

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20160701001

许燕, 王明泉, 逯南南, 等. 利用重组大肠杆菌 SOS 法评价污水厂出水的遗传毒性以及工艺去除效果[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(6): 252-258

Xu Y, Wang M Q, Lu N N, et al. The use of recombinant *E. coli* SOS test to evaluate the genotoxicity of plant sewage water and the efficiency of contaminant removal [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2017, 12(6): 252-258 (in Chinese)

利用重组大肠杆菌 SOS 法评价污水厂出水的遗传毒性以及工艺去除效果

许燕, 王明泉, 逯南南, 孙韶华, 贾瑞宝*

山东省城市供排水水质监测中心, 济南 250021

收稿日期: 2016-07-01 录用日期: 2017-01-12

摘要: SOS/umu 测试法被广泛应用于化合物和复杂混合物遗传毒性的评价, 由于该技术所用菌种为致病菌且操作步骤繁琐等原因, 制约了技术的推广应用。研究建立了基于重组大肠杆菌 SOS 效应的水质遗传毒性检测方法(专利号: ZL201110022476.1), 应用该方法评价了某市 4 座污水厂出水的直接遗传毒性效应, 同时以污水处理一厂为例考察了直接遗传毒性效应的季节变化规律以及不同的工艺对水中直接遗传毒性物质的去除情况。结果显示: 各污水厂出水均表现出一定的直接遗传毒性, 对应的 4-NQO 毒性当量浓度范围为 0.018~0.514 mg·L⁻¹; 一年四季中夏季进出水直接遗传毒性效应最高, 现有工艺中生化处理工艺段对直接遗传毒性去除效果最佳, 去除率为 33.33%。该方法操作便利、检测敏感性较高、操作危险性较低, 可用于水中直接遗传毒性效应的测试。

关键词: 污水; 重组大肠杆菌; SOS 效应; 遗传毒性效应

文章编号: 1673-5897(2017)6-252-07 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

The Use of Recombinant *E. coli* SOS Test to Evaluate the Genotoxicity of Plant Sewage Water and the Efficiency of Contaminant Removal

Xu Yan, Wang Mingquan, Lu Nannan, Sun Shaohua, Jia Ruibao*

Shandong Province City Water Supply and Drainage Water Quality Monitoring Center, Jinan 250021, China

Received 1 July 2016 accepted 12 January 2017

Abstract: SOS/umu test is widely used in genotoxicity evaluation of bioactive compounds and complex mixtures. Because the strains used for testing are pathogenic and the test is a tedious process, its use in the evaluation of domestic products is limited. In this paper we established a method using recombinant *E. coli* SOS-fluorescence (patent number: ZL201110022476.1) to test the direct genetic toxicity of sewage water and evaluate the direct genotoxicity of treated water from four sewage plants. Moreover, the seasonal variation of direct genotoxicity and the influence of different processes on the removal of contaminants were evaluated in one plant. Positive reactions were found in all treated water, and the corresponding 4-NQO equivalent concentration was from 0.018 to 0.514 mg·L⁻¹. The direct genotoxicity of raw and treated water was the highest in summer. The direct genetic toxicity removal

基金项目: 山东省自然科学基金项目 (ZR2014CP019; ZR2015PB010; BS2014HZ018); 山东省泰山学者建设工程专项 (ts201712084); 泉城“5150”引才倍增计划

作者简介: 许燕(1986-), 女, 工程师, 研究方向为生态毒理学, E-mail: xu_yan_0318@163.com

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: jiaruibao68@126.com

effect reached 33.33% with the current biochemical treatment process. With convenient operation, high detection sensitivity, and low potential operational risk, this method can be used in water direct genotoxicity testing.

Keywords: wastewater; recombinant *E. coli*; SOS effect; genotoxic activity

1997年,国际标准化组织(International Organization for Standardization, ISO)将 SOS/umu 试验确立为该标准体系中唯一用于监测水环境遗传毒性的标准方法,德国等发达国家也已将该试验作为水环境遗传毒性检测的方法^[1]。目前国际上最常用的 SOS/umu 测试系统是在鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium* TA1535)中导入携带 umuC'-LacZ 嵌合体的质粒 pSK1002,构建的细菌 *S. typhimurium* TA1535/pSK1002。这个系统在实际应用时存在以下问题:1)对氯代有机物不敏感,特别是不适用于饮用水中消毒副产物的检测^[2];2)鼠伤寒沙门氏菌为致病菌,易传播,每年全世界有近亿人感染,部分致死,对构建的鼠伤寒沙门氏菌系统的操作存在微生物风险;3)对该系统的应用步骤相对繁琐,对 β -半乳糖苷酶活性的检测需要加入底物,如 β -ONPG(邻硝基苯 β -D-半乳糖苷),价格相对较贵。

本文采用基于重组大肠杆菌 SOS 效应的水质

遗传毒性检测方法^[2],使用重组大肠杆菌代替常用的鼠伤寒沙门氏菌,将大肠杆菌 umuDC 启动基因序列与绿色荧光蛋白基因序列连接,与质粒载体连接后导入大肠杆菌,重组的大肠杆菌遇到致 DNA 损伤物,启动绿色荧光蛋白基因表达进而产生绿色荧光蛋白,通过检测产生的荧光获得污染物信息。应用该技术对某市4座主要污水处理厂出水进行直接遗传毒性效应测定,并以污水一厂为例对遗传毒性的季节变化规律以及不同的工艺对水中直接遗传毒性效应物质的去除情况进行了 SOS 效应-遗传毒性测定。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 仪器与试剂

仪器:荧光光谱仪(HITACHI F-2700);超声波细胞粉碎仪(SCIENTZ-IIID);恒温振荡培养箱(上海志成 ZHWY-200B);台式离心机(Thermo);固相萃取仪

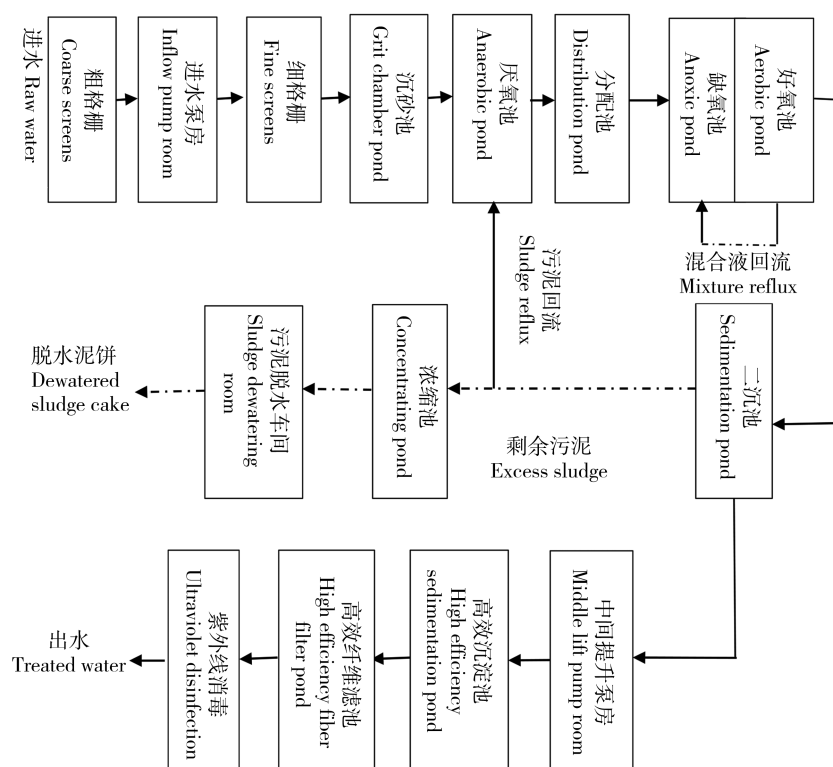


图1 污水处理一厂工艺流程图

Fig. 1 Process flow diagram of the No.1 sewage plant

(Reeko SPE-06C);高压蒸汽灭菌锅(上海博迅)。

试剂:4-硝基喹啉-1-氧化物(4-nitroquinoline-1-oxide,4-NQO,美国 Sigma 公司);二氧化氯、正己烷、甲醇均为色谱纯。

1.2 污水处理工艺流程及工艺参数

目前,4 座污水处理厂均采用改良后的 A/A/O (厌氧-缺氧-好氧法)处理工艺,选择污水处理一厂进行工艺段出水遗传毒性检测。污水处理一厂的主要处理工艺见图 1。

1.3 样品采集和处理

采集 5 L 水样经 0.45 μm 玻璃纤维素膜过滤后再用 HLB 柱(500 mg, OASIS, USA)富集,富集前 HLB 柱使用 5 mL 二氯甲烷、5 mL 甲醇、5 mL 纯水进行活化,然后分别以 5 mL 正己烷/二氯甲烷(1:1, 体积比)和 10 mL 甲醇/二氯甲烷(1:9, 体积比)为淋洗剂洗脱。洗脱液吹干置换溶剂为 DMSO,定容至 0.5 mL,-20 ℃下保存,富集倍数为 1 万倍。

1.4 重组大肠杆菌 SOS 效应-荧光法试验方法

1.4.1 重组大肠杆菌贮藏物复苏活化

将重组大肠杆菌贮藏物接入改良的 LB 培养液,加入氨苄霉素、葡萄糖,30 ℃、180 r·min⁻¹的转速下振荡培养 16~18 h。

1.4.2 大肠杆菌检测液制备

将复苏活化液按照 1/100 的比例接入新鲜的 LB 培养液,在 37 ℃、200 r·min⁻¹的转速下振荡培养 2 h。

1.4.3 与受试样品接触

将受试样品/大肠杆菌检测液按照 1/9 的比例混匀(100 μL 受试样品:900 μL 大肠杆菌检测液),在 37 ℃、200 r·min⁻¹的转速下振荡接触 1.5 h,设置 3 个平行组。设置不加检测样品,仅添加受试样品溶剂的对照组;设置经固相萃取前处理的纯水样品为程序空白组。

1.4.4 检测液后处理

将与受试物接触后的菌液及对照组的菌液通过离心收集菌体,以 PBS 缓冲液洗涤 1 次,利用超声波破碎仪破碎菌体。

1.4.5 荧光检测

将菌体破碎物高速离心,收集上清液,利用荧光光谱仪检测发射荧光强度。采用激发波长 395 nm,检测波长为 507 nm。

1.4.6 数据处理与分析

R 值=各浓度下的受试物荧光强度/相应空白,若与空白比值大于 1.5,则认为该物质具有致突变性(呈阳性)。

对应标准毒性物质 4-NQO 剂量效应标准曲线,得出受试物的 4-NQO 毒性当量(TEQ_{4-NQO} mg·L⁻¹)。

2 结果与分析 (Results and analysis)

2.1 标准曲线及污水处理厂出水直接遗传毒性测定

考虑到 4-硝基喹啉-1-氧化物(4-nitroquinoline-1-oxide, 4-NQO)是一种已由动物暴露试验数据证明了的致癌物,也是一种不需要代谢活化直接引起遗传物质损伤的直接遗传毒性物,在 umu 测试中也已经被广泛用作阳性对照物进行质控^[3],因此在本研究中选择 4-NQO 作为标准毒性物质,对直接遗传毒性进行定量,程序空白组的 R 值为 0.57。

使用 4-硝基喹啉-1-氧化物(4-NQO)为标准毒性物质制作剂量-效应标准曲线,见图 2。对该市 4 座污水处理厂夏季出水重组大肠杆菌 SOS 效应测试(结果见表 1),4 座污水厂出水的 R 值均>1.5,表现出一定的直接遗传毒性效应,对应的 4-NQO 当量浓度 0.018~0.514 mg·L⁻¹。由于各污水处理厂收集的生

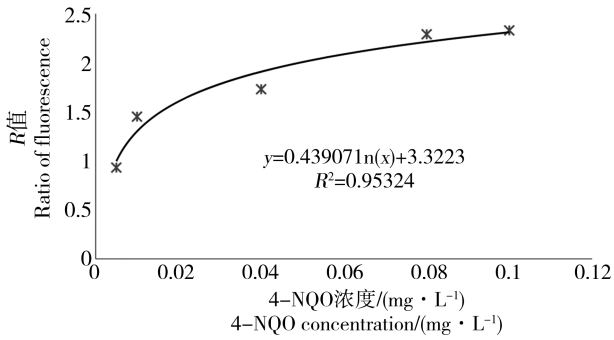


图 2 4-NQO 剂量-效应标准曲线

Fig. 2 Dose-effect curve for 4-NQO

表 1 4 座污水处理厂出水的 R 值和 TEQ_{4-NQO}

Table 1 R -value and TEQ_{4-NQO} of the treated water in four sewage plants

	污水一厂 The No.1 sewage plant	污水二厂 The No.2 sewage plant	污水三厂 The No.3 sewage plant	污水四厂 The No.4 sewage plant
R 值 Ratio of fluorescence	3.03	2.81	1.56	2.21
TEQ _{4-NQO} /(mg·L ⁻¹)	0.514	0.311	0.018	0.079

活废水、工业废水来源复杂多样,经过常规污水处理工艺处理后,直接遗传毒性效应对应 4-NQO 的当量浓度也有所差异。目前,该市 4 座污水处理厂出水水质达到《城镇污水处理厂污染物排放标准》(GB18918—2002)的一级 A 标准,但是经本实验检测仍然有较强的致突变性,这些经过常规工艺处理过的污水直接排入城市河流,进而污染自然水体。

2.2 污水处理一厂不同季节进出水直接遗传毒性测定及去除率

取污水处理一厂不同季节(春、夏、秋、冬)进出水样品进行重组大肠杆菌 SOS 效应测试(结果见表 2),进厂水的直接遗传毒性当量(TEQ_{4-NQO})为 $0.021 \sim 0.617 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,出厂水的直接遗传毒性当量(TEQ_{4-NQO})为 $0.016 \sim 0.514 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;夏季进厂水直接遗传毒性当量明显高于其他 3 季,可能原因是该市夏季降水量较大,地表径流中面源污染物随着降水进入城市排水管道。夏季该污水厂直接遗传毒性物质去除率最低为 16.69%,在春季最高达到

53.97%。由此可见,目前的污水厂处理工艺对直接遗传毒性物质有一定的去除效果,但去除能力变化较大。

2.3 污水处理一厂工艺段出水直接遗传毒性去除特征

取污水处理一厂主要工艺段出水样品进行重组大肠杆菌 SOS 效应测试(结果见图 3),污水处理一厂进厂水为阳性,改良 A/A/O 工艺出水是阴性,二沉池出水及出厂水为阳性,直接遗传毒性比进厂水降低,出厂水较进厂水直接遗传毒性去除率为 23.8%。其中,改良 A/A/O 工艺段对直接遗传毒性去除效果最佳(达到 33.33%),整体工艺对直接遗传毒性物质有一定的去除效果。目前,国内外已有许多报道应用 SOS/umu 方法评价饮用水各个工艺段出水的遗传毒性^[4-6],对于污水厂处理后的出水遗传毒性效应的监测还未引起足够的重视,遗传毒性物质的去除也应纳入污水厂工艺改进的考虑因素之一。

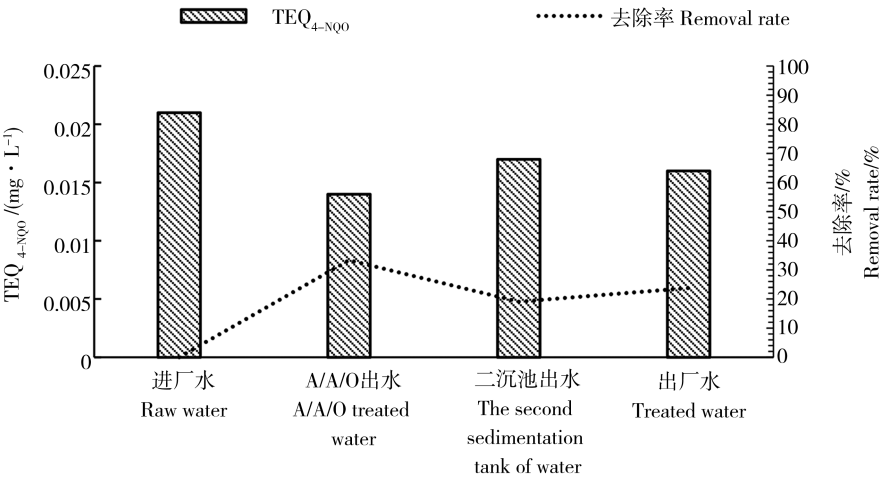


图 3 污水处理一厂工艺出水 TEQ_{4-NQO} 及去除率

Fig. 3 TEQ_{4-NQO} and removal rate of direct genetic toxicity of water from the No.1 sewage plant

表 2 污水处理一厂进出水 TEQ_{4-NQO} 及去除率

Table 2 TEQ_{4-NQO} and removal rate of direct genetic toxicity of raw, treated waters from the No.1 sewage plant

	春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn	冬季 Winter
进厂水 Raw water				
$TEQ_{4-NQO}/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	0.365	0.617	0.021	0.469
出厂水 Treated water				
$TEQ_{4-NQO}/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	0.168	0.514	0.016	0.272
去除率/% Removal rate/%	53.97	16.69	23.81	42.00

3 讨论 (Discussion)

3.1 传统 SOS/umu 测试方法和重组大肠杆菌 SOS 效应-荧光法应用于水质遗传毒性评价的相关研究

目前,国内外学者大多采用 Oda 等^[7]于 1985 年建立起来的 SOS/umu 测试方法,或者根据该方法改进优化的 SOS/umu 测试方法。该方法被广泛应用于化合物和复杂样品检测的遗传毒性检测,国内学者将其应用于饮用水处理遗传毒性评价也较多,见表 3。

本研究应用重组大肠杆菌 SOS 效应-荧光法测试了某市 4 座污水处理厂排水的直接遗传毒性,由于 4 座污水处理厂均采用改良后的 A/A/O(厌氧-缺氧-好氧法)处理工艺,直接遗传毒性效应对应的 4-NQO 浓度有所差异,这可能与 4 座处理厂的污水来源以及处理规模有关。传统 SOS/umu 测试方法在污水或污泥样本遗传毒性测试的应用则相对较少,

倪潇潇等^[12]对造纸厂污水进行遗传毒性评价,得出目前该厂现行活性污泥废水处理工艺,对遗传毒性物质(包括直接的和间接的)的去除作用不明显,本研究测定的城市典型污水处理厂现行工艺对遗传毒性物质去除率为 16.69%~53.97%,总体去除效果也不甚理想。倪潇潇^[13]等某城市 4 个典型污水处理工艺进行遗传毒性评价,4 个典型的城市污水处理工艺总体上对遗传毒性物质都有一定的去除效果;其中 A²/O 处理工艺的去除效果最明显;空气曝气活性污泥工艺对直接遗传毒性物质的去除效果较好,与本研究污水厂改进的 A/A/O 工艺对直接遗传毒性物质去除效果较明显一致。李莉^[14]等应用该方法评价了北京市污水处理厂的生污泥样品以及经过不同处理工艺处理后的污泥样品的遗传毒性效应,结果表明污水处理厂的污泥样品的遗传毒性都在控制范围内,在本文尚未涉及到污泥样品遗传毒性效应的评价,这也将是以后研究的方向。

表 3 SOS/umu 测试法应用于饮用水处理的相关研究

Table 3 Some research about the application of SOS/umu testing in water treatment

研究对象 Subjects	研究结论 Conclusion	参考文献 References
自来水厂常规工艺出厂水及深度处理中试工艺出水 Conventional treatment effluents and advanced treatment effluents	提出 4-硝基喹啉-1-氧化物(4-NQO)的等当量浓度 $0.0948 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($\text{TEQ}_{4\text{-NQO}}$)作为饮用水遗传毒性基准值 Adopting $0.0948 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ toxicity equivalent quantity of 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO) as a safe benchmark of genotoxicity for drinking water	[3]
自来水厂的不同试验工艺在不同的季节各工艺段出水 The drinking water of various processes for a large waterworks	地表水冬季间接遗传毒性效应高于春季;活性炭吸附对去除遗传毒性物质效果显著;各工艺出水的遗传毒性效应差别很大 Direct genotoxicity effect in winter is higher than that in spring; activated carbon are effective on removing genotoxicity substance; the effluents in winter and in spring also differ greatly	[4]
水源水、水厂工艺出水以及水龙头出水 Water samples from reservoirs, waterworks and lavatory taps	地下水水质明显好于地表水水质 Underground water quality was better than surface water	[8]
太湖梅梁湾表层水和沉积物 The surface waters and sediments of Meiliang Bay, Taihu Lake	多环芳烃可能是导致梅梁湾沉积物遗传毒性的主要风险因子之一 PAHs could be one of the major mutagenic stressors in the sediments of Meiliang Bay	[9]
北方某市 2 个水厂原水、出厂水和管网水 Raw, treated and pipe waters of two waterworks in a northern city of China	2 个水厂的原水、出厂水和管网水均表现出一定的直接遗传毒性 Positive results were induced by all the raw, treated and pipe waters of two waterworks	[10]
饮用水厂加氯或氯胺消毒前后臭氧-生物活性炭出水 Effluent of ozone-biological activated carbon ($\text{O}_3\text{-BAC}$) during chlorine or chloramine disinfection	炭后水具有一定的遗传毒性($20 \sim 70 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$),加氯或氯胺消毒后遗传毒性增加 The genotoxicity of effluent of $\text{O}_3\text{-BAC}$ before disinfection ranged from $20 \sim 70 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, and it increased after disinfection by chlorine or chloramines	[11]

3.2 重组大肠杆菌 SOS 效应-荧光法与传统 SOS/umu 测试体系比较

本研究中实验样品经固相萃取前处理后,应用重组大肠杆菌 SOS 效应-荧光法测定水质直接遗传毒性,每组测试设置了3个平行组,荧光强度标准偏差在7%~26%,精密度良好;测定4-NQO的检测限为 $15.76 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,对比 Oda 等^[15]使用传统的 SOS/umu 测试体系测定4-NQO检测限为 $28.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,检测限更低;菌液培养时间比传统测试体系缩短了1 h,操作步骤更简便且易于操作。

综上所述,本研究使用固相萃取前处理和重组大肠杆菌 SOS 效应-荧光法测定水质直接遗传毒性,操作便利、检测敏感性较高、操作危险性较低,且使用4-硝基喹啉氧化物作为标准毒性当量物质,可以进行定量评价,行业推广前景可期。

通讯作者简介:贾瑞宝(1968-),男,博士,研究员,主要研究方向为供排水监测及饮用水安全保障技术。

参考文献 (References):

- [1] International Organization for Standardization (ISO). Water quality-determination of genotoxicity of water and wastewater using the umu-test. ISO/CD 13829, DIN [S]. Berlin: ISO, 1998
- [2] 济南市供排水监测中心. 基于重组大肠杆菌 SOS 效应的水质遗传毒性检测方法: 中国, ZL201110022476.1 [P]. 2011-09-07
- [3] 朱舟, 顾炜旻, 安伟, 等. 基于 umu 遗传毒性效应的饮用水致癌风险评价的尝试[J]. 生态毒理学报, 2008, 3(4): 363-369
Zhu Z, Gu W M, An W, et al. Carcinogen risk assessment of drinking water based on genotoxic activities using SOS/umu test [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2008, 3(4): 363-369 (in Chinese)
- [4] 李娜, 骆坚平, 饶凯锋, 等. 用 SOS/umu 生物测试评价北方某自来水厂对遗传毒性物质的去除效果[J]. 环境工程学报, 2007, 1(11): 10-16
Li N, Luo J P, Rao K F, et al. Assessment of the effects of removal genotoxicity for a waterworks located in the north of China by using SOS/umu test [J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2007, 1(11): 10-16 (in Chinese)
- [5] 骆坚平, 李娜, 马梅, 等. 用成组生物效应标记方法定量评价饮用水健康风险[J]. 环境科学学报, 2007, 27(11): 1778-1782
Luo J P, Li N, Ma M, et al. Quantitatively assessing the health risks of drinking water based on a battery of *in vitro* bioassays [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2007, 27(11): 1778-1782 (in Chinese)
- [6] Žegara B, Heath E, Čemoša A, et al. Combination of *in vitro* bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples [J]. Chemosphere, 2009, 75 (11): 1453-1460
- [7] Oda Y, Nakamura S, Oki I, et al. Evaluation of the new system (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens [J]. Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, 1985, 147(5): 219-229
- [8] 骆坚平, 马梅, 王子健, 等. 用成组生物毒性测试方法评价北方某市饮用水安全性[J]. 给水排水, 2006, 32(8): 17-21
Luo J P, Ma M, Wang Z J, et al. Assessment on the ecological risks of drink water in a city in North China by way of bioassay battery [J]. Water & Wastewater Engineering, 2006, 32(8): 17-21 (in Chinese)
- [9] 乔敏, 王春霞, 黄圣彪, 等. 太湖梅梁湾水体和沉积物中有机污染物的遗传毒性[J]. 中国环境科学, 2006, 26(2): 224-227
Qiao M, Wang C X, Huang S B, et al. Genotoxicity of organic pollutant water and sediment in Meiliang Bay, Taihu Lake [J]. China Environmental Science, 2006, 26(2): 224-227 (in Chinese)
- [10] 言野, 李娜, 刘楠楠, 等. 利用改进的 SOS/umu 方法检测水处理过程中污染物的遗传毒性效应[J]. 生态毒理学报, 2013, 8(6): 909-916
Yan Y, Li N, Liu N N, et al. Application of modified SOS/umu test to determine genotoxicity of genotoxic chemicals and effluents from drinking water treatment process [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2013, 8(6): 909-916 (in Chinese)
- [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[J]. 环境科学, 2010, 31(1): 93-98
Liu Q, Zhang L P, Liu W J, et al. Genotoxicity of drinking water during chlorine and chloramine disinfection and the influence of disinfection conditions using the umu-test [J]. Environmental Science, 2010, 31(1): 93-98 (in Chinese)
- [12] 倪潇潇, 王子健. 造纸厂废水的生物毒性测试[J]. 中国造纸, 2006, 25(12): 27-29
Ni X X, Wang Z J. Biototoxicity test of wastewater from paper mill [J]. China Pulp & Paper, 2006, 25(12): 27-29 (in Chinese)
- [13] 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[J]. 环境污染与防治, 2008, 30(4): 52-55
- Ni X X, Zhou J, Pu J W. Assessing four wastewater treatment plants in a city by bioassay [J]. Environmental Pollution and Control, 2008, 30(4): 52-55 (in Chinese)
- [14] 李莉, 周建国, 李娜. 利用 SOS/umu 测试评价污泥样品的遗传毒性效应以及污泥处理工艺效果[J]. 河南师范大学学报: 自然科学版, 2013, 41(2): 112-114, 118 (in Chinese)
- Li L, Zhou J G, Li N. Evaluating the genotoxicity effect of sludge samples and the effect of sludge treatment process by SOS/umu test [J]. Journal of Henan Normal University: Natural Science, 2013, 41(2): 112-114, 118 (in Chinese)
- [15] Oda Y, Funasaka K, Kitano M, et al. Use of a high-throughput umu-microplate test system for rapid detection of genotoxicity produced by mutagenic carcinogens and airborne particulate matter [J]. Environmental and Molecular Mutagenesis, 2004, 43(1): 10-19 ◆