

PFU微型生物群落采样法研究有机氯污染物在水中相间分布

王新华¹ 陆晓华¹ 沈韫芬^{1,2}

(1. 华中科技大学环境科学研究所 武汉 430074; 2. 中国科学院水生生物研究所 武汉 430072)

摘要:运用PFU微型生物群落采样法在武汉东湖取样研究了六六六、滴滴涕、六氯苯等有机氯污染物在水中相间分布。将PFU(Polyurethane foam unit)取样得到的挤出液,经细胞固定、超声、消解及分步萃取等不同的预处理步骤后,用GG-ECD测定了各部分提取物中 α -HCH、 β -HCH、 γ -HCH、 δ -HCH、HCB、pp'-DDE等有机氯污染物的浓度。并用四膜虫模拟试验检验了细胞固定化、消解过程对微型生物的作用效果。结果分析表明,以上有机物主要以微型生物富集或颗粒物强吸附形式存在于水中,颗粒物弱吸附形式的份量较少,而以溶解态形式存在的份量则更少。由于PFU取样法可以将捕集的颗粒物控制在一定的粒径以下,且具有采样方法简便、经济和对有机污染物富集系数高的优点,因此可以作为研究水体有机污染物的简便、灵敏的采样方法。

关键词:PFU微型生物群落采样法;有机氯污染物;生物富集;吸附

中图分类号:X83 文献标识码:A 文章编号:1000-3207(2005)01-0065-05

2001年斯德哥尔摩国际公约提出的12种优先控制持久性有机污染物(Persistent organic pollutants,简称POPs)中,六六六、滴滴涕、六氯苯等曾是国内大量生产和应用的有机污染物,因此这些有机污染物在环境中的分布以及对生态环境产生的影响是我国在POPs的环境安全与控制研究中的重要内容。我国天然水体中POPs的分析目前一般采用液-液萃取、固相萃取、固相微萃取等方法进行预处理,然后用GC(Gas chromatograph)或GC/MS(Mass Spectrometer)法进行测定^[1,2]。由于水体中大部分POPs具有疏水亲脂、易于在生物体内富集的特点,因此天然水体中有机氯污染物一般以生物积累的形式存在于水生物相中。近些年有关水体中POPs在水中相间分布^[3-6]、生物富集的热力学模型^[7]和动态模型^[8-14]的研究有不少报道,但是未见有用微型生物群落采样法研究POPs在水中相间分布的研究工作报道。

环境生物监测中,聚氨酯泡沫塑料块(Polyurethane Foam Unit,简称PFU)被用于收集水体中微型生物群落,该法已于1991年被颁布为国家标准(GB/T 12990-91)。本文利用PFU吸附性强、能够

群集水体中一定粒径以下的颗粒(包括细菌、真菌、原生动物、藻类、轮虫等有生命的微型生物和无生命的碎屑)的特点,将PFU微型生物群落采样得到的挤出液,采用细胞固定、超声、消解及分步萃取等不同的预处理步骤后,用GG-ECD(Electron capture detector)测定了各部分提取物中 α -HCH、 β -HCH、 γ -HCH、 δ -HCH、HCB、pp'-DDE等有机氯污染物的浓度,并对这些有机氯污染物在水中相间分布进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 实验所用试剂为分析纯,蒸馏水为二次蒸馏水,标样HCB的生产厂家为BDH Chemicals Ltd.,四种HCH的生产厂家为Labor Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Germany. pp'-DDE由湖北省农科院提供。采样及样品前处理所用玻璃仪器使用前经自来水、1%丙酮超声波、洗液、自来水、蒸馏水顺序清洗。取样烧杯使用前还需用现场水荡洗。实验所用PFU为武汉市徐东路海绵厂生产的32号海绵切割而成。

HP6890气相色谱仪及HP3398A化学工作站。

收稿日期:2004-03-15; 修订日期:2004-09-03

基金项目:教育部科学技术研究重点项目资助(104250);中国科学院创新工程重要方向项目资助(KSCX2-SW-102)

作者简介:王新华(1969—),男,湖北省咸宁市人,硕士,研究方向为生态毒理学;徐盈研究员提供标样及处理方法,原生动物生态与分类实验室,陈晓娟帮助进行四膜虫模拟试验,谨此致谢!

通讯作者:沈韫芬, E-mail: shen@public.wh.hb.cn

色谱工作条件: $30\text{m} \times 0.32\text{mm}$, 内膜厚 0.25mm HP-1 毛细管柱, 载气: 纯度 $> 99.999\%$ 的高纯氮, 流量: $1.5\text{mL}/\text{min}$; 柱温: 起始温度 100°C , 保持 2min , 以 $15^\circ\text{C}/\text{min}$ 升温至 160°C , 以 $5^\circ\text{C}/\text{min}$ 升温至 170°C , 然后以 $2^\circ\text{C}/\text{min}$ 升温至 215°C , 再以 $5^\circ\text{C}/\text{min}$ 升温至 220°C , 保持 2min 。尾吹气: $30\text{mL}/\text{min}$, 进样口温度 250°C , 进样体积: $1\mu\text{L}$, 检测器: 电子捕获检测器, 温度: 270°C 。

1.2 采样方法及采样点布置 按 PFU 法 (GB/T 12990-91) 取样编号后用烧杯盛回。采样点为武汉东湖湖泊生态站 1 号取样点, 位于超富营养型水域^[12]。

1.3 PFU 样品预处理和 POPs 分步测定 样品回实验室后, 立即收取 PFU 挤出液, 并按照图 1 流程进行样品预处理, 然后进行 GC 测定。

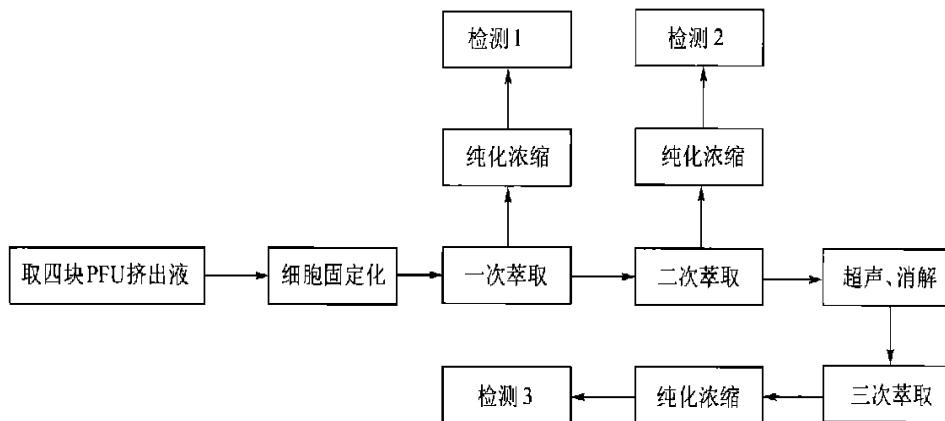


图 1 PFU 样品预处理和分步萃取流程图

Fig. 1 Flowchart of PFU sample pretreatment and extraction

样品回实验室后立即将 PFU 挤干, 挤出液中加入磷酸缓冲液与戊二醛水溶液, 摆匀, 静置 1h 以上进行细胞固定。取 500mL 挤出液于具塞长颈烧瓶中, 加入 50mL 正己烷萃取, 萃取液用 8mL 浓硫酸纯化, 上层有机相在旋转蒸发仪上浓缩至 5mL , 用高纯氮气吹脱至 2mL , 取 $1\mu\text{L}$ 进样, GG-ECD 测定有机物含量, 得到溶解性与颗粒物弱吸附的有机氯污染物 (图 1 中检测 1)。

为了验证第一次萃取后溶解性与颗粒物弱吸附的有机物提取的完全程度, 将一次萃取后的水样再加入 30mL 正己烷萃取, 有机相经同样步骤纯化浓缩, 测定有机物含量, 得到第一次萃取后残留的溶解性与颗粒物弱吸附的有机氯污染物 (图 1 中检测 2)。

分步萃取法第一次萃取的是溶解性和颗粒物弱吸附部分 (检测 1), 第一次萃取后水相中可能还会有部分有机物残留, 第二次萃取 (检测 2) 的目的是对第一次萃取的完全程度进行监测, 以增加后续检测 3 的可信度, 确认检测 3 反映的是后续消解过程中释放出来的颗粒物强吸附和微型生物富集部分的有机氯污染物。

将经过两次萃取后的水样 500mL , 加入高氯酸、冰乙酸各 60mL 消解^[13], 超声波处理 10min , 在 $95-98^\circ\text{C}$ 条件下水浴加热 2h 进行水样的消解处理, 消解后的水样加入正己烷 40mL 萃取, 有机相经同样步骤纯化浓缩, 测定有机氯污染物含量, 得到微型生物细胞内富集和颗粒物强吸附的有机氯污染物含量 (图 1 中检测 3)。

1.4 水样中有机氯污染物总量的测定^[13] 取东湖水样摇匀后量取 1000mL , 加入高氯酸、冰乙酸各 50mL , 超声波处理 10min , 在 $95-98^\circ\text{C}$ 条件下水浴加热 2h , 用 90mL 正己烷分 3 次萃取, 合并有机相, 纯化浓缩后用 GG-ECD 检测, 得到水样中有机氯污染物的浓度。

1.5 有机氯污染物实验回收率与 PFU 中有机氯污染物的空白值 移取 5mL HCH、HCB、DDE 混标, 浓缩至约 0.5mL , 加 4mL 丙酮, 分散于 500mL 蒸馏水中。按上述实验方法操作, 检测几种有机氯污染物的浓度。计算实验回收率。将 PFU 用二次蒸馏水浸泡 24h , 挤干, 再用二次蒸馏水浸泡 15d , 按上述实验方法检测挤出液中有机氯污染物的浓度, 此为方法空白值。

1.6 细胞固定化、消解过程对微型生物的作用效果

取 10mL 四膜虫培养液, 接种 0.1mL 四膜虫, 在恒温培养箱中培养过夜。用原生动物计数框进行活体镜检计数, 每次摇匀后取样 0.1mL × 2 份, 两人平行计数。移取 1mL 戊二醛(25%)、1mL 2mol/L 磷酸缓冲液(先摇匀), 混匀, 加入四膜虫试验液, 摆匀后静置 1h。取 0.1mL × 2 份, 两人平行计数。加正己烷 1mL, 摆荡 15min(模拟图 1 中第一、二次萃取), 静置, 慢慢吸去正己烷层, 摆匀后取样 0.1mL × 2 份, 两

人平行计数。加冰乙酸 2mL、高氯酸 2mL, 摆匀, 95—98℃水浴加热 2h, 冷却, 摆匀后取样镜检观察消解效果。试验四膜虫为 *Tetrahymena thermophila* BF₅。

2 结果

表 1 所示为 PFU 挤出液分步萃取后经 GG-ECD 测定的 α -HCH、 β -HCH、 γ -HCH、 δ -HCH、HCB、 pp' -DDE 的浓度。

表 1 东湖 PFU 样 α -HCH、 β -HCH、 γ -HCH、 δ -HCH、HCB、 pp' -DDE 浓度(ng/mL)

Tab. 1 Concentration of α -HCH、 β -HCH、 γ -HCH、 δ -HCH、HCB、 pp' -DDE in PFU sample from Donghu Lake

样品 Sample	检测号 Number of detection	存在形式 Phase of OCs	浓度 Concentration					
			HCB	α -HCH	β -HCH	γ -HCH	δ -HCH	pp' -DDE
东湖 PFU 样	1	溶解和弱吸附之主要部分	0.31	6.79	0.13	0.31	13.74	0.09
	2	溶解和弱吸附之残留部分	0.007	0.006	0.002	0.003	0.001	0.031
	3	颗粒物强吸附部分和微型生物细胞内富集部分	1.82	31.27	1.41	1.19	53.34	0.094
PFU 空白	1+ 2+ 3	PFU 样总浓度	2.13	38.07	1.54	1.50	67.08	0.21
		PFU 空白值	0.205	0.012	0.030	0.106	0.017	0.047
水样		水体中浓度	0.074	0.008	0.027	0.024	0.566	0.034

3 讨论

3.1 有机氯污染物的存在形式

从表 1 和图 2 的测定结果可见, 直接采样得到的水样中有机氯污染物浓度远小于 PFU 采样挤出液中的有机氯污染物浓度(检测 1+ 检测 2+ 检测 3), 这说明 PFU 采样具有对有机氯污染物明显的富集作用, 富集系数在几十到上千倍不等。挤出液样品中有机氯污染物远高于自然水样, 可能存在两个原因: 一方面, DDE、HCH 等有机氯污染物属于脂溶性物质^[14], 在水中溶解度极低, 在水体微型生物体内

具有高的富集因子, PFU 微型生物群落采样得到的挤出液中有大量的细菌、真菌、原生动物、藻类、轮虫等水生微型生物。PFU 在群集微型生物群落的同时, 也富集了有机氯污染物。另一方面, PFU 采样除了群集水体中微型生物外也捕集了水体中无生命的碎屑颗粒物, 包括有机和无机的颗粒物, 这些有机和无机的碎屑颗粒物对有机氯污染物的吸附作用也造成有机氯污染物在 PFU 挤出液中的富集。因此 PFU 采样的检测结果不但反映了水体中有机氯污染物的化学浓度, 也反映了水体中有机氯污染物在生物体内的蓄积程度。

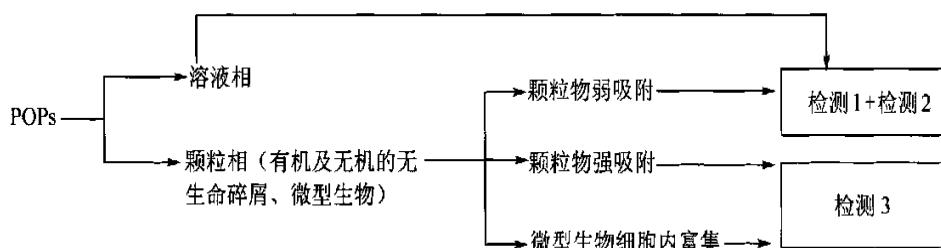


图 2 POPs 的存在形式与检测的对应关系

Fig. 2 The corresponding relationship between detective result and speciation of POPs

从表 1 的数据还可以看出 α -HCH、 β -HCH、

γ -HCH、 δ -HCH、HCB、 pp' -DDE 等有机氯污染物主要

以微型生物富集或颗粒物强吸附形式存在于水中, 颗粒物弱吸附和溶解态形式存在的份量很少。

检测 1/ 水样的比值各物质相差较大, 可能由于 PFU 挤出液成分复杂: 收集的微型生物类群复杂, 种间性质各异, 加上无机碎屑的不同影响。揭示具体原因还需要大量的专门研究。

实验回收率 HCH、HCB 为 72%—96%, DDE 为 90% 以上。PFU 空白值经检测多次, 表 1 中所列为偏大的结果, 也有低至除 HCB 外都检测不出的 ($< 0.01\text{ng}/\text{mL}$)。建议在取样前检测 PFU 空白值, 使用空白值更低的 PFU。

3.2 细胞固定化技术用于微型生物富集有机氯污染物的研究

用四膜虫模拟试验细胞固定化、消解过程对微型生物的作用效果, 镜检结果固定前、后个体数为 11300—11500 个/ mL , 正己烷萃取后为 10074 个/ mL 。固定后未见四膜虫残缺个体。消解后未见完整或残缺个体。细胞固定化过程中四膜虫能保持原来形状。正己烷萃取过程中绝大部分四膜虫能保持原来形状, 有少数破裂。四膜虫消解完全。



图 3 四膜虫细胞固定化效果对比图

Fig. 3 Pictures of *Thaumaphila* before and after cell fixing

1. 细胞固定化前活体; 2. 细胞固定化后活体

细胞固定化技术可以以最快的速度将细胞杀死, 并保持其原来的形状、构造不变, 增强细胞结构对各种渗透压的抵抗能力, 在后续的实验操作中不管是遇到高渗透压或低渗透压都不会发生变化。经过细胞固定化处理后, 可以使检测 1 和 2 得到的结果仅代表水溶解与颗粒物弱吸附部分。

细胞固定化技术使微型生物富集态的有机污染物在萃取过程中暂时不释放出来, 实现了溶解性颗粒物弱吸附性和微型生物富集性的有机氯污染物分别测定。

3.3 PFU 采样和水体颗粒物

水样中的颗粒物, 包括原生动物、藻类、真菌、细菌、轮虫等有生命的微型生物和无生命的碎屑, 是水中各种污染物迁移转化的重要介质, 因此水体中颗

粒物的研究受到高度重视。汤鸿霄等^[15]认为在不同粒级的水体颗粒物中以小于 $63\mu\text{m}$ 粒级作为水体颗粒物研究介质具有科学性和合理性。用 PFU 取样, 不仅能捕集到丰富的水体颗粒物, 而且能够把捕集对象控制在一定粒度以下。PFU 孔径小(约 100— $150\mu\text{m}$ ^[16]), 可以限制大粒径颗粒进入, 因此是原生动物、藻类等微型生物群集的理想场所, PFU 可以作为研究 POPs 在水体颗粒物中积累的经济、简便的采样方法。

3.4 结论

测定疏水性有机污染物在水中相间分布时, 可以利用先将细胞固定再行消解的分步萃取法来克服前处理过程中部分微型生物细胞破裂带来的分离困难, 从而将微型生物富集态与溶解态分开检测。在水体疏水性有机污染物各相态中, 微型生物细胞内富集和颗粒物强吸附态为主要存在形式, 颗粒物弱吸附态占较少部分, 水溶解态极少。运用微型生物群落法采样, 能够把捕集对象控制在一定粒度以下, 且具有经济、简便的特点, 可以作为研究 POPs 在水体颗粒物中积累的经济、简便的采样方法。

参考文献:

- [1] Liu J A, Wang Y Z, Tang H X, Adsorption of organic pollutants on particles of land/ Inland ecotones in Bai Yang Dian Area [J]. *Environmental Science*, 1996, 17 (3): 19—22 [刘季昂, 王怡中, 汤鸿霄. 有机污染物在白洋淀地区水陆交错带土壤颗粒物上的吸附, 环境科学, 1996, 17 (3): 19—22]
- [2] Zhang Z L, Hong H S, Cheng W Q, et al. Contents of organochlorine pesticides in water, pore water and sediment in MinJiang river estuary of China [J]. *Environmental Science*, 2003, 24 (1): 117—120 [张祖麟, 洪华生, 陈伟琪, 等. 闽江口水、间隙水和沉积物中有机氯农药的含量, 环境科学, 2003, 24 (1): 117—120]
- [3] Lei Z F, Ye C M. Adsorption duracler of aniline on suspended particles in water [J], *Environmental Science*, 1998, 6: 70—72 [雷志芳, 叶常明. 苯胺在水体悬浮颗粒物上吸附特征, 环境科学, 1998, 6: 70—72]
- [4] Wu Z J, Li J, Ding H B, et al. Effects of plankton on the enrichment of some chemical substances in the sea surface microlayer [J], *Transactions of Oceanology and Limnology*, 1997, 1: 43—47 [吴志坚, 李军, 丁海兵, 等. 浮游生物对某些化学物质在海洋微表层中富集所起的作用, 海洋湖沼通报, 1997, 1: 43—47]
- [5] Xu Y, Wu W Z, Zhang Y H, et al. Dynamics and long-term fate of residual hexachlorobrohexane (HCH) in various types of environment in Ya'er Lake area, China [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1999, 23 (4): 337—345 [徐盈, 吴文忠, 张银华, 等. 鸭儿湖地区六氯环己烷的残留动态与长期归宿. 水生生物学报, 1999, 23 (4): 337—345]
- [6] Nie X P, Wei T L, Lan C Y. Distribution accumulation and transfer

- dynamics of PCB1254 in a simulated micro-cosmos system [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, 28(5): 478—483[聂湖平, 魏泰莉, 蓝崇钰. 多氯联苯在模拟水生态系统中的分布、积累与迁移动态研究, 水生生物学报, 2004, 28(5): 478—483]
- [7] Hu H Y, Tao S, Lu X X, et al. Prediction of bioconcentration factor of non-polar organic compounds by fragment constant regression [J] *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2002, 26(1): 25—30[胡海瑛, 陶澍, 卢晓霞, 等. 估算有机化合物在鱼体中生物富集因子的片段常数法, 水生生物学报, 2002, 26(1): 25—30]
- [8] Ye C M, Lei Z F, Wang H, et al. A dynamic model on the Interaction between water particles and trace organic chemicals. [J] *Advances in Water Science*, 1995, 6(3): 172—175[叶常明, 雷志芳, 王宏, 等. 颗粒物与天然水体痕量有机物相互作用的动态模型, 水科学进展, 1995, 6(3): 172—175]
- [9] Chiou C T, Porter P E, Schmedding D W. Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water [J], *Environ. Sci. Technol.*, 1983, 17: 227
- [10] Means J C. Influence of salinity upon sediment-water partitioning of aromatic hydrocarbons: [J] *Marine Chemistry*, 1995, 51: 3—16
- [11] Regina B, Michael S M. Seasonal variation of polychlorinated biphenyl concentrations in the southern part of the baltic sea. *Marine Pollution Bulletin* [J] 2002, 44: 156—163
- [12] Yu Y H, Zhang W J, Yan Q Y. The feasibility for application of DNA fingerprints to community-level life system [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, 28(5): 457—463[余育和, 张文静, 颜庆云. DNA 指纹分析技术在群落级生命系统应用的可能性, 水生生物学报, 2004, 28(5): 457—463]
- [13] GB/T 14551-93 Determination of HCH and DDT in organisms, Gas Chromatogram method 4.4 (S) [GB/T 14551-93 生物质量六六六和滴滴涕的测定 气相色谱法 4.4(S)]
- [14] Lu Y B, Wang Z J. Accretion kinetics of organochlorinated pesticides by triolein-containing semipermeable membrane devices [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, 28(5): 540—544[吕怡兵, 王子健. 酸酯半渗透膜采样装置对有机氯农药的富集作用, 水生生物学报, 2004, 28(5): 540—544]
- [15] Tong H X, Qian Y, Wen X H, et al. Feature and control technology principle of water particles and persistent organic chemicals, Vol. 1 Water Particles [M], Beijing: Environmental Science Press 2000, 4—75, 281[汤鸿霄, 钱易, 文湘华, 等. 水体颗粒物和难降解有机物的特性与控制技术原理, 上卷, 水体颗粒物, 北京: 中国环境科学出版社, 2000, 4—75, 281]
- [16] Honebry M, Caims J Jr. The effect of island size, distance and epicenter maturity on the colonization process in freshwater protozoa communities [J]. *Am. Midl. Nat.*, 1980, 104: 80—92

PARTITIONING OF ORGANIC CHLORIDE POLLUTANTS IN DIFFERENT PHASES OF WATER IN DONGHU LAKE BY MICROBIAL COMMUNITY, PFU METHOD

WANG Xin-Hua¹, LIU Xiao-Hua¹ and SHEN Yun-Fen^{1,2}

(1. *Environmental Science Research Institute, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074;*

2 *Hydrobiological Institute of Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)*

Abstract: By using microbial community PFU method, partitioning of organic chloride pollutants such as α -HCH, β -HCH, γ -HCH, δ -HCH, HCB, pp'-DDE in different phases of water in Donghu lake in Wuhan city has been studied. Organic chloride pollutants such as α -HCH, β -HCH, γ -HCH, δ -HCH, HCB, pp'-DDE in PFU (polyurethane foam unit) extrusion were detected by GC-ECD after pretreatment by sequential extraction method including cell-fixing, supersonic and digest procedures. A cell-fixing step was designed before solvent extraction to prevent the release of organic chloride pollutants in cells because of solvent toxicity. During cell-fixing and digest procedure, the number of microorganisms was detected microscopically in a simulation experiment of *Tetrahymena thermophila* BF5. The result shows that cell-fixing can prevent microorganisms bursting into fragment, and microorganisms will disappear thoroughly after digest. The detected results show that main part of organic chloride pollutants enriched in micro-organisms or strong adsorb on aqueous particles, including life and non-life detritus, minority slightly adsorb on aqueous particles, and little is in solution. As a sampling material to determine organic chloride pollutants in natural water body, PFU has the merit of high enrichment coefficient and convenience. Because the particles absorbed by PFU can be controlled below certain dimension, we suggest that PFU can be used as a sampling method for research of POPs in particles of natural water body.

Key words: PFU microbial community method; Organic chloride pollutants; Bioconcentration; Adsorb