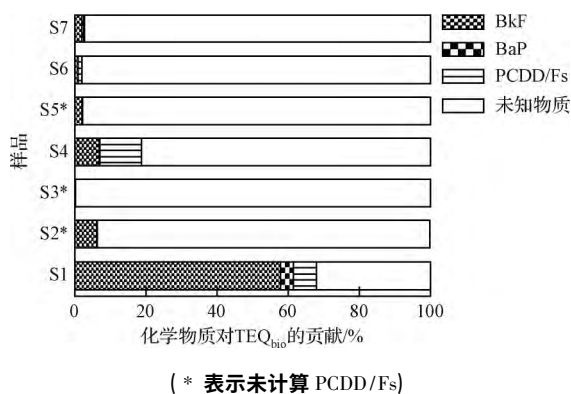
注: 1) 表示堆肥污泥。

上述检出的芳香烃受体对总二恶英效应的贡献来自于不同化学物质单体。根据本课题组之前关于污水污泥中赋存的有机污染物化学分析的结果^[23]以及文献中的 PCDD/Fs 和 PAHs 的相对毒性系数^[42]计算得到的化学分析的毒性强度(TEQ_{cal})为 1.0 ~ 190 ng · kg⁻¹, 与体外生物测试毒性强度(TEQ_{bio})类似, S7 点的 TEQ_{cal} 高于其他点位 1 ~ 2 个数量级(图 4), 指示该区域污水污泥中二恶英类化学物含量很高。

进一步比较化学分析毒性当量和体外生物测试毒性当量显示, S1 点中检出的化学物质的 TEQ_{cal} 可以解释 TEQ_{bio} 中 70% 的效应(图 5), 其中, PAHs 约占 60%, 且单体 BkF 占主导位置。在一些关于沉积物或者土壤芳香烃含量的报道中, BkF 在所有类二

图 4 污水污泥 TEQ_{bio} 和 TEQ_{cal} 的水平Fig. 4 TEQ_{bio} and TEQ_{cal} level of sewage sludge

恶英效应物质中也往往占据主导位置^[5,39],除了 BkF 较其他类二恶英 PAHs 单体更高的 TEF 值外,由于 BkF 在环境介质中分布的浓度水平高于 PCDD/Fs 或者 PCBs 等其他芳香烃受体 3~4 个数量级,尤其是在一些 PAHs 污染严重的区域,如石油工业污染的土壤或者海洋溢油区的沉积物,当其浓度在乘以毒性系数后,有可能导致毒性当量反而高于毒性系数更高的 PCDD/Fs。因此,尽管污水污泥在处置中关于 BkF 的排放限值较少^[4],但是考虑到该单体较明显的类二恶英效应,仍应当引起重视。

图 5 化学物质单体对 TEQ_{bio} 的贡献Fig. 5 Contribution of chemical monomers to TEQ_{bio}

但除了 S1 外,其余污水污泥样品获得的 TEQ_{cal} 只占 TEQ_{bio} 的 0.2%~18.8%,大部分的芳香烃受体效应无法通过化学分析结果进行解释。一些学者在通过质量平衡法计算沉积物中化学物质和芳香烃受体浓度时也常遇到类似的情况,如 HONG 等^[3] 在研究韩国海岸沉积物中的芳香烃受体时发现由已知的典型类二恶英类物质 (PAHs, PCDD/Fs, PCBs) 计算得到的 TEQ_{cal} 只能解释 TEQ_{bio} 的 20% 左右。因此,

除上述物质外,污泥中的芳香烃受体也可能来自于其他的具有类二恶英效应但较少被化学检测的物质,如 TAKIGAMI 等^[34] 在对冲绳湾沉积物的研究中报道的对 TEQ_{bio} 贡献接近 10% 的 PBDD/Fs 以及 PBDEs,这些物质中甚至也不排除一些天然的芳香烃受体,如腐殖酸等^[43]。另一方面,也有关于 H4IIE-luc 检测系统研究的报道^[44] 认为, H4IIE-luc 细胞系在测试过程中,有机碳的存在可能会加强荧光表达从而使实验结果被高估,考虑到污水污泥高有机质的特征,这一点也不能被忽视。但是, TEQ_{cal} 占 TEQ_{bio} 的低百分比的事实也强调了体外毒性测试手段对化学分析结果进行补充的意义与必要性,说明污水污泥中有较多可疑的芳香烃受体并没有通过化学分析手段被检出。

3 结 论

1) 污水污泥有机提取液的基线毒性强度 3,5-DCP-EQ 为 133~3 401 mg·kg⁻¹,毒性水平较高;部分污水污泥有机提取液可检出直接遗传毒性,毒性当量 4-NQO-EQ 为未检出到 25 mg·kg⁻¹,该结果低于或者接近于受污染土壤的水平且与污水污泥中致癌性 PAHs 关系不显著,但也不排除污水污泥中含有的间接遗传毒性物质;所有污水污泥有机提取液中的雌激素效应当量 E2-EQ 均低于 0.02 ng·kg⁻¹,环境风险较低。

2) 所有污水污泥样品的有机提取液均可被检出芳香烃受体效应, TCDD-EQ 为 73~6 838 ng·kg⁻¹,接近我国和国外污水污泥中芳香烃受体的毒性当量水平,但明显高于沉积物与土壤样品。大部分污水污泥样品的 TEQ_{cal} 对 TEQ_{bio} 的贡献不足 10%,表明仅仅通过化学分析解释污水污泥毒性效应的局限性,因此有待进一步通过分级分离对污水污泥中其他化学物质进行分析和确认。PAHs 单体中的 BkF 占 TEQ_{cal} 的 37%~85%,是化学方法检出的芳香烃受体中类二恶英效应水平最高的一种单体。

3) 在综合评判污泥毒性方面,目前仍存在很大的局限性。主要由于体外生物测试方法针对的是有机污染物,而对重金属以及无机污染物产生的毒性效应则无法表达,此外,基于体外的毒性效应目前仍没有一个全面的、综合性的评价基准,因此,体外毒性效应如何与重金属和无机污染物造成的毒性相结合,建立关于环境样品的毒性效应尤其是特异性毒

性效应以及与其关联的特征污染物的综合评价标准将是今后的主要研究方向。

参 考 文 献

- [1] 余忆玄, 陈虹, 王晓萌, 等. 我国城市污泥中的有机污染物污染状况及其海洋倾倒处置研究. *海洋环境科学*, 2013, 32(5): 652-656

YU Yixuan, CHEN Hong, WANG Xiaomeng, et al. Pollution characteristics of organic contaminant in sludge from wastewater treatment plants and sludge ocean dumping disposal in China. *Marine Environmental Science*, 2013, 32(5): 652-656 (in Chinese)

- [2] PAN Jing, YANG Yongliang, XU Qing, et al. PCBs, PCNs and PBDEs in sediments and mussels from Qingdao coastal sea in the frame of current circulations and influence of sewage sludge. *Chemosphere*, 2007, 66(10): 1971-1982

- [3] LU Mang, WU Xuejiao, ZENG Decai, et al. Distribution of PCDD/Fs and organometallic compounds in sewage sludge of wastewater treatment plants in China. *Environmental Pollution*, 2012, 171: 78-84

- [4] 莫测辉, 蔡全英, 吴启堂, 等. 我国一些城市污泥中多环芳烃(PAHs)的研究. *环境科学学报*, 2001, 21(5): 613-618

MO Cehui, CAI Quanying, WU Qitang, et al. A study of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in municipal sludge of China. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2001, 21(5): 613-618 (in Chinese)

- [5] 倪潇潇, 周军, 蒲俊文. 利用成组生物测试评估某城市典型污水处理工艺. *环境污染与防治*, 2008, 30(4): 52-55

NI Xiaoxiao, ZHOU Jun, PU Junwen, et al. Assessing four wastewater treatment plants in a city by bioassay. *Environmental Pollution and Control*, 2008, 30(4): 52-55 (in Chinese)

- [6] 景欣悦, 康维钧, 张宏伟. 环境污染物的生物测试方法. *国外医学卫生学分册*, 2005, 32(3): 167-170

JING Xinyue, KANG Weijun, ZHANG Hongwei, et al. Biological test method for environmental pollutants. *Foreign Medical Sciences (Section Hygiene)*, 2005, 32(3): 167-170 (in Chinese)

- [7] TANG J. Y. M., MCCARTY S., GLENN E., et al. Mixture effects of organic micropollutants present in water: Towards the development of effect-based water quality trigger values for baseline toxicity. *Water Research*, 2013, 47(10): 3300-3314

- [8] ALTUCCI L., GRONEMEYER H. Nuclear receptors in

cell life and death. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2001, 12(10): 460-468

- [9] BABÍN M. M., GARCÍA P., FERNÁNDEZ C., et al. Toxicological characterisation of sludge from sewage treatment plants using toxicity identification evaluation protocols based on in vitro toxicity tests. *Toxicology in Vitro*, 2001, 15(4/5): 519-524

- [10] LIU Cao, XU Yiping, MA Mei, et al. Evaluation of endocrine disruption and dioxin-like effects of organic extracts from sewage sludge in autumn in Beijing, China. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 2014, 8(3): 433-440

- [11] 李莉. 污泥及土壤中有毒有机污染物的离体生物毒性效应研究. 新乡: 河南师范大学硕士学位论文, 2012
LI Li. Study on bioassay methods for toxic organic pollutants in sewage sludge and soil. Xinxiang: Master Dissertation of Henan Normal University, 2012 (in Chinese)

- [12] ESCHER B. I., LAWRENCE M., MACOVA M., et al. Evaluation of contaminant removal of reverse osmosis and advanced oxidation in full-scale operation by combining passive sampling with chemical analysis and bioanalytical tools. *Environment Science & Technology*, 2011, 45(12): 5387-5394

- [13] MACOVA M., TOZE S., HODGERS L., et al. Bioanalytical tools for the evaluation of organic micropollutants during sewage treatment, water recycling and drinking water generation. *Water Research*, 2011, 45(14): 4238-4247

- [14] TANG J. Y. M., GLENN E., THOEN H., et al. In vitro bioassay for reactive toxicity towards proteins implemented for water quality monitoring. *Journal of Environmental Monitoring*, 2012, 14(3): 1073-1081

- [15] ESCHER B. I., DUTT M., MAYLIN E., et al. Water quality assessment using the AREc32 reporter gene assay indicative of the oxidative stress response pathway. *Journal of Environmental Monitoring*, 2012, 14(11): 2877-2885

- [16] ESCHER B. I., VAN DAELE C., DUGG M., et al. Most oxidative stress response in water samples comes from unknown chemicals: The need for effect-based water quality trigger values. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(13): 7002-7011

- [17] 李娟英, 苏磊, 崔昱, 等. 上海市典型污水处理厂污泥浸出液的化学和毒性评价. *生态毒理学报*, 2014, 9(3): 467-474

LI Juanying, SU Lei, CUI Yu, et al. Chemical and toxic evaluation of sewage sludge leachate from representative

- STPs in Shanghai. *Asian Journal of Ecotoxicology*, **2014**, 9(3): 467-474 (in Chinese)
- [8] LI Juanying, CUI Yu, SU Lei, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the largest deepwater port of East China Sea: impact of port construction and operation. *Environmental Science and Pollution Research*, **2015**, 22(16): 12355-12365
- [9] LI Juanying, TANG J. Y. M., JIN Ling, et al. Understanding bioavailability and toxicity of sediment-associated contaminants by combining passive sampling with in vitro bioassays in an urban river catchment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **2013**, 32(12): 2888-2896
- [10] XIA Jie, SU Guanyong, ZHANG Xiaowei, et al. Dioxin-like activity in sediments from Tai Lake, China determined by use of the H4IIE-luc bioassay and quantification of individual AhR agonists. *Environmental Science and Pollution Research*, **2014**, 21(2): 1480-1488
- [11] 柳清, 张丽萍, 刘文君, 等. umu 试验研究饮用水氯和氯胺消毒过程中遗传毒性的变化以及消毒条件的影响. *环境科学*, **2010**, 31(1): 93-98
LIU Qing, ZHANG Liping, LIU Wenjun, et al. Genotoxicity of drinking water during chlorine and chloramine disinfection and the influence of disinfection conditions using the umu-test. *Environmental Science*, **2010**, 31(1): 93-98 (in Chinese)
- [12] 李剑, 马梅, 饶凯锋, 等. 酵母双杂交技术构建重组人雌激素受体基因酵母. *生态毒理学报*, **2008**, 3(1): 21-26
LI Jian, MA Mei, RAO Kaifeng, et al. Construction the recombinant human estrogen receptor (hER) gene yeast using two-hybrid yeast technique. *Asian Journal of Ecotoxicology*, **2008**, 3(1): 21-26 (in Chinese)
- [13] 李娟英, 苏磊, 陈洁芸, 等. 利用化学分析和生物毒性监测方法综合评价污水污泥环境影响的研究. *生态与农村环境学报*, **2013**, 29(5): 650-656
LI Juanying, SU Lei, CHEN Jieyun, et al. Comprehensive evaluation of environmental impact of sewage sludge using chemical analysis and bioassay. *Journal of Ecology and Rural Environment*, **2013**, 29(5): 650-656 (in Chinese)
- [14] 申荣艳, 骆永明, 孙玉焕, 等. 长江三角洲地区城市污泥的综合生物毒性研究. *生态与农村环境学报*, **2006**, 22(2): 54-58
SHEN Rongyan, LUO Yongming, SUN Yuhuan, et al. Synthetic biological toxicity of municipal sludges from the Yangtze river delta region. *Journal of Ecology and Rural Environment*, **2006**, 22(2): 54-58 (in Chinese)
- [15] MANTIS I., VOUTSA D., SAMARA C. Assessment of the environmental hazard from municipal and industrial wastewater treatment sludge by employing chemical and biological methods. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **2005**, 62(3): 397-407
- [16] 王欣心, 金银龙. 多环芳烃遗传毒性研究进展. *环境与健康杂志*, **2010**, 27(2): 174-177
WANG Xinxin, JIN Yinlong. Research progress on genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Environment and Health*, **2010**, 27(2): 174-177 (in Chinese)
- [17] 张建超. 环境遗传毒性效应检测方法的建立及其应用. 济南: 山东师范大学硕士学位论文, **2013**
ZHANG Jianchao. Establishment and application of the method for environmental genotoxicity detection. Ji'nan: Master Dissertation of Shandong Normal University, **2013** (in Chinese)
- [18] 肖睿洋, 禹果, 王春霞, 等. 天津地区土壤中遗传毒性物质的分布规律. *环境科学学报*, **2005**, 25(10): 1403-1407
XIAO Ruiyang, YU Guo, WANG Chunxia, et al. Distribution of genotoxic substances in soils in Tianjin Area. *Acta Scientiae Circumstantiae*, **2005**, 25(10): 1403-1407 (in Chinese)
- [19] 禹果, 肖睿洋, 王春霞, 等. 利用离体 umu/SOS 测试与活体蚯蚓彗星试验评价再生水灌溉土壤的遗传毒性. *土壤学报*, **2007**, 44(3): 522-528
YU Guo, XIAO Ruiyang, WANG Chunxia, et al. Genotoxicity assessment of soil irrigated with reclaimed water using in vitro umu/SOS test and in vivo comet assay. *Acta Pedologica Sinica*, **2007**, 44(3): 522-528 (in Chinese)
- [20] CAI Quanying, MO Cehui, WU Qitang, et al. Occurrence of organic contaminants in sewage sludges from eleven wastewater treatment plants, China. *Chemosphere*, **2007**, 68(9): 1751-1762
- [21] 柯真山, 李雪梅, 李建波. 城市污水处理厂污泥中多氯二苯并二恶英/呋喃的分布特征. *环境化学*, **2011**, 30(4): 874-879
KE Zhenshan, LI Xuemei, LI Jianbo, et al. Distribution of PCDDs and PCDFs in sewage sludges from wastewater treatment plants in Beijing. *Environmental Chemistry*, **2011**, 30(4): 874-879 (in Chinese)
- [22] STEVENS J., GREEN N. J. L., JONES K. C. Survey of PCDD/Fs and non-ortho PCBs in UK sewage sludges. *Chemosphere*, **2001**, 44(6): 1455-1462
- [23] BENÍŠEK M., KUKUČKA P., MARIANI G., et al. Dioxins and dioxin-like compounds in composts and diges-

- tates from European countries as determined by the in vitro bioassay and chemical analysis. *Chemosphere*, **2015**, 122: 168-175
- [34] TAKIGAMI H. , SUZUKI G. , SAKAI S. I. Screening of dioxin-like compounds in bio-composts and their materials: chemical analysis and fractionation-directed evaluation of AhR ligand activities using an in vitro bioassay. *Journal of Environmental Monitoring*, **2010**, 12 (11) : 2080-2087
- [35] HONG S. , KHIM J. S. , NAILE J. E. , et al. AhR-mediated potency of sediments and soils in estuarine and coastal areas of the Yellow Sea region: A comparison between Korea and China. *Environmental Pollution*, **2012**, 171: 216-225
- [36] SHEN Chaofeng, HUANG Shengbiao, WANG Zijian, et al. Identification of Ah receptor agonists in soil of E-waste recycling sites from Taizhou area in China. *Environmental Science & Technology*, **2007**, 42(1) : 49-55
- [37] SONG Maoyong, JIANG Qinting, XU Yan, et al. AhR-active compounds in sediments of the Haihe and Dagou Rivers, China. *Chemosphere*, **2006**, 63(7) : 1222-1230
- [38] LIU Li, CHEN Ling, SHAO Ying, et al. Evaluation of the ecotoxicity of sediments from yangtze river estuary and contribution of priority PAHs to ah receptor-mediated activities. *PLoS One*, **2014**, 9(8) : e104748
- [39] QIAO Min, CHEN Yyingying, ZHANG Qinghua, et al. Identification of ah receptor agonists in sediment of Meiliang bay, Taihu lake, China. *Environmental Science & Technology*, **2006**, 40(5) : 1415-1419
- [40] OTTE J. C. , KEITER S. , FABBENDER C. , et al. Contribution of priority PAHs and POPs to Ah receptor-mediated activities in sediment samples from the River Elbe Estuary, Germany. *PLoS One*, **2013**, 8(10) : e75596
- [41] KEITER S. , GRUND S. , VAN BAVEL B. , et al. Activities and identification of aryl hydrocarbon receptor agonists in sediments from the Danube river. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2008**, 390(8) : 2009-2019
- [42] HONG S. , KHIM J. S. , PARK J. , et al. Instrumental and bioanalytical measures of dioxin-like compounds and activities in sediments of the Pohang Area, Korea. *Science of the Total Environment*, **2014**, 470-471: 1517-1525
- [43] TREMBLAY L. , KOHL S. D. , RICE J. A. , et al. Effects of temperature, salinity, and dissolved humic substances on the sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons to estuarine particles. *Marine Chemistry*, **2005**, 96(1 / 2) : 21-34
- [44] BITTNER M. , MACIKOVA P. , GIESY J. P. , et al. Enhancement of AhR-mediated activity of selected pollutants and their mixtures after interaction with dissolved organic matter. *Environment International*, **2011**, 37(5) : 960-964