

二级出水内毒素活性及紫外线消毒对其的影响

黄 璜¹, 胡洪营^{1,2}, 杨 扬¹, 吴乾元¹

(1. 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;

2. 清华大学 深圳研究生院, 广东 深圳 518055)

摘 要: 革兰氏阴性菌的细胞壁成分——内毒素是一种炎症因子,会对污水再生利用造成安全风险。利用鲎试剂终点显色法检测城市污水处理厂二级出水的内毒素活性,并考察紫外线消毒对二级出水与大肠杆菌中内毒素活性的影响。结果表明,在二级出水中可检出内毒素,其活性水平处于 10^3 EU/mL的数量级。游离态内毒素活性占总内毒素活性的52%~92%,说明二级出水中的内毒素主要以游离态形式存在。经紫外线消毒后内毒素活性并未发生显著变化,说明采用剂量 < 150 mJ/cm²的紫外线消毒无法有效去除内毒素。

关键词: 内毒素; 紫外线消毒; 二级出水

中图分类号: X703 文献标识码: A 文章编号: 1000-4602(2011)07-0033-04

Endotoxin Activity of Secondary Effluent and Influence of UV Disinfection on It

HUANG Huang¹, HU Hong-ying^{1,2}, YANG Yang¹, WU Qian-yuan¹

(1. State Key Joint Laboratory of Environment Simulation and Pollution Control, School of Environment, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 2. Graduate School at Shenzhen, Tsinghua University, Shenzhen 518055, China)

Abstract: Endotoxins are components in cell walls of Gram-negative bacteria, and are considered as risk factors for wastewater reuse because of their inflammatory capacity. The chromogenic Limulus amoebocyte lysate (LAL) endpoint assay kits were used to analyze the endotoxin activity of secondary effluent from WWTP, and the influence of UV disinfection on endotoxin activity in secondary effluent and *E. coli* was investigated. The results show that endotoxin activity of about 10^3 EU/mL can be detected in secondary effluent. Free endotoxin activity is 52% to 92% of total endotoxin activity in secondary effluent, indicating that free endotoxins are main forms of endotoxins in secondary effluent. Furthermore, endotoxin activity in secondary effluent and *E. coli* does not change significantly after UV disinfection, suggesting that UV disinfection of below 150 mJ/cm² can not remove endotoxins effectively.

Key words: endotoxin; UV disinfection; secondary effluent

城市污水再生利用是提高水资源综合利用率、缓解水资源短缺的有效途径之一。但污水中存在多种多样的污染物,其中微生物有害组分如内毒素,对

污水的安全再生利用具有潜在风险。内毒素是位于大多数革兰氏阴性菌与蓝藻细胞壁的脂多糖(简称LPS)成分^[1,2]。内毒素具有致炎性与致热性,其暴

基金项目: 国家杰出青年科学基金资助项目(50825801); 国家高技术研究发展计划(863)项目(2008AA062502)

露可引起人体多种病症,包括发热、过敏、腹泻、呕吐、低血压、休克与血管内凝血,甚至死亡^[3]。

目前,国内外学者主要关注饮用水中的内毒素及其去除,对污水与再生水中的内毒素活性研究较少。笔者主要考察了城市污水处理厂二级出水的内毒素活性水平,并研究了常见的污水消毒手段——紫外线消毒对内毒素活性的影响。

1 材料与方法

1.1 器皿与溶液准备

试验中所用的玻璃器皿均在 250 ℃ 下干烤 1 h 以去除内毒素,其他器具如吸头、96 孔板等均为无内毒素的产品。与内毒素活性检测相关的溶液(如磷酸缓冲溶液 PBS)采用高纯水(Milli-Q 超滤出水)配制,经高压灭菌后使用。

1.2 水样采集

水样分别取自两个城市污水处理厂(A 与 B)的二级处理出水。这两个污水处理厂均采用 A²O 工艺。水样用除内毒素的玻璃瓶采集后保存于 4 ℃ 冰箱中,并在 12 h 内检测。

1.3 菌种及其培养

试验所用菌种为大肠杆菌 CGMCC1.3373,购自中国普通微生物菌种保藏管理中心。将冻存的菌种接种于肉汤培养基,在 37 ℃、150 r/min 下振荡培养 16 h,于 10 000 r/min 下离心 10 min 后收集菌体,并弃去上清液,将沉淀清洗后溶于 PBS 溶液(pH 值为 7.4)中得到菌悬液。该菌悬液用于紫外线消毒试验。

1.4 紫外线消毒

测定水样的吸光度 A_{254} ,计算得到选取的紫外线剂量所需的照射时间。取 15 mL 水样于 60 mm 直径的培养皿中,放入转子后将其置于磁力搅拌器上,且处于紫外平行光束仪(内装有 1 根 40 W 低压紫外灯管)的正下方,使水样接受计算时间的紫外线照射^[4]。

1.5 内毒素活性检测

内毒素活性检测采用终点显色法鲎试剂盒。试剂盒中的内毒素标样提取自大肠杆菌 O111:B4。标线范围为 0.1 ~ 1 EU/mL,因此样品需经过适当稀释后测定,使其内毒素活性在标线范围内。一般选择 (1:100) ~ (1:100 000) 范围内的 2 ~ 3 个稀释度进行测定。稀释后的样品与鲎试剂混合,在 37 ℃ 下培养 8 min;再加入显色基质,反应 6 min 后加酸终

止反应。测定样品的吸光度 A_{405} ,并通过标线计算得到其内毒素活性。不同样品间内毒素活性的差异通过 t 检验分析,若 $p < 0.05$ 则存在显著性差异,反之则无显著性差异。

水样中包括游离态内毒素与结合态内毒素。首先检测水样的总内毒素活性。将水样以 12 000g 离心 10 min 后,测定上清液的内毒素活性,则为游离态内毒素活性。总内毒素活性减去游离态内毒素活性即为结合态内毒素活性。

1.6 细菌计数

细菌计数采用混合平板法进行。将 1 mL 一定稀释度的水样和一定量的融化后温度 ≤ 40 ℃ 的营养琼脂培养基混合,迅速摇匀,待培养基凝固后将平板倒置于 37 ℃ 培养箱中培养 24 h,计菌落数。每个样品做 3 个平行样。不同样品间细菌数的差异通过 t 检验分析。

2 结果与讨论

2.1 内毒素的活性及其存在形态

对污水处理厂 A 与 B 的二级处理出水的多次水样(分别为 3 个和 5 个)进行内毒素活性的测定,结果如表 1 所示。

表 1 二级处理出水的内毒素活性水平

Tab.1 Endotoxin activity in secondary effluent

EU · mL⁻¹

项 目	平均值	中位值	最小值	最大值
二级出水	1 377	1 322	600	2 510
A 厂出水	1 137	1 039	600	1 772
B 厂出水	1 522	1 416	815	2 510

两个污水厂二级出水的内毒素活性处于 600 ~ 2 510 EU/mL 的范围内,平均值为 1 377 EU/mL。A、B 厂二级出水内毒素活性的平均值分别为 1 137、1 522 EU/mL。由于这两个污水厂均为城市污水处理厂,且都采用 A²O 工艺,因此二者的内毒素活性水平无显著差异。国外学者检测了部分二级出水的内毒素活性,范围为 $10^2 \sim 10^4$ EU/mL^[5-6]。本研究中二级出水的内毒素活性水平主要在 10^3 EU/mL 的数量级,与前人的检测结果一致。

由于内毒素在细胞生长、分裂或死亡过程中会从细胞释放到环境中^[7-8],因此内毒素在水中的存在形式可分为游离态与结合态(游离态是指释放到水体中的内毒素,结合态是指处于细胞壁中的内毒素),两种形态的内毒素均具有生物活性^[3]。二级

出水中内毒素的形态分布如图 1 所示。游离态内毒素活性占总内毒素活性的 52% ~ 92%, 说明二级出水中的内毒素主要以游离态形式存在。其中, A 污水厂二级出水中的游离态内毒素占总内毒素活性的 78% 以上, 而 B 污水厂二级出水中的游离态内毒素仅占 60% 左右, 虽然两厂出水的总内毒素活性无明显差异, 但是内毒素的形态分布却有所差异。

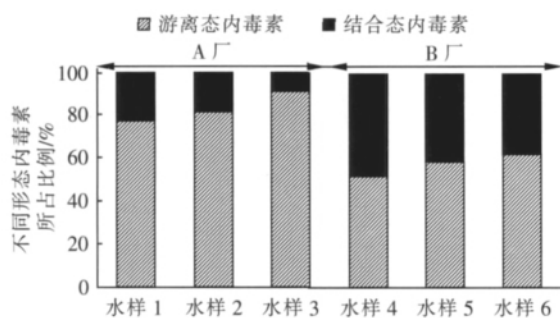


图 1 二级出水中的内毒素形态分布

Fig. 1 Proportions of free and cell-bound endotoxin in secondary effluent

2.2 紫外线消毒对内毒素活性的影响

对 A 厂二级处理出水进行紫外线消毒试验, 紫外线剂量分别为 0、20、50、100 和 150 mJ/cm^2 , 消毒后内毒素活性与细菌总数的变化如图 2 所示(其中, “ $\times$ ”表示不同样品间存在显著性差异, 下同)。

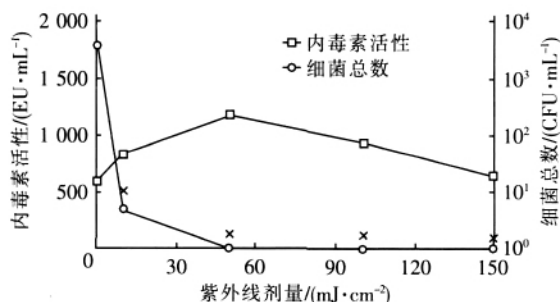


图 2 紫外线消毒对二级出水中内毒素与细菌总数的影响

Fig. 2 Effect of UV disinfection on endotoxin activity and total bacteria count in secondary effluent

二级出水的初始细菌总数为 3 800 CFU/mL , 初始内毒素活性为 600 EU/mL 。经过紫外线消毒后, 细菌总数显著下降 ($p < 0.05$), 当紫外线剂量达到 50 mJ/cm^2 时, 细菌总数已下降至 5 CFU/mL 。然而, 经过不同剂量的紫外线照射后, 水样的内毒素活性与初始值均无显著性差异 ($p > 0.05$)。经紫外线消毒后内毒素活性并未减小, 这说明在 150 mJ/cm^2 的剂量范围内, 紫外线消毒未能有效去除二级出水中的内毒素。

Anderson 等人^[9]研究了中压紫外灯对内毒素标准物质 (LPS 分子) 的去除效果, 在 100 ~ 600 mJ/cm^2 的剂量下, 发现紫外线照射对内毒素有一定的灭活作用, 但灭活速率较低。因此, 只有高强度的紫外线照射才能明显灭活内毒素。并且, Anderson 采用的是中压紫外灯, 其输出波长范围大于目前常用的低压紫外灯。Gehr 等考察了低压紫外灯对饮用水原水中内毒素的灭活效果, 结果发现常见的饮用水紫外线消毒剂量 (40、100 mJ/cm^2) 对内毒素均无明显的灭活作用^[3]。本研究选取低压紫外灯且剂量为 10 ~ 150 mJ/cm^2 , 结果对二级出水中的内毒素活性无明显影响, 这与前人的研究结果相符。

以大肠杆菌为模式菌种, 考察紫外线消毒对结合态内毒素的影响, 结果如图 3 所示。经紫外线消毒后, 大肠杆菌的活菌数从 10^8 CFU/mL 减小至 10^3 CFU/mL , 但内毒素活性并未发生显著变化 ($p > 0.05$)。这可能是由于紫外线消毒主要作用于细胞内的核酸, 而对菌体的细胞壁无明显破坏^[10], 因此对内毒素活性无明显影响。

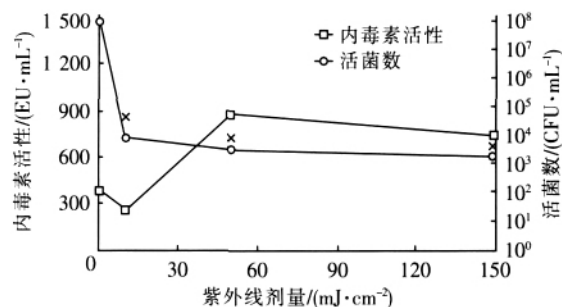


图 3 紫外线消毒对大肠杆菌内毒素活性与细菌数的影响

Fig. 3 Effect of UV disinfection on endotoxin activity and cell counts in *E. coli*

综上所述, 紫外线消毒可有效地灭活微生物, 但却无法去除内毒素。因此, 污水再生处理过程中内毒素的控制需要引起关注。

3 结论

① 二级出水中含有内毒素, 其活性处于 10^3 EU/mL 水平, 且主要以游离态形式存在, 游离态内毒素活性占总内毒素活性的 52% ~ 92%。

② 紫外线消毒 (150 mJ/cm^2 剂量内的低压紫外线) 对二级出水与大肠杆菌的内毒素活性均无显著影响, 紫外线消毒无法有效地去除内毒素。

参考文献:

[1] Williams K L. Endotoxins: Pyrogens, LAL Testing and

- Depyrogenation [M]. New York: Informa Healthcare Inc 2007.
- [2] Gehr R, Uribe P U, Baptista I F D S *et al.* Concentrations of endotoxins in waters around the Island of Montreal and treatment options [J]. *Water Qual Res J Can*, 2008, 43(4): 291–303.
- [3] Morrison D C, Danner R L, Dinarello C A *et al.* Bacterial endotoxins and pathogenesis of gram-negative infections: current status and future direction [J]. *J Endotoxin Res*, 1994, 1(2): 71–83.
- [4] 郭美婷, 胡洪营, 刘文君. 复活光照强度对再生水紫外线消毒后大肠杆菌和粪大肠杆菌光复活的影响 [J]. *环境科学* 2008, 29(9): 2576–2579.
- [5] Guizani M, Dhahbi M, Funamizu N. Assessment of endotoxin activity in wastewater treatment plants [J]. *J Environ Monit* 2009, 11(7): 1421–1427.
- [6] Burger J S, Grabow W O K, Kfir R. Detection of endotoxin in reclaimed and conventionally treated drinking-water [J]. *Water Res*, 1989, 23(6): 733–738.
- [7] Parikh S J, Chorover J. Infrared spectroscopy studies of cation effects on lipopolysaccharides in aqueous solution [J]. *Colloid Surf B: Biointerface* 2007, 55(2): 241–250.
- [8] Mattsby-baltzer I, Lindgren K, Lindholm B *et al.* Endotoxin shedding by enterobacteria: free and cell-bound endotoxin differ in *Limulus* activity [J]. *Infect Immun*, 1991, 59(2): 689–695.
- [9] Anderson W B, Huck P M, Dixon D G *et al.* Endotoxin inactivation in water by using medium-pressure UV lamps [J]. *Appl Environ Microbiol* 2003, 69(5): 3002–3004.
- [10] Cho M, Kim J, Kim J Y *et al.* Mechanisms of *Escherichia coli* inactivation by several disinfectants [J]. *Water Res* 2010, 44(11): 3410–3418.

作者简介: 黄璜(1986–), 女, 福建建阳人, 博士研究生, 主要研究方向为再生水消毒副产物及其生物毒性。

电话: (010) 62797265

E-mail: huangh04@mails.tsinghua.edu.cn

通讯作者: 胡洪营

收稿日期: 2010-11-29

(上接第32页)

B/C 值的增幅最大, 当 HRT > 13.5 h 时 B/C 值的增幅迅速降低。

③ 间歇膨胀复合水解反应器的污泥区处于周期性的“膨胀—收缩”状态, 在膨胀状态下上升流速为 6.5 m/h, 泥水可进行充分混合, 从而提高对溶解性 COD 的去除率; 在收缩状态下, 污泥处于自由沉降状态, 对 SS 的去除率可达 65% 以上。

④ 水解出水经接触氧化/混凝沉淀工艺处理后, COD、pH 值、NH₃-N、TP 分别为 95.3 mg/L、8.27、6.27 mg/L、0.39 mg/L, 完全满足企业提标后的排放要求。

参考文献:

- [1] 龙焰, 劳善根, 刘新文, 等. SBR 法处理生活工业综合污水的可行性研究 [J]. *浙江大学学报: 农业与生命科学版* 2004, 30(5): 500–504.
- [2] 沈东升, 刘新文, 龙焰. 农村小城镇生活和工业综合污水的达标处理工艺技术研究 [J]. *农业工程学报*, 2006, 25(5): 135–139.

- [3] 王远红, 潘立常, 曹文平, 等. 水解酸化与 A²/O² 组合工艺处理有机制药废水 [J]. *中国给水排水* 2010, 26(12): 90–92.
- [4] 徐灏龙, 白俊跃, 章一丹, 等. 生物强化脱色处理印染废水的中试研究 [J]. *中国给水排水* 2010, 26(23): 91–93.
- [5] 黄继国, 黄国鑫, 聂广正, 等. 中温 UBF 与 UASB 两相厌氧系统处理垃圾渗滤液的实验研究 [J]. *吉林大学学报: 地球科学版* 2007, 37(1): 144–147.
- [6] 陆少鸣, 王宁, 张江洪, 等. 预处理/UBF/接触氧化/BAF 处理抗生素制药废水 [J]. *中国给水排水* 2008, 24(22): 63–67.
- [7] 曹占平, 张景丽. UBF 处理垃圾渗滤液的中试研究 [J]. *天津工业大学学报* 2006, 25(2): 44–47.

作者简介: 白俊跃(1981–), 男, 吉林通化人, 硕士, 工程师, 主要研究方向为水污染控制与资源化利用。

E-mail: baijunyue@hotmail.com

收稿日期: 2010-11-10