

对以高锰酸钾为氧化剂的饮用水 工艺流程的细胞毒性评价*

彭 安¹⁾ 柴 文²⁾ 林爱武²⁾ 张素霞²⁾ 刘永康²⁾ 李素文¹⁾ [†]

(1) 北京师范大学生命科学学院, 100875, 北京; 2) 北京市自来水集团有限责任公司,
100085, 北京 // 第一作者 48 岁, 女, 高级实验师)

摘要 用 2 项细胞生物学指标——细胞增殖活性和细胞凋亡率比较了一个饮用水工艺流程各阶段有机提取物作用于细胞的毒性. 实验数据表明: 经强氧化剂高锰酸钾处理水后产生的有机提取物, 对细胞毒性较大, 但经系列水工艺处理后(机加池—煤滤—炭滤—出厂—管网), 加氯出厂水和管网水的水质转好, 说明该饮用水工艺流程有效地去除了对细胞具有毒性的一些污染物质.

关键词 高锰酸钾; 饮用水; 工艺流程; 有机提取物; 细胞毒性

分类号 Q 253; R 123. 1; TE 685. 3⁺ 1

为了除菌、除藻等消毒目的, 在饮用水处理的工艺流程中, 国内外常用臭氧、氯或氯胺等作为氧化剂进行水处理^[1]. 但也有一些饮用水厂采用高锰酸钾作为氧化剂. 由于饮用水源中存在一些可产生异味和气味的物质如某些藻类和某些菌类等, 所以需要一些特殊的氧化剂进行处理. 高锰酸钾这种强氧化剂对于消除异味和气味、控制藻类生长、失活微囊藻毒素有较好的作用, 所以高锰酸钾在国内外被准予进行水处理, 它一般用于水处理的早期阶段^[2-3].

我们以前曾对饮用水的一个工艺流程(源水—源水加氯—絮凝处理—煤沙过滤—活性炭过滤—二次加氯出厂—管网)中各阶段有机提取物的细胞毒性进行过研究^[4], 发现源水加氯比源水致细胞突变率增加, 还发现活性炭过滤是使这一工艺流程水质转好的关键步骤^[5-6].

本课题的目的是对以高锰酸钾为初始氧化剂的一个饮用水工艺流程(源水加高锰酸钾—机加池处理—煤沙过滤—活性炭过滤—加氯出厂—管网)各阶段中有机提取物进行细胞毒性评价, 采用的 2 项细胞毒性指标是: 用 MTT 比色法检测各阶段有机提取物对细胞的增殖活性和用流式细胞光度计检测细胞的凋亡率, 该类研究在国内外还未见报道.

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂 细胞: 中国仓鼠卵巢细胞 (Chinese Hamster Ovary, CHO) 是北京师范大学国家教委细胞增殖研究所冻存的细胞系. 培养在含 $\phi = 10\%$ 小牛血清的 DMEM 培养液中, 置于 $\phi = 5\%$ CO_2 培养箱中 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下培养.

试剂: MTT (Sigma 公司), 用 PBS (pH 7.4) 配成 5 g L^{-1} 的储液, 过滤除菌后, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 避光保存; PI (Sigma 公司) 用 PBS (pH 7.4) 配成 1 g L^{-1} 的储液, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 避光保存; RNA 酶 A (Sigma 公司) 用 PBS (pH 7.4) 配成 5 g L^{-1} 的储液, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存; 丝裂霉素 C (Mitomycin C, MMC) (日本

* 北京市自来水集团资助项目

[†] 联系人

收稿日期: 2004-05-28

Kyowa 公司), 用培养液配成 1 g L^{-1} 的储液, -20°C 保存。

1.2 水样的采集 源水加高锰酸钾预氧化后被引入水厂, 在机械加速澄清池中进行混凝沉淀(下称机加池), 经煤砂滤池、活性炭滤池吸附过滤, 加氯出厂后, 进入管网。取 6 个水样(经高锰酸钾预氧化的源水、机加池水、煤滤池水、炭滤池水、加氯出厂水和管网水)各 200 L, 调 pH 为 2, 以 $60\sim 100 \text{ mL min}^{-1}$ 的体积流量分别通过装有 XAD-2, XAD-4 和 XAD-7 树脂的玻璃柱进行富集, 然后用 3~5 倍床体积的乙酸乙酯洗脱(体积流量为 3 mL min^{-1}), 经无水 Na_2SO_4 脱水, 在温度为 $50\sim 60^\circ\text{C}$ 时减压蒸馏, 将洗脱液浓缩至 $20\sim 30 \text{ mL}$ 。试验前将浓缩的有机提取物在 $40\sim 50^\circ\text{C}$ 水浴下氮气吹干, 在干燥皿内过夜至质量恒定, 然后加入适量的二甲基亚砜(DMSO)作为溶剂, 制备成各水样有机提取物的储液, 调节 DMSO 的用量, 使 $1 \mu\text{L}$ 的水样储液相当于 0.5 L 原各水样体积的有机提取物, 将水样储备液置于 -80°C 中保存备用。

1.3 用 MTT 比色法检测各水样对 CHO 细胞的增殖活性 将 CHO 细胞培养在含 $\phi = 10\%$ 小牛血清的 DMEM 培养液中, 共分 7 个实验组: 阴性对照(溶剂 DMSO)组和 6 个水样组。在 96 孔板中每孔加入 $200 \mu\text{L}$ 细胞悬液(细胞悬液细胞含量为 $1.2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$), 24 h 细胞贴壁后, 在各孔中依序加入阴性对照和 6 个水样, 每个水样组又分为 4 个剂量, 即分别加入相当于各水样原体积为 0.02, 0.04, 0.06 和 0.08 L 水中所含有有机提取物的量, 每个剂量组做 3 个重复孔。在 37°C , $\phi = 5\% \text{ CO}_2$ 培养箱中培养 48 h 后, 弃去原培养液, 加入 $100 \mu\text{L}$ 新鲜培养液和 $10 \mu\text{L}$ MTT 储液(5 g L^{-1}), 孵育 4 h 后, 向每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 助溶剂($\phi = 10\% \text{ SDS}$, $0.001 \text{ mol L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$), 混匀置于 37°C , $\phi = 5\% \text{ CO}_2$ 培养箱中过夜后, 用酶标仪(550 型, BiORad 公司)在波长 570 nm 处测定光密度 D。

1.4 用荧光探针 PI 标记细胞 DNA、流式细胞仪测量各水样造成细胞的凋亡率 $\gamma_{\text{凋亡}}^{[7]}$ 将 CHO 细胞培养在含 $\phi = 10\%$ 小牛血清的 DMEM 培养液中, 在 6 孔板中每孔加入 2 mL 细胞悬液($2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$), 24 h 细胞贴壁后, 弃去原培养液, 每孔加入 2 mL 新鲜培养液, 在各孔中依序加入阴性对照(溶剂 DMSO)和 6 个水样。

水样被分为低剂量实验组和高剂量实验组。低剂量实验组为每孔分别加入 6 个程序的水样相当原水 0.1 和 0.2 L 中含有的有机提取物的量, 在 37°C , $\phi = 5\% \text{ CO}_2$ 培养箱中处理 48 h。高剂量实验组为每孔分别加入 3 个程序的水样(机加池、出厂和管网)相当原水 0.6 和 1.2 L 中含有的有机提取物的量, 在 37°C , $\phi = 5\% \text{ CO}_2$ 培养箱中处理 72 h。再用胰酶消化并离心收集细胞, 用 4°C 预冷的 $\phi = 70\%$ 乙醇固定细胞至少 48 h 后, 进行流式细胞仪分析(EPICS @XL, Coulter 公司)。在分析测量前, 加入 PBS 后离心除去固定液, RNA 酶 A(终质量浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 37°C 孵育 0.5 h 后, 将样品管立即插入冰浴中, 停止 RNA 酶 A 的消化作用。用荧光探针 PI(终质量浓度为 50 mg L^{-1})避光标记 1 h 以上, 流式细胞分析仪测定 DNA 含量。测量条件: 488 nm 氩离子激发, 620 nm 长波通滤片收集红色荧光, 低于 G1 期 DNA 含量的细胞群体为凋亡细胞。

2 结果

2.1 各水样对 CHO 细胞增殖活性的影响 实验结果见表 1 和图 1。表 1 列出的 D 值都是在 96 孔板上 3 个重复孔测量出的平均值和标准差($\bar{x} \pm s$), 表中还列出各水样的 $\bar{x}$ 与相应阴性对照 D 之间差异的显著性(t 检验法)。

表 1 MTT 法检验不同原水体积的各水样中有机提取物作用细胞的 珎 值 (n = 3)

水样	珎 ±s			
	0.02 L	0.04 L	0.06 L	0.08 L
阴性对照	0.949 ±0.020	0.924 ±0.015	0.886 ±0.110	0.958 ±0.114
高锰酸钾处理水	0.426 ±0.026 ***	0.288 ±0.038 ***	0.203 ±0.021 ***	0.182 ±0.028 ***
机加池水	0.918 ±0.039	0.934 ±0.012	0.877 ±0.005	0.772 ±0.035
煤滤池水	0.645 ±0.033 ***	0.578 ±0.013 ***	0.453 ±0.015 ***	0.399 ±0.018 **
炭滤池水	0.613 ±0.055 ***	0.537 ±0.017 ***	0.444 ±0.035 ***	0.410 ±0.054 **
出厂水	0.873 ±0.028 *	0.855 ±0.031 *	0.813 ±0.001	0.789 ±0.009
管网水	0.893 ±0.026 *	0.902 ±0.047	0.853 ±0.044	0.870 ±0.020

水样与相应的阴性对照比: * 差别显著 (P < 0.05); **差别非常显著 (P < 0.01); ***差别极显著 (P < 0.001) .

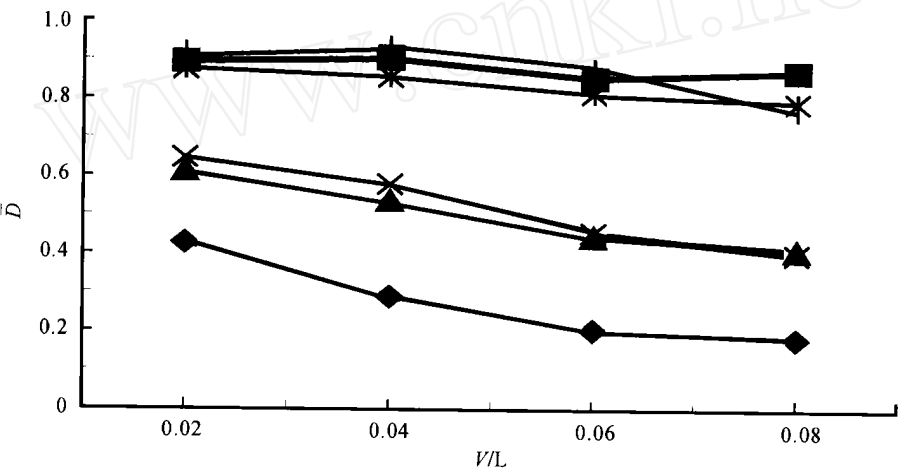


图 1 各水样对细胞的增殖活性

◆ 高锰酸钾处理水; + 机加池水; × 煤滤池水; ▲ 炭滤池水;
* 出厂水; ● 管网水; ■ 阴性对照.

图 1 为用 MTT 比色法测出的各水样对细胞增殖活性的影响,横坐标为相应各水样的原水体积 *V*,纵坐标为 3 个重复孔的 珎.

对 6 个水样的 *V* 和 珎 值间进行线性相关分析表明:除机加池水和管网水线性相关不够显著外,其余 4 个水样线性相关都为显著 (*P* < 0.05),而且线性方程的斜率都是负数,说明随着 *V* 的增加,即有机提取物的增多,珎 值降低,细胞毒性增大.

对于 4 个不同的水样剂量(0.02,0.04,0.06 和 0.08 L),高锰酸钾处理后产生的有机物作用于细胞的 珎 值都比相应阴性对照显著低 (*P* < 0.001),珎 值约在 0.2~0.4 范围内;煤滤池和炭滤池处理后的水中产生的有机物作用于细胞的 珎 值在原水体积为 0.02,0.04 和 0.06 L 都比相应阴性对照显著低 (*P* < 0.001),在 0.08 L 比相应阴性对照也明显低 (*P* < 0.01),珎 值约在 0.4~0.6 范围内;机加池水处理与相应阴性对照比差别都不显著 (*P* > 0.05);出厂水 0.02 和 0.04 L 以及管网水 0.02 L 均比相应阴性对照低 (*P* < 0.05),但出厂水和管网水的其余各体积样点都与相应阴性对照比差别不显著 (*P* > 0.05),阴性对照、机加池水、出厂水和管网水的 珎 值约在 0.8~1.0 范围内.

2.2 各水样诱导 CHO 细胞 *Y*_{调亡} 的比较 从图 1 MTT 实验曲线可以清楚地看出:工艺流程的 6 种处理中,高锰酸钾氧化、煤滤和炭滤后产生的有机提取物对细胞毒性较大,而其他 3 个

水样产生的有机提取物对细胞毒性较小,所以检测 $Y_{\text{凋亡}}$ 时,设计了低剂量处理 48 h 组(0.1 L, 48 h 和 0.2 L, 48 h)和高剂量处理 72 h 组(0.6 L, 72 h 和 1.2 L, 72 h)2 组实验, $Y_{\text{凋亡}}$ 检测结果见表 2 和图 2.

表 2 FCM 法检验各水样处理细胞造成的凋亡率 $Y_{\text{凋亡}}$ %

水样	$Y_{\text{凋亡}}$			
	0.1 L, 48 h	0.2 L, 48 h	0.6 L, 72 h	1.2 L, 72 h
高锰酸钾处理水	8.45 ***	11.95 ***		
煤滤池水	3.61 ***	8.52 ***		
炭滤池水	3.37 ***	9.47 ***		
机加池水	2.05	2.92 ***	4.01 ***	7.21 ***
出厂水	1.77 *	2.09	3.41 ***	5.26 ***
管网水	2.16	1.93	2.52	3.92 ***
阴性对照	2.17	2.00	2.25	2.96

凋亡率水样与相应的阴性对照比差别: *** 非常显著 ($P < 0.001$); * 显著 ($P < 0.05$).

用 t 测验法对各水样与相应阴性对照的 2 个 $Y_{\text{凋亡}}$ 之间的差异进行比较,发现:在 0.1 L, 48 h 和 0.2 L, 48 h 的 2 组低剂量处理中,高锰酸钾氧化、煤滤和炭滤后产生的有机提取物与相应阴性对照的 $Y_{\text{凋亡}}$ 之间的差异都非常显著 ($P < 0.001$);机加池处理后的有机提取物除 0.1 L 处理 48 h 外与相应阴性对照的 $Y_{\text{凋亡}}$ 之间差异都非常显著 ($P < 0.001$);出厂水与相应阴性对照的 $Y_{\text{凋亡}}$ 相比较,在 0.1 L 处理 48 h 前

者反而低于后者 ($P < 0.05$) (2 次实验数据),在 0.2 L 处理 48 h 二者无显著差异,在 0.6 L 处理 72 h 和 1.2 L 处理 72 h 二者都有非常显著差异 ($P < 0.001$);管网水除 1.2 L 处理 72 h 与相应阴性对照的 $Y_{\text{凋亡}}$ 之间有非常显著性差异 ($P < 0.001$) 外,其余都无显著性差异 ($P > 0.05$).

3 讨论

为评价以高锰酸钾为初始氧化剂的饮用水工艺流程各阶段的细胞毒性,一个原则是采用阴性对照作为参照物,因为阴性对照(溶剂)未经任何水样处理;另一个原则是采用上述 2 个细胞生物学指标综合评价水样中有机提取物的细胞毒性. 其中 MTT 法是以 D 值的高低来判断细胞毒性的高或低. MTT 比色法的主要原理^[8]是:试剂 MTT 被活细胞中线粒体脱氢酶还原后,裂解成暗蓝色甲簪,甲簪被助溶剂溶解后,可在酶标仪上读取 D 值. 测出的 D 值越高,活细胞越多,细胞活性越高,说明水样中有机提取物对细胞的毒性越小;反之测出的 D 值越低,说明水样中有机提取物对细胞的毒性越大. 细胞 $Y_{\text{凋亡}}$ 的测定在一定程度上反映着细胞 DNA 的损伤

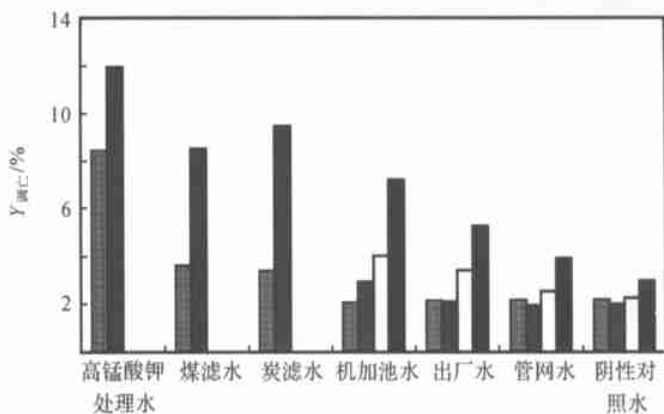


图 2 各水样对细胞凋亡率 $Y_{\text{凋亡}}$ 的影响

■ 0.1 L, 处理 48 h; ■ 0.2 L, 处理 48 h;
□ 0.6 L, 处理 72 h; ■ 1.2 L, 处理 72 h.

情况,当细胞受到不良刺激,导致 DNA 损伤、细胞不能自我修复时,可通过启动凋亡程序消除这些突变的细胞, $Y_{凋亡}$ 越高,说明对细胞的毒性越大^[9-10].表 3 列出这些综合比较的结果.

表 3 饮用水处理流程各水样中有机提取物对细胞增殖活性和 $Y_{凋亡}$ 的综合比较

检测指标	处理剂量	处理时间	P					
	L	h	高锰酸钾处理水	机加池水	煤滤水	炭滤水	出厂水	管网水
细胞增殖活性	0.1	48	***	×	***	***	*	*
	0.2	48	***	×	***	***	*	×
	0.3	48	***	×	***	***	×	×
	0.4	48	***	×	**	**	×	×
$Y_{凋亡}$	0.1	48	***	×	***	***	*	×
	0.2	48	***	***	***	***	×	×
	0.6	72		***			***	×
	1.2	72		***			***	***

水样与相应的阴性对照比差异:*** 极显著($P<0.001$);** 非常显著($P<0.01$);* 显著($P<0.05$);
× 不显著($P>0.05$);空格为未检测.

表 3 数据表明:虽然水处理开始时,经强氧化剂高锰酸钾处理后产生的有机提取物造成对细胞增殖的毒性最大, $Y_{凋亡}$ 最高,对细胞的毒性很强;煤滤池和炭滤池处理对细胞的毒性类似,也较大,但次于高锰酸钾处理;但最终经系列水工艺处理后,有效地去除了对细胞具有毒性的一些污染物质,使出厂水和管网水的水质转好.鉴于高锰酸钾处理水对细胞的毒性较大,对后续处理污染也较严重,建议今后应采用更为有效并且污染少的饮用水处理氧化剂.

4 参考文献

[1] William B,Andersona b, Colin I,et al. Endotoxin inactivation by selected drinking water treatment oxidants[J]. Water Research ,2003 ,37 :4553

[2] J ütner F. Physiology and biochemistry of odorous compounds from freshwater cyanobacteria and algae[J]. Wat Sci Tech ,1995 ,31(11) :69

[3] Khiari D ,Suffet I H ,Barrett S E,et al. The determination of compounds causing fishy/ swampy odors in drinking water supplies[J]. Wat Sci Tech ,1995 ,31(11) :105

[4] 刘艳红,柴文,李素文,等. 用 CBMN 法评价饮用水处理流程中有机提取物的细胞毒性[J]. 环境科学, 1998 ,19(3) :42

[5] 李素文,曲宁,樊颖,等. 用 MTT 比色法比较 5 种国产活性炭对饮用水中毒性物质的吸附作用[J]. 工业水处理, 2001 ,21 :10

[6] 李艳平,梁如冰,李素文,等. 5 种国产活性炭吸附饮用水中有机提取物的比较[J]. 工业水处理, 2002 , 22 :35

[7] 方敏,张鸿卿,薛绍白,等. 三尖杉酯碱诱导 HL-60 细胞程序死亡[J]. 科学通报,1994 ,39 :1125

[8] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. J. Immunological Methods ,1983 ,65 :55

[9] Budihardjo I,Oliver H,Wang X D, et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis[J]. Annu Rev Cell Dev Biol ,1999 ,15 :269

[10] Watters D. Molecular mechanisms of ionizing radiation-induced apoptosis[J]. Immun Cell Biol ,1999 , 77 :263

CYTOTOXICITY EVALUATION FOR TECHNOLOGICAL PROCESS OF DRINKING WATER TREATING WITH POTASSIUM PERMANGANATE AS OXIDANT

Peng An¹⁾ Chai Wen²⁾ Lin Aiwu²⁾

Zhang Suxia²⁾ Liu Yongkang²⁾ Li Suwen¹⁾

(1) College of Life Sciences, Beijing Normal University, 100875, Beijing, China

2) Beijing Waterworks Group Co. LTD. , 100085, Beijing, China)

Abstract The cytotoxicities of the organic extracts from six steps during the technological process of drinking water are compared using 2 cytotoxicity indexes: the cytotoxicity for cell proliferation by MTT colorimetric assay and the rate of apoptosis by flow cytometry (FCM). The results show that organic extracts from source water treated with strong oxidant potassium permanganate have higher cytotoxicity. After a series of treatments, the flocculation water → the sand filtrated water → the carbon filtrated water → the chlorinated exit water → the tap water (the users' water), the quality of the exit water and the tap water becomes finer. These data illuminate that the technological process of drinking water are efficient for removing organic contamination from drinking water.

Key words potassium permanganate; drinking water; technological process; organic extracts; cytotoxicity