

马军, 文刚, 邵晓玲. 2009. 城市污水处理厂各工艺阶段内分泌干扰物活性变化规律研究 [J]. 环境科学学报, 29(1): 63 - 67

Ma J, Wen G, Shao X L. 2009. Investigation on the estrogenicity of different processes in a sewage treatment plant [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 29(1): 63 - 67

城市污水处理厂各工艺阶段内分泌干扰物活性变化规律研究

马军*, 文刚, 邵晓玲

哈尔滨工业大学, 城市水资源开发利用 (北方) 国家工程研究中心, 城市水资源与水环境国家重点实验室, 哈尔滨 150090

收稿日期: 2008-04-07 录用日期: 2008-12-02

摘要: 使用固相萃取-酵母双杂交法研究了东北地区某污水厂内分泌干扰物活性随季节的变化及不同处理单元的去除情况。结果表明, 该法的 EC_{50} 值为 $5.95 \times 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 具有较高灵敏度。对污水水样检测得出, 原污水及一沉池出水内分泌干扰物活性雌二醇当量值分别为 $16.13 \sim 21.65$ 和 $17.10 \sim 22.85 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, 均以夏季最高、冬季最低; 经过 A/O 工艺处理, 二沉池出水的内分泌干扰物活性降至 $3.37 \sim 6.76 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, 以冬春较高、夏秋较低; 整个污水处理工艺对内分泌干扰物活性的去除率为 $58.1\% \sim 84.2\%$, 平均为 75.2% , 也以夏季最高、冬季最低。研究还发现, 二级生物处理工艺对内分泌干扰物活性起主导去除作用, 而一沉池对内分泌干扰物的去除能力非常有限, 甚至较进水有升高现象发生。

关键词: 固相萃取; 酵母双杂交系统; 内分泌干扰物; 城市污水处理厂

文章编号: 0253-2468(2009)01-63-05 中图分类号: X703 文献标识码: A

Investigation on the estrogenicity of different processes in a sewage treatment plant

MA Jun*, WEN Gang, SHAO Xiaoling

National Engineering Research Center of Urban Water Resources, State Key Laboratory of Urban Water Resources and Environment, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090

Received 7 April 2008; accepted 2 December 2008

Abstract: A solid phase extraction/yeast two-hybrid system was used to investigate the estrogenicity of wastewater in different seasons from each treatment unit of a sewage treatment plant located in the northeast part of China. Results showed that yeast two-hybrid system had a relatively high sensitivity with EC_{50} value of $5.95 \times 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. The estrogenic activities in raw sewage and the effluent of primary sedimentation were $16.13 \sim 21.65$, $17.10 \sim 22.85 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ Estradiol Equivalents (EEQs), respectively, with the highest EEQs in summer and the lowest in winter. The estrogenic activity in the effluent of secondary sedimentation was reduced to $3.37 \sim 6.76 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ EEQs after the A/O process, with the higher level in spring and winter, the lower in summer and autumn. The total and average removal rates of the whole treatment process were $58.1\% \sim 84.3\%$ and 75.2% , respectively, with the highest removal rate in summer, the lowest in winter. Additionally, it was shown that the secondary biotreatment process played a dominant role in the removal of estrogenic activity, whereas the primary treatment process had very limited removal efficiency such that the estrogenic level even increased compared with that in raw sewage.

Keywords: solid phase extraction; yeast two-hybrid system; endocrine disrupting chemicals; sewage treatment plant

1 引言 (Introduction)

内分泌干扰物 (Endocrine Disrupting Chemicals, EDCs) 是指那些可以模拟天然激素生理、生化作用, 干扰或抑制生物体内分泌、神经、免疫和生殖系统

功能, 产生可逆或不可逆性生物学效应的物质 (Colborn *et al*, 1993), 主要包括固醇类激素、表面活性剂、工业化合物、杀虫剂和食品添加剂。有报道称, 在水中几 $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 雌二醇当量的 EDCs 便会造成鱼类的生殖系统紊乱, 对于人类可能导致不孕不

基金项目: 教育部知识创新工程重大项目培育基金项目 (No. 705013)

Supported by the Foundation for the Major Program in Innovation Engineering from the Ministry of Education of China (No. 705013)

作者简介: 马军 (1962—), 男, 教授 (博士), E-mail: majun@hit.edu.cn; *通讯作者 (责任作者)

Biography: MA Jun (1962—), male, professor (Ph.D.), E-mail: majun@hit.edu.cn; *Corresponding author

育、自然流产等生殖危害,引起人类精液质量下降,乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌等肿瘤的发病率升高 (Samir *et al*, 2006).

水资源短缺已成为世界范围内存在的问题,而在我国尤为严重.污水回用将是缓解水资源短缺的有效措施,而城市污水处理厂对各种有毒有害物质的去除效率直接关系到污水回用的安全性.生活污水和工业废水是水环境中 EDCs 的主要来源,因而城市污水处理厂对于控制、阻断 EDCs 进入到天然水体中发挥了重要的作用.国外许多学者对城市污水处理厂去除 EDCs 进行了很多研究,但大多数只调查了 EDCs 的浓度变化,仅有少数研究对 EDCs 的毒性进行了评价,且多数是研究总体去除率,对于各个工艺的去除研究较少;而在国内,关于东北寒冷地区城市污水厂对内分泌干扰物活性的去除情况未见报道.所以,非常有必要对东北寒冷地区城市污水处理厂去除 EDCs 的情况进行深入调查研究.

本研究以东北寒冷地区某城市污水处理厂一沉池进水(原污水)、一沉池出水及二沉池出水为研究对象,该污水处理厂采用典型的活性污泥工艺,其流程图和取样点如图 1 所示.使用固相萃取 酵母双杂交法测定了内分泌干扰物活性随季节的变化及各工艺阶段的去除情况,旨在为污水厂强化、提高 EDCs 的去除提供基础科学依据.

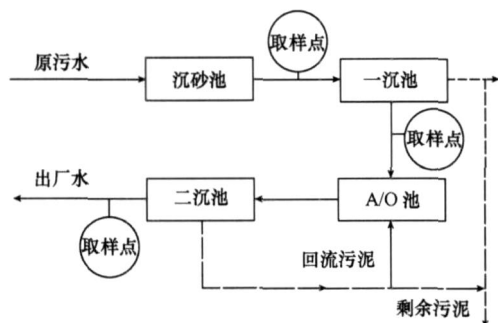


图 1 东北某污水厂工艺流程示意图

Fig 1 Flow chart of a sewage treatment plant located in northeast part of China

2 材料与方法 (Materials and methods)

2.1 主要试剂

雌二醇 (17β -Estradiol, E2)、二甲基亚砜 (Dimethyl Sulphoxide, DMSO) 和邻硝基酚 β -D-半乳糖苷 (*o*-Nitrophenyl β -D-galactopyranoside, ONPG) 购自 Sigma 公司, HPLC 级甲醇购自 Dikma 公司, 色谱

纯级二氯甲烷与氯仿购自天津科密欧公司, 无氨基酸酵母氮碱 (yeast nitrogen base without amino acids) 购自 Difco 公司, DO / -Leu / -His 添加剂购自 Clontech 公司, 其余试剂为国产分析纯, 超纯水 ($18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$) 为 Milli-Q 纯水仪制得.

2.2 样品采集与预处理

在 2006 年 8 月至 2007 年 4 月的春、夏、秋、冬四季中, 用棕色带盖 4L 玻璃瓶同时采集了一沉池进水、一沉池出水及二沉池出水, 各水样采样量为 20L. 水样取回实验室后立即用 $1\mu\text{m}$ 玻璃纤维滤膜 (Whatman) 过滤, 将滤过液用浓硫酸调 $\text{pH} < 2$ 后固相萃取富集, 对膜上截留的颗粒物采取冻干处理. 实验用玻璃器皿及玻璃纤维滤膜全部预先在 500°C 温度下灼烧 2h. 实验选用 Waters C18 固相萃取小柱, 在水样浓缩前依次用 5mL 甲醇与 5mL Milli-Q 水活化小柱, 富集时调节系统 (Supelco VisiprepTM DL 十二管防交叉污染固相萃取装置) 真空度使水样过柱流速大约控制在 $10\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$. 洗脱前首先用 10mL 超纯水清洗小柱, 真空干燥后用甲醇 / 二氯甲烷 (80/20, 体积比) 混合洗脱液共 10mL 分 2 次洗脱柱子. 2 次洗脱液合并后, 轻柔氮气吹干, 最后用 DMSO 定容. 各水样富集浓缩 125 ~ 2000 倍.

将已冻干截留有颗粒物的玻璃纤维膜剪成小块, 加一定量的甲醇 / 二氯甲烷混合萃取剂隔夜浸泡, 并超声波辅助萃取, 萃取液氮气吹干后 DMSO 定容. 考虑到实验所用溶剂及样品浓缩富集过程中有空白来源, 所以对 3 份 1000mL 超纯水做相同处理作为试剂空白, 结果均呈阴性反应. 上述 2 部份测定结果之和为水样总内分泌干扰物活性.

2.3 双杂交酵母测试方法

所采用的酵母菌由中国科学院生态环境研究中心提供. 该酵母菌是人工构建的一种能够同时表达人雌激素受体基因和受体共激活因子 GRIP1 基因的双杂交酵母, 与单杂交酵母菌相比, 该酵母菌由于具有受体共激活因子, 所以具有能模拟真核细胞真实情况、不容易产生假阴性或假阳性的优势, 是一种体外筛选拟雌激素效应环境化合物的高效测试技术 (Rao *et al*, 2004).

具体测试方法见参考文献 (Ma *et al*, 2007). 具体地说, 将菌种接种至 SD / -Trp / -Leu 培养基中, 在 30°C 、 $130\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下培养, 当菌液生长至 600nm 处吸光度值 (OD_{600}) 介于 2 ~ 6 之间时, 用新鲜的同

一种培养基稀释该菌悬液至 OD_{600} 值为 0.75 左右, 移取稀释后的菌悬液 0.995 mL 于 1.5 mL 离心管中, 并加入 5 μ L 待分析样品, 振荡混匀. 然后从离心管中移取 200 μ L 样品至 96 孔板中, 做 4 个平行样, 于 30、800 $r \cdot min^{-1}$ 条件下振荡培养 4 h. 培养结束, 首先测定菌悬液的 OD_{600} 值, 然后每孔弃去 150 μ L 菌液, 再分别加入 120 μ L 测试缓冲液 (21.51 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 6.22 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 0.75 g KCl 及 0.25 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 溶解并定容于 1 L 蒸馏水中 (基础缓冲液)). 再加入 3.33 mL 十二烷基硫酸钠溶液 (0.1%) 和 270 μ L (β 巯基乙醇) 和 20 μ L 氯仿, 在 30、1050 $r \cdot min^{-1}$ 条件下培养 10 min, 然后加入 40 μ L ONPG (13.3 mmol $\cdot L^{-1}$, 溶于基础缓冲液中), 在 30、800 $r \cdot min^{-1}$ 条件下培养进行显色反应, 显色后每孔分别加入 100 μ L Na_2CO_3 (1 mol $\cdot L^{-1}$) 溶液, 在 30、600 $r \cdot min^{-1}$ 条件下再培养 10 min, 终止显色反应. 分别从每孔移取上清液 200 μ L 至新 96 孔板中, 然后测 OD_{420} 值. 同时, 以 5 μ L DMSO 作阴性 (空白) 对照, 以 5 μ L 溶有 E2 的 DMSO 作阳性对照, 按上述方法进行测定.

用式 (1) 计算 β 半乳糖苷酶诱导活性 U :

$$U = \frac{OD_{420} - OD'_{420}}{t \times V \times OD_{600}} \quad (1)$$

式中: t 为加入 ONPG 到溶液显色时的反应时间 (min); V 为菌液体积 (mL); OD_{600} 、 OD_{420} 分别为菌液在 600、420 nm 处的吸光度值; OD'_{420} 是空白对照在 420 nm 处的吸光度值.

3 结果 (Results)

3.1 17 β 雌二醇剂量 活性效应关系

以 DMSO 为溶剂, 配置一系列浓度的 E2 标准

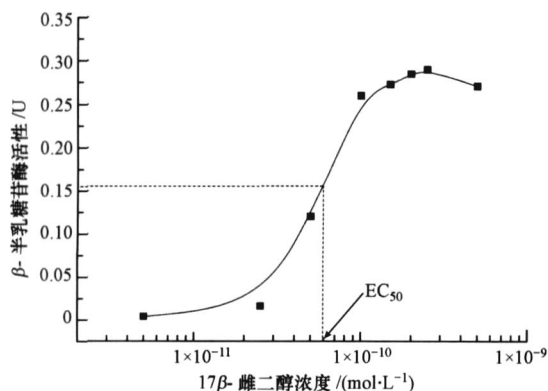


图 2 17 β 雌二醇的剂量 效应曲线

Fig 2 Dose-effect curve for 17 β -estradiol activity

溶液, 按上述方法测定 β 半乳糖苷酶诱导活性值, 得出 E2 的剂量 活性效应关系曲线, 如图 2 所示, EC_{50} 值为 $5.95 \times 10^{-11} \text{ mol} \cdot L^{-1}$, 即 $16.18 \text{ ng} \cdot L^{-1}$. 与报道 (Routledge *et al*, 1996; Wu *et al*, 2004; He *et al*, 2002) E2 在重组酵母系统中 EC_{50} 值为 $10^{-10} \sim 3 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot L^{-1}$ 的结果相比, 本方法 EC_{50} 值更低, 更加灵敏.

3.2 污水处理厂各阶段内分泌干扰活性测定结果

实验结果如图 3 所示, 一沉池进水的内分泌干扰活性为 $16.13 \sim 21.65 \text{ ng} \cdot L^{-1}$ 雌二醇当量值 (EEQs), 平均值为 $19.14 \text{ ng} \cdot L^{-1}$ EEQs. Anders 等 (2003) 报道瑞典污水处理厂进水中内分泌干扰活性为 $1.6 \sim 30 \text{ ng} \cdot L^{-1}$ EEQs, 与本研究结果基本在同一水平上; Hashimoto 等 (2007) 报道日本污水处理厂进水中内分泌干扰活性为 $83 \text{ ng} \cdot L^{-1}$ EEQs, 相比高于本研究值. 本研究中一沉池出水的内分泌干扰活性为 $17.10 \sim 22.85 \text{ ng} \cdot L^{-1}$ EEQs, 平均值为 $19.34 \text{ ng} \cdot L^{-1}$ EEQs. 经过 A/O 工艺处理, 二沉池出水的内分泌活性降至 $3.37 \sim 6.76 \text{ ng} \cdot L^{-1}$ EEQs, 平均值为 $4.82 \text{ ng} \cdot L^{-1}$ EEQs, 这与 Anders 等 (2003) 的研究报道也很相近 ($0.1 \sim 15 \text{ ng} \cdot L^{-1}$), 但仍低于 Hashimoto (2007) 等的报道 ($23 \text{ ng} \cdot L^{-1}$). 该污水厂对内分泌干扰活性的去除率为 $58.1\% \sim 84.2\%$, 平均值为 75.2% . 此外, 本研究还发现, 对于污水, 内分泌干扰活性主要存在于液相中, 固相中只占很少一部分 (占总活性的 $7.7\% \pm 5.5\%$), Anders 等 (2003) 也发现存在于固相中的内分泌干扰活性小于 $0.1 \text{ ng} \cdot L^{-1}$ EEQs.

由图 3 可以看出, 一沉池中对内分泌干扰物去除能力非常有限. 除春季外, 一沉池在其它 3 个季节对于内分泌干扰物不但没有去除, 反而有所升高.

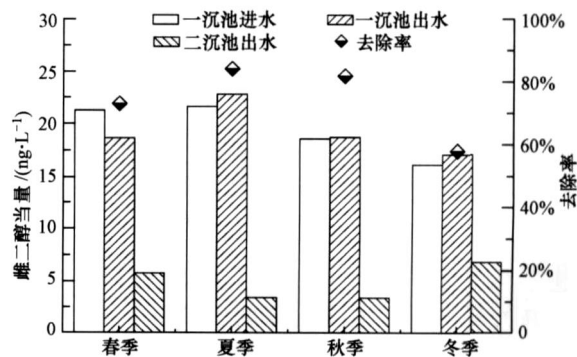


图 3 内分泌干扰活性的变化情况

Fig 3 Profile of estrogenic activity along the wastewater treatment process

在夏季、秋季和冬季分别升高了 5.54%、0.92%和 6.01%。由试验结果可看出,内分泌干扰活性的主导去除作用发生在 A/O 工艺中,在春季、夏季、秋季和冬季 A/O 工艺对内分泌干扰活性的去除率分别为 69.2%、85.1%、82.0%和 60.5%,使得二沉池出水的活性得到大幅度降低。

由图 3 还可以看出,一沉池进水和一沉池出水的内分泌干扰活性以夏季最高,冬季最低;对于二沉池出水,内分泌干扰活性则以冬春较高,夏秋较低。内分泌干扰活性的去除率也是夏季最高(84.2%),冬季最低(58.1%)。

4 讨论 (Discussion)

一沉池在在夏季、秋季和冬季 3 个季节对于内分泌干扰物不但没有去除,反而有所升高。这主要有两方面的原因,一方面是一沉池主要通过重力沉降去除大颗粒物,而污水的内分泌干扰活性恰恰主要存在于液相中,所以一沉池对污水的内分泌干扰活性起不到显著降低作用;另一方面,固醇类雌激素是水环境中导致雌激素干扰效应的主要成份 (Hashimoto *et al.*, 2007),而人体排泄出的固醇类雌激素绝大多数是以葡萄糖醛酸盐及硫酸盐等无活性结合态形式存在,它们在微生物作用下逐步裂解释放出具有活性的雌激素物质,其实这种裂解作用在下水道肠道微生物的作用下就已经开始 (Desbrow *et al.*, 1998; Baronti *et al.*, 2000),而且在一沉池中仍然持续,从而导致一沉池出水的内分泌干扰活性有所升高。

内分泌干扰活性的主导去除作用发生在 A/O 处理工艺中,这主要是由于微生物的降解作用和剩余污泥的吸附作用所致 (Johnson *et al.*, 2001)。Ren 等 (2007)还研究发现雌酮 (estrone, E1)、E2、17 α -乙炔雌二醇 (ethinylestradiol, EE2) 等这些固醇类雌激素主要是通过氨氧化细菌共代谢作用和异养菌作用得到降解,当在污水处理过程中维持高效的硝化能力时,它们便可以得到很好的去除。

由于温度影响微生物代谢活性,结合态无活性的雌激素类物质在温度较高时更容易裂解,所以温度较高的夏季原污水中内分泌干扰活性最高,而在温度较低的冬季则正好相反。另外,由于东北地区夏季和冬季的温差较大,在夏季, A/O 池微生物活性高,内分泌干扰物得到了很好降解,表现为去除率高,而温度较低的冬季微生物活性也低,所以导

致去除率低。Ren 等 (2007)发现在低温 (4)时,降解 EDCs 的异养菌活性完全被抑制,而通过共代谢降解 EDCs 的氨氧化细菌却仍有活性,所以在冬季低温时,会造成 EDCs 去除率下降,但不会完全抑制其去除。

从本研究结果看出,传统活性污泥法为主导的污水处理工艺并不能完全去除 EDCs,仍有一部分 EDCs 进入到天然水体中,将对其中的水生生物及人类健康构成极大威胁。污水处理厂对 EDCs 的去除与诸多因素有关,包括 EDCs 的理化特性、污水水质、处理方法、污水处理厂的运行条件等,甚至与一个地区的气候有关 (Byms, 2001)。有研究发现,污水处理厂的运行条件中温度和污泥龄 (SRT) 影响较大。在低温 (4)时,降解 EDCs 的异养菌活性完全被抑制,在温度较高时 (45)又会造成氨氧化细菌共代谢降解 EDCs 的活性停止 (Ren *et al.*, 2007); SRT 越大,则 EDCs 去除率也会越大 (Hashimoto *et al.*, 2007)。所以,要控制、减少污水中 EDCs 向水环境排放,一方面,可以通过改进现有运行条件来强化 EDCs 的去除;另一方面,也可以对二级处理出水增加深度处理工艺,如活性炭吸附、氧化法、膜分离技术等来提高 EDCs 的去除。

5 结论 (Conclusions)

- 1) 酵母双杂交法是一种实际可行的高效测试方法,可以用于调查实际水样的内分泌干扰活性。
- 2) 原污水中内分泌干扰活性为 16.13 ~ 21.65 ng·L⁻¹ EEQs, 平均值为 19.14 ng·L⁻¹ EEQs, 以夏季最高,冬季最低。经过二级处理后出厂水内分泌干扰活性降至 3.37 ~ 6.76 ng·L⁻¹ EEQs, 平均值为 4.82 ng·L⁻¹ EEQs, 以冬春较高,夏秋较低。
- 3) 整个污水厂工艺对内分泌干扰活性的去除率为 58.1% ~ 84.2%, 以夏季最高,冬季最低。
- 4) 一沉池对内分泌干扰活性去除能力非常有限,且常有内分泌干扰活性升高现象发生;二沉池起主导去除作用。

致谢:感谢中国科学院生态环境研究中心王子健老师和马梅老师提供菌种以及学习机会。

责任作者简介:马军 (1962—),男,博士生导师,长江学者特聘教授,第六届“中国青年科学家奖”获得者,主要研究方向为水的深度处理技术。E-mail: majun@hit.edu.cn

参考文献 (References):

Anders S, Allard S S, Mats E. 2003. Removal of estrogenicity in

- Swedish municipal sewage treatment plants [J]. *Water Research*, 37(18): 4433—4443
- Baronti C, Curini R, D'Ascenzo G, *et al* 2000. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in receiving river water [J]. *Environmental Science and Technology*, 34(24): 5059—5066
- Byms G 2001. The fate of xenobiotic organic compounds in wastewater treatment plants [J]. *Water Research*, 35(10): 2523—2533
- Colborn T, Vom S F, Soto A M. 1993. Developmental effects of endocrine disrupting chemicals in wild life and humans [J]. *Environmental Health Perspectives*, 101(5): 378—384
- Desbrow C, Routledge E J, Brighty G C, *et al* 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening [J]. *Environmental Science and Technology*, 32(11): 1549—1558
- Hashimoto T, Onda K, Nakamura Y, *et al* 2007. Comparison of natural estrogen removal efficiency in the conventional activated sludge process and the oxidation ditch process [J]. *Water Research*, 41(10): 2117—2126
- 何世华, 梁增辉, 战威. 2002. 环境雌激素重组酵母测评系统的建立 [J]. *环境与健康杂志*, 19(1): 57—59
- He S H, Liang Z H, Zhan W. 2002. Establishment of the recombinant yeast assay system for environmental estrogens [J]. *Journal of Environment and Health*, 19(1): 57—59 (in Chinese)
- Johnson A C, Sumpter J P. 2001. Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works [J]. *Environmental Science and Technology*, 35(24): 4697—4703
- Ma M, Rao K F, Wang Z J. 2007. Occurrence of estrogenic effects in sewage and industrial wastewaters in Beijing, China [J]. *Environmental Pollution*, 147(2): 331—336
- 饶凯锋, 马梅, 王子健, 等. 2004. 南方某水厂处理工艺过程中内分泌干扰物的变化规律研究 [J]. *环境科学*, 25(6): 123—126
- Rao K F, Ma M, Wang Z J, *et al* 2004. The variation of estrogenic effects during water treatment processes in a drinking water works in south China [J]. *Environmental Science*, 25(6): 123—126 (in Chinese)
- Ren Y X, Kazunori N, Munehiro N, *et al* 2007. Effects of bacterial activity on estrogen removal in nitrifying activated sludge [J]. *Water Research*, 41(14): 3089—3096
- Routledge E J, Sumpter J P. 1996. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(3): 241—248
- Samir K K, Xie B, Michael L T, *et al* 2006. Fate, transport and biodegradation of natural estrogens in the environment and engineered systems [J]. *Environmental Science and Technology*, 40(21): 6537—6546
- 吴文忠, 王敬贤, 徐盈, 等. 2002. 重组基因酵母检测环境类雌激素污染物 [J]. *中国环境科学*, 22(1): 60—63
- Wu W Z, Wang J X, Xu Y, *et al* 2004. Recombinant gene yeast for assaying environmental estrogen pollutants [J]. *China Environmental Science*, 22(1): 60—63 (in Chinese)