

北方某水厂原水及处理过程中 Ah 受体效应的行为研究

王乐征¹ 胡建英¹ 金晓辉¹ 何文杰² 韩宏大²

(1 北京大学环境学院,北京 100871; 2 天津市自来水集团有限公司,天津 300040)

摘要 以北方某城市给水厂的自来水为研究对象,采用重组基因酵母测定法对不同处理工艺单元出水的芳香烃受体(AhR)效应进行了检测。检测结果表明,原水具有明显的 AhR 效应,经常规工艺处理后 AhR 效应不能得到很好的去除,而经臭氧—活性炭深度处理后,92%的 AhR 效应能够有效去除。

关键词 重组基因酵母 芳香烃受体 饮用水

Research on behavior of AhR in a waterworks in north China

Wang Lezheng¹, Hu Jianying¹, Jin Xiaohui¹, He Wenjie², Han Hongda²

(1. College of Environmental Sciences, Peking University, Beijing 100871, China;

2. Tianjin Waterworks Group Co., Ltd., Tianjin 300040, China)

Abstract: The behavior of aryl hydrocarbon receptor (AhR) activity in water purification course in a waterworks in north China was investigated by recombinant yeast bioassay. The results showed that the agonists of AhR activity in raw waters were difficult to remove by the conventional treatment. However, 92% of the AhR activity was effectively removed in advanced process consisted of ozonization and activated carbon adsorption treatment unit.

Key words: Recombinant yeast bioassay; AhR; Drinking water

环境中内分泌干扰物质和人类健康及野生生物异常之间具有相当密切的关系^[1]。目前被认为具有内分泌干扰作用的化学物质包括农药类物质、添加剂、二恶英、多氯联苯类物质、重金属类物质、多环芳烃类物质、植物来源激素类、人工合成和天然激素类、有机锡类等。许多内分泌干扰物的作用被认为是受体调节的结果,如雌激素受体、孕激素受体、雄激素受体、甲状腺素受体等在受到化学物质的活化后诱导靶基因表达中起了很大的作用。二恶英类则是通过芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AhR)间接地表现出内分泌干扰活性^[2]。

AhR 介导基因表达是以 2,3,7,8-四氯二苯-对二恶英(2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, 以下

简称 TCDD)为代表的二恶英类化学物质毒性作用的最基本的作用机制。当 TCDD 等配体和 AhR 结合释放热休克蛋白脱离后,与 AhR 核转位子蛋白(AhR nuclear translocator, ARNT)结合,AhR-ARNT 复合物与特异基因上游部位的增强子即二恶英反应元件结合并激活基因的表达。

研究表明,许多化学物质如多环芳烃类、六氯苯,也能够通过与二恶英类物质类似的途径与 AhR 结合,进而显示出和二恶英类物质类似的生物效应^[3]。另外,研究还表明一些天然发生的物质如氨基酸的代谢产物^[4],也具有 AhR 结合活性。同时,在生物体内,低剂量的 AhR 效应物质也可以和雌激素受体结合,从而显示出内分泌干扰作用^[5],因此,AhR 效应可以作为一类内分泌干扰物质的生物标记物进行暴露评价。到目前为止,许多的研究都集中在一些如二恶

国家科技部 973 项目(2007CB407304);国家高技术研究发展计划(863)项目(2002AA60114026)。

英、多环芳烃等疏水性物质的监测,而针对极性馏分的 AhR 效应的研究国内外还未见报道。

重组受体/报告基因表达酵母法由 Miller 创立^[6],该测定方法是将人体细胞内的 AhR 和 ARNT 基因克隆到酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 菌株上,通过配体暴露诱导激活受体基因,同时激活报告基因转录成 β -半乳糖苷酶,通过测定 β -半乳糖苷酶活性来表征化学物质的 AhR 效应的方法。研究小组在 Miller 开发的方法的基础上,通过改进酵母菌培养液及配体暴露环境的方法对试验条件进行了优化^[7],使得配体暴露时间从原来的 18 h 缩短到 8 h,有利于实现快速监测。优化后的方法与其他生物监测方法如细胞增殖法^[8]、EROD 酶诱导法^[9]等相比具有试验周期短、操作简单等优点。

利用上述重组基因酵母测定法,测试了北方某城市给水厂常规处理工艺及深度处理工艺各处理单元出水中的 AhR 效应,对不同处理工艺对水体中 AhR 效应物质的处理效果进行了评价。为了测定包括极性馏分的 AhR 受体效应物质,采用了基于反相固相萃取柱的样品分级处理方法。

1 试验方法

1.1 材料与仪器

-萘黄酮 (β -naphthoflavone, 以下简称 NF, 99%+, Acros organics) 用于阳性对照;二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, 以下简称 DMSO, ACS 级, 美国 AMRESCO);邻硝基酚-D-半乳糖苷 (o-nitrophenol- β -D-galactopyranoside, 以下简称 ONPG, 东京化成);溶菌酶 Zymolyase 20T (生化学工业株式会社, 日本);试验用培养基为去除了色氨酸 (tryptophan) 的 SD 培养基;BIO-RAD 550 酶标仪, Nunc 96 孔两条可拆酶标板;Jouan MR 18 22 冷冻离心机;easypure 超纯水仪;恒温培养箱;minishaker 震荡器。

1.2 样品采集

常规处理工艺:北方某水厂以地表水为水源,原水经过自然沉降后引入水厂,加氯后与絮凝剂 FeCl_3 和助凝剂二甲基二烯丙基氯化铵 (HCA) 混合,絮凝沉淀后,经石英砂和无烟煤双层滤料过滤,再经加氯消毒后输送出厂,经管网到达用户。分别于 2003 年 4 月 21 日、5 月 25 日、7 月 3 日、8 月 28 日、9 月 26 日采样 5 次。按照水厂工艺流程在原

水、混凝井出水、沉淀池出水、清水库、管网设 5 个采样点 (见图 1)。

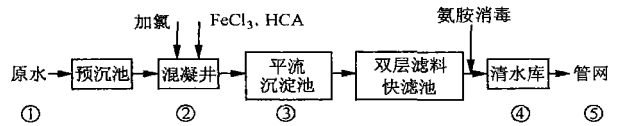


图 1 给水厂常规处理工艺及采样点

深度处理工艺:与常规工艺为同一水厂,水源经过自然沉降后引入水厂,经加入 KMnO_4 预氧化及气浮处理后过滤,再利用臭氧氧化,最后经活性炭过滤,消毒后输送出厂。于 2004 年 6 月 22 日,采集了原水、预氧化出水、气浮出水、过滤出水、臭氧氧化出水、活性炭出水、消毒出水 7 个样品 (见图 2)。为了对比深度处理工艺的处理效果,同时还采集了常规工艺的管网出水。水样用 10 L 棕色玻璃瓶采集,加入约 1 g 的硫代硫酸钠去除水中的余氯,立即带回实验室进行处理。

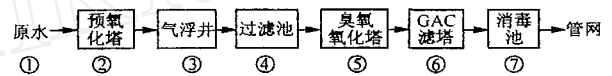


图 2 给水厂深度处理工艺及采样点

1.3 样品预处理

水样经玻璃纤维滤纸过滤后,用 6 mL 二氯甲烷、6 mL 甲醇、6 mL 超纯水活化后的 Waters C18 固相萃取柱上样,上样速度 10~15 mL/min。分别用非极性、中极性和极性三种有机溶液各 6 mL 洗脱,获得三个馏分,经氮气吹干后用 DMSO 定容至 0.1 mL,实际浓缩倍数为 200 000 倍。

1.4 AhR 效应酵母测试方法

用接种针挑取 2~3 环酵母菌株 YCM3 于含有葡萄糖培养液的培养瓶中,在 30 °C 的条件下过夜培养 (对数生长期)。取上述培养液 50 μL 加入有 200 μL 培养液的小管中,再添加 2.5 μL 的样品溶液 (DMSO 溶解液),震荡摇匀,置于摇床 (转速为 200 r/min) 上培养 8 h (30 °C)。移取 150 μL 上述培养液于酶标板 (96 孔) 中,于 595 nm 波长下测定菌液的吸光度值 (以加入 DMSO 的培养液为参照空白)。余下的溶液离心 5 min (转速为 15 000 r/min),弃去上清液后,加入 200 μL 含 1 mg/mL Zymolyase 的 Z buffer 溶液,震荡混匀后,静置反应 20 min (30 °C)。加入含 4 mg/mL ONPG 的缓冲溶液 40 μL 于上述溶

液中,震荡混匀,再于 30 条件下静置反应至产生黄色,记录反应时间,加入 100 μL 的 1 mol/L Na₂CO₃ 溶液使反应停止。以 15 000 r/min 转速离心 5 min, 吸取上清液 150 μL 于 96 孔酶标板中,分别于 415 nm 和 570 nm 波长下测定吸光度值(以加入菌液的培养液为参照空白)。

最后用下式计算 β-半乳糖苷酶诱导活性: Galactosidase Activity(Unit) = 1 000 × (A₄₁₅ - 1.75 A₅₇₀) / (t × v × A₅₉₅), 其中, t 为加入 ONPG 到出现黄色的反应时间; v 为菌液体积(0.05 mL); A₅₉₅、A₄₁₅、A₅₇₀ 为吸光度值。

样品 AhR 效应换算成 TCDD 的等当量毒性(TEQ):即用 TCDD 20% 的值除以 Sample_{TCDD20%} 值, Sample_{TCDD20%} 值是各样品的 β-半乳糖苷酶诱导活性达到 TCDD 的诱导活性最大值 20% 时的浓缩倍数。

2 结果与讨论

利用以上酵母测试方法,本研究分别评价了北方某给水厂的常规和深度处理工艺对不同极性馏分中 AhR 效应物质的去除效果。

2.1 样品分级和 AhR 活性

图 3 表示了 2003 年 4 月 21 日采集的饮用水原水中不同极性馏分的 AhR 剂量效应曲线。试验空白的活性响应平均值在 600 ~ 700 Unit 范围内,样品响应达到空白响应的 3 倍即可认为有明显的 AhR 效应。

从图 3 可知原水的非极性馏分与中极性馏分在浓缩倍数达到 3 200 倍左右时就开始表现出了明显的 AhR 效应,随着浓缩倍数的增加,两馏分的活性响应最高值分别达到了 9 000 Unit 和 17 000 Unit, 中极性馏分高于非极性馏分。而在极性馏分中没有检出 AhR 效应。由此可以推断,水中造成 AhR 效应的物质全部集中在非极性馏分和中极性馏分里面。

2.2 常规处理工艺

图 4 表示了 AhR 效应折算为 TCDD 的等当量毒性(TEQ)随处理单元的变化。各处理工艺的出水 TEQ 值大致处在 50 000 ~ 60 000 pg/L 的水平,在整个常规工艺的处理流程中,造成水中 AhR 效应的物质始终没有得到有效去除。而且最终入户采集

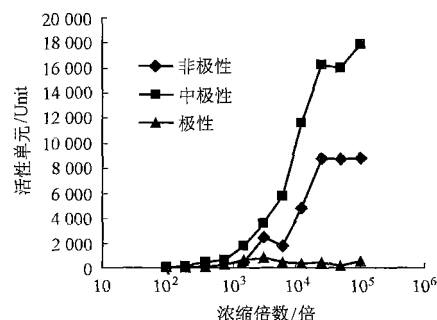


图 3 原水 AhR 剂量效应曲线

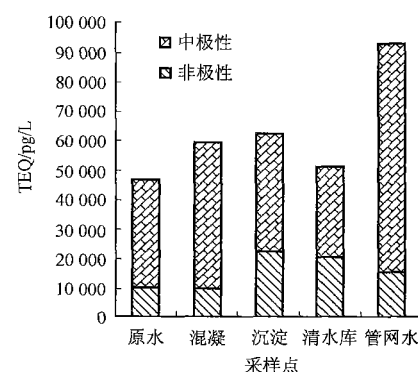


图 4 常规工艺各采样点 TEQ

的管网水中的 AhR 效应高于原水, TEQ 达到了 90 000 pg/L。

图 5 比较了原水及管网水的 TEQ 随采样时间的变化。全部水样都能检测出明显的 AhR 效应,管网水的响应普遍高于原水。而且,7 月原水的 AhR 效应相对较高,管网水的最高 AhR 效应也发生在 7 月。

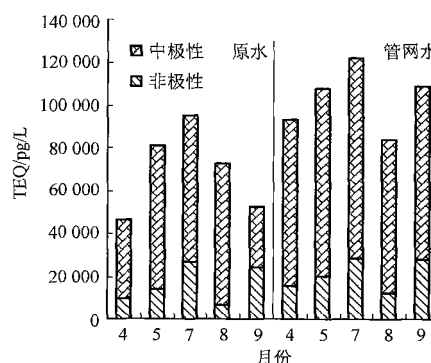


图 5 原水及管网水 TEQ 随时间的变化

2.3 深度处理工艺

从上可知,常规处理工艺难以去除水中残留的痕量 AhR 效应,为此,本研究进一步探讨了深度处理工艺对 AhR 效应物质的去除效果。图 6 表示了

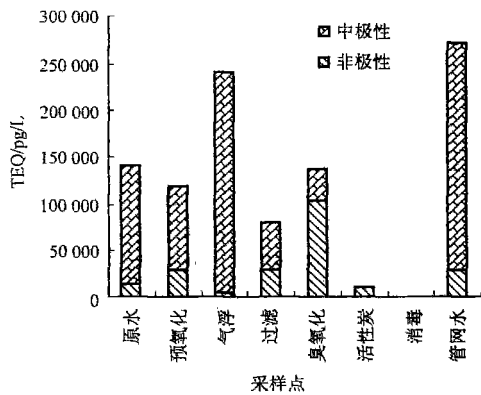


图6 深度处理工艺各单元出水 TEQ

深度处理工艺各单元出水的 TEQ。

原水在经 KMnO_4 预氧化后,中极性馏分的 TEQ 略有下降。经过气浮处理单元后,水样总 TEQ 有较大的提升,这可能是因为一些原本处于被吸附状态的 AhR 效应物质经预氧化—气浮处理释放出来所造成的。过滤单元对水样总 TEQ 有很明显去除效果,但是值得注意的是,经加入臭氧氧化后的总 TEQ 反而提高,甚至与原水达到同一水平。与原水不同的是,此单元出水非极性馏分的响应超过了中极性馏分,说明水样中造成 AhR 效应的物质组成已经有所变化。活性炭过滤之后,水样的总 TEQ 去除率达到了 92%。最后经加氯消毒的深度处理工艺出水已经基本不能检出 AhR 效应,与同期采样的常规工艺管网出水结果相比,水质有了明显的提高。

3 结论

饮用水常规处理工艺对于水源水中的 AhR 效应物质基本没有去除效果,甚至出现管网水中总 TEQ 高于原水的现象。采用深度处理工艺,特别是活性炭处理后,能有效地去除原水中的 AhR 效应。

值得注意的是,虽然本研究中检出很高的 AhR 效应,但其主要贡献来自于中极性馏分,而二恶英类物质及常见的同样具有 AhR 效应的多环芳烃类物质均属于疏水性物质,主要存在于非极性馏分中。虽然造成试验水体的高 AhR 效应的原因物质结构还不清楚,但根据 AhR 试验原理可知,此类物质具有潜在的内分泌干扰风险。要确认它对人类是否存

在健康风险还需要做进一步深入的研究。如对水体中 AhR 效应的原因物质进行解析,在研究原因物质的毒理学特征的基础上,结合暴露解析最终进行健康风险评价。

参考文献

- 1 Tyler C R, Jobling S, Sumpter J P. Endocrine disruption in wildlife: A critical review of the evidence. *Critical Reviews in Toxicology*, 1998, 28(4): 319 ~ 361
- 2 Safe S H. Modulation of gene-expression and endocrine response pathways by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related-compounds. *Pharmacology & Therapeutics*, 1995, 67(2): 247 ~ 281
- 3 Hilscherova K, Machala M, Kannan K, et al. Cell bioassays for detection of aryl hydrocarbon (AhR) and estrogen receptor (ER) mediated activity in environmental samples. *Environmental Science and Pollution Research*, 2000, 7(3): 159 ~ 171
- 4 Adachi J, Mori Y, Matsui S, et al. Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(34): 31475 ~ 31478
- 5 Ohtake F, Takeyama K I, Matsumoto T, et al. Modulation of oestrogen receptor signaling by association with the activated dioxin receptor. *Nature*, 2003, 423(6939): 545 ~ 550
- 6 Miller C A. Expression of the human aryl hydrocarbon receptor complex in yeast—Activation of transcription by iodole compounds. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(52): 32824 ~ 32829
- 7 王伟, 胡建英, 顾炜, 等. 化学物质的 Ah 受体效应的重组基因酵母检测法的优化及应用. *环境科学*, 2004, 25(4): 166 ~ 169
- 8 Van Pelt F N, Hassing I G, Stelling M A, et al. Induction of terminal differentiation in cultured human keratinocytes by polychlorinated aromatic hydrocarbons as measured by cell size Analysis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1992, 113: 240 ~ 245
- 9 Brunstrom B, Engwall M, Hjelm K, et al. EROD induction in cultured chick embryo liver: a sensitive bioassay for dioxin 2 like environmental pollutants. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1999, 14: 837 ~ 842

电话:(010)62765520

E-mail:hujy@urban.pku.edu.cn

收稿日期:2006-11-28

修回日期:2007-01-20