

东润邱成桐科学奖-化学奖

基于高通量分析技术的饮用水风险因子筛选与评估

**Screening and evaluation of the risk factors in drinking water
based on high throughput methods**

参赛成员：毕霁麟 (Daniel Bi)、刘静怡

指导教师：曹志兵、陈 静

南京外国语学校

江苏，中国

二零一七年九月十二日

参赛队员姓名：毕霁麟 (Daniel Bi)、刘静怡

中学：南京外国语学校

省份：江 苏

国家/地区：中 国

指导教师姓名：曹志兵、陈静

论文题目：基于高通量分析技术的
饮用水风险因子筛选与评估

基于高通量分析技术的饮用水风险因子筛选与评估

毕霖麟 (Daniel Bi) 刘静怡

南京外国语学校

中文摘要

近年来, 饮用水安全问题引起了广泛的关注。饮用水中存在着包括农药、个人护理品、阻燃剂、塑化剂、致病菌等在内的多种有机污染物和生物污染物。目前对于饮用水的日常监测仅针对有限数量的常规物质和个别微生物, 但不断有研究指出饮用水中存在大量非常规污染物与致病菌, 可能对人体健康构成潜在威胁, 因此现有的监测技术已经不能满足日益提高的饮用水安全保护的需求, 亟需建立方法识别饮用水中的非常规化学/生物风险因子。

本研究围绕饮用水中的非常规风险因子, **(1) 建立了高回收率的前处理技术;** **(2) 确立了高通量的非目标/可疑污染物鉴定技术与致病菌识别方法;** **(3) 进而形成了可靠的风险因子识别策略。**研究通过酸碱度的调节和吸附材料的筛选建立了高效的非常规有机污染物富集方法, 比传统技术总峰面积提高两倍以上; 基于液相色谱-飞行时间质谱法 (LC-QTOF) 建立了化学风险因子层级筛选方法, 实现了非常规污染物的高通量快速筛选与结构鉴定; 利用基因组技术建立了致病菌匹配方法, 解决了非常规微生物风险因子高通量识别问题。

在方法建立的基础上, 针对南京市 CB 水厂不同工艺段及管网的 7 个点位, 评价了高检出有机污染物与致病菌在不同季节的分布特征与潜在风险。结果表明饮用水中共有 74 种有机污染物可检出, 主要为药物类和农药类物质。其中酪洛芬、磷酸三丁酯和环磷酰胺为高响应、高检出污染物, 七氟丁酸、双氯芬酸、丙环唑和酞酸二甲酯等为高浓度污染物, 罗匹尼罗、阿纳托唑、羟基安定、吡格列酮、格列美脲和美金刚为高风险物质。耻垢分枝杆菌、鲁氏不动杆菌、嗜水气单胞菌等为主要致病菌, 存在一定的健康风险。饮用水出水 DW 点位污染物风险最高, 同时致病微生物相对丰度也达到最高。水处理工艺及管网运输过程中的风险

均具有显著差异, 6 种高风险物质对各点位风险的总体贡献可达 97-99%; 在经过氯化消毒后, 致病菌相对丰度达到最高, 随着管网输送, 丰度随之减小。

关键词: 饮用水、目标/非目标污染物、高通量、风险评估

Screening and evaluation of the risk factors in drinking water based on high throughput methods

Jilin Bi (Daniel Bi), Jingyi Liu

Nanjing Foreign Language School

Abstract

In recent years, the safety of drinking water has become a growing concern. The contaminants in drinking water contains not only microorganisms like pathogenic bacteria but also organic chemicals (OCs) such as pharmaceuticals, pesticides, personal care products (PPCPs), flame retardants and plasticizers. There are more and more unconventional contaminants existing in the environment while conventional environmental monitoring is limited, which could not meet the fast-growing demands for the safety of drinking water. It is necessary to develop high throughput methods to screen unconventional and high-risk OCs/ microorganisms in drinking water.

In order to screen unconventional chemical and biological risk factors in drinking water, we developed: (1) enrichment methods used in sample preparation to minimize the loss of analytes. (2) virtual screening and non-target identification methods with more efficiency to seek out pollutants detected frequently with high intensities in drinking water. (3) a high throughput method to identify the pathogenic bacteria based on genomics. (4) a reliable strategy to identify chemical and biological risk factors in drinking water. The enrichment method we developed can collect more chemicals as the peak area of extraction by adjusting the pH and selecting the appropriate SPE column in enrichment process was twice over than those using the traditional methods. The tier strategy based on LC-QTOF we built for non-target screening and chemical identification made it efficient and rapid to seek out unconventional chemical risk factors. With the strategy to match pathogenic bacteria through genome technology, unconventional biological risk factor was well characterized.

Based on those methods we built, water samples were collected at seven sampling points which represented processes in drinking-water-treatment and water

pipes under different months, and analyzed for risk factors. Results showed 74 chemicals were detected in drinking water, which were mainly pharmaceuticals and pesticides. Ketoprofen, tributyl phosphate and cyclophosphamide were identified with high detection rates and intensities while the concentrations of perfluorobutanoic acid, diclofenac, propiconazole and dimethyl phthalate (DMP) were of a high level. Six pharmaceuticals (ropinirole, anastrozole, temazepam, pioglitazone, glimepiride, memantine) posed certain risks and deserved close attention as their RQs were higher than 1. Pathogenic bacteria including mycobacterium smegmatis, acinetobacter lwoffii and aeromonas hydrophila were the main risk factor in drinking water. DW posed the highest risk as the total RQ of chemicals and relative abundance of pathogenic bacteria were both the top among all the drinking water samples. Those six pharmaceuticals with high risk contributed 97-99% of the total risk of each water sample, made a quite difference between those samples at seven points. For biological risk, the relative abundance of pathogenic bacteria reached the highest after chlorination and reduced constantly with the flow in pipe.

Keywords: Drinking water; Target/non-target contaminants; High throughput; Risk assessment

学术诚信声明

本参赛团队声明所提交的论文是在指导老师下进行的研究工作和取得的研究成果。尽本团队所知,除了文中特别加以标注和致谢中所罗列的内容以外,论文中不包含其他人或本团队已经发表或撰写过的研究成果。若有不实之处,本人愿意承担一切相关责任。

参赛队员: Deniel Bi 刘静怡

指导老师: 曾志兵 陈静

日期: 2017 年 9 月 12 日

目录

中文摘要.....	3
Abstract.....	5
学术诚信声明.....	7
目录.....	8
图目录.....	10
表目录.....	11
名词缩写.....	12
1. 绪论.....	13
1.1. 研究背景.....	13
1.1.1. 饮用水安全.....	13
1.1.2. 前处理技术.....	14
1.1.3. 高通量非目标分析技术.....	15
1.1.4. 基于化学分析的风险评估.....	16
1.1.5. 基于生物污染的风险因子识别.....	17
1.2. 研究意义及目的.....	18
2. 研究方法.....	19
2.1. 研究思路.....	19
2.2. 实验试剂与仪器.....	19
2.2.1. 实验试剂.....	19
2.2.2. 仪器设备.....	20
2.3. 样品采集与前处理.....	20
2.4. 非目标物质高通量分析方法.....	22
2.5. 可疑物质高通量分析.....	24
2.6. 风险评估方法.....	24
2.7. 分子生物学实验.....	26
2.7.1. 样品前处理.....	26
2.7.2. DNA 提取.....	26
2.7.3. DNA 检测.....	26
2.7.4. 16S rRNA 测序.....	26

2.8. 测序数据处理分析	26
2.9. 采样与实验实况图	27
3. 结果与讨论	28
3.1. 前处理方法的建立	28
3.2. 饮用水中非目标污染物分析	29
3.3. 可疑物质分析	31
3.3.1. 可疑物质定性分析	31
3.3.2. 可疑物质定量分析	33
3.4. 风险评估	35
3.5. 致病菌分布研究	40
3.5.1. 管网自来水三次采样中潜在致病菌相对丰度分布 (种水平)	40
3.5.2. 饮用水厂处理过程三次采样中潜在致病菌相对丰度变化	41
4. 结论与展望	43
4.1. 研究结论	43
4.2. 未来展望	43
5. 参考文献	45
6. 贡献说明	48
7. 致谢	49
8. 参赛队员简历	50
9. 指导教师简介	52

图目录

图 2-1 研究思路与技术路线图	19
图 2-2 采样点分布图	21
图 2-3 非目标物质筛选置信水平.....	24
图 2-4 化合物 DWEL 的决策树流程	25
图 2-5 团队成员采样与实验实况图	27
图 3-1 两种 SPE 材料富集液的非目标峰数目/总响应对比.....	28
图 3-2 非目标分析流程：以酪洛芬为例.....	30
图 3-3 各点位污染物总浓度情况.....	33
图 3-4 各类物质在饮用水厂出水进水及饮用水中浓度分布情况	34
图 3-5 风险商分布情况.....	39
图 3-6 管网自来水第一次采样中潜在致病菌相对丰度分布情况示意图	40
图 3-7 管网自来水第二次采样中潜在致病菌相对丰度分布情况示意图	40
图 3-8 管网自来水第三次采样中潜在致病菌相对丰度分布情况示意图	41
图 3-9 水处理过程中潜在致病菌相对丰度变化情况示意图	42

表目录

表 2-1 非目标识别高检出高响应物质流程表.....22

表 3-1 高响应高检出物质非目标分析结果31

表 3-2 水样中检出率 100%的物质信息表32

表 3-3 74 种检出物质的风险商值.....35

名词缩写

英文缩写	英文全称	中文全称
SPE	Solid Phase Extraction	固相萃取
DWTP	Drinking Water Treatment Plant	饮用水处理厂
WFD	Water Framework Directive	欧盟水框架指令
MCL	Maximum Contaminant Level	最高污染水平
ADI	Acceptable Daily Intake	每日允许摄入量
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level	无明显损害作用水平
LOAEL	Lowest Observed Adverse Effect Level	最低可见有害作用水平
SF/SL	Slope Factor	比例因子
VSD	Virtually Safe Dose	实际安全剂量
TTC	Threshold of Toxicologic Concern	毒理学阈值
EDC	Endocrine Disrupting Chemicals	内分泌干扰物
RQ	Risk Quotients	风险商
DWEL	Drinking Water Equivalent Level	饮用水当量水平
PBS	Phosphate Buffer Saline	磷酸缓冲盐溶液
OUT	Operational Taxonomic Unit	运算的分类单位
NCBI	National Center for Biotechnology Information	美国国立生物技术信息中心
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	局部序列比对 基本检索工具

1. 绪论

1.1. 研究背景

1.1.1. 饮用水安全

水是维持生命所不可缺少的物质,在人类生活和生命过程中具有极其重要的作用。安全无害化的饮用水供应,是人类健康生活的基本保障。然而,随着社会经济的发展和科学技术的进步,大量化学品和致病菌随着废水的排放进入环境,造成了水体的化学与生物污染,极大地降低了水资源的可利用性及安全性。

随着环境污染不断严重化,发达国家及国际组织为了进一步保障人民饮用水安全,不断完善和提高饮用水水质标准。1998 年,欧盟 (European Union, EU) 发布了《饮用水标准》^[1], 2002 年俄罗斯修订了《国家饮用水卫生标准》^[2], 2004 年世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 发表了第三版《饮用水水质标准》^[3], 同年,美国环境保护局 (Environmental Protection Agency, EPA) 修订了《饮用水水质标准》^[4]。以上标准的出台代表了世界饮用水标准的发展进程。相应的,我国的水质标准也在不断发展和完善。1985 年我国颁布并实行了《生活饮用水卫生标准》, 2001 年国家卫生部下发了《生活饮用水卫生规范》, 相比于 85 版国标有了重大修订, 增加到 96 项水质指标, 主要增加了有机物检测项目。2006 年颁布并实行的新国标, 与 85 版相比, 生物指标由 2 项增至 6 项, 毒理指标中无机化合物由 10 项增至 21 项, 而指标中有机化合物由 5 项增至 53 项, 显著扩大了生物污染与有机污染控制范围并严格了指标限值。然而与全世界已经有 CAS 号的 1 亿种化学品相比, 现有标准中关注的目标污染物数量微不足道, 难以代表饮用水中化学污染特别是有机污染物的分别状况。

大量研究表明, 饮用水中存在着包括药物、农药、个人护理品、阻燃剂、塑化剂等在内的多种非目标有机污染物^[5]。Mark 等人分析了美国 19 个点位的饮用水样品中 51 种有机污染物, 发现农药阿特拉津在水源水、饮用水厂出水和管网

自来水中的浓度均超过 10ng/L (32、49 和 49ng/L) , 可作为饮用水处理的指示物质^[6]。Paul 等人分析了美国饮用水处理工艺中的 113 种有机污染物的含量, 发现饮用水源水中可检测到 45 种物质, 包含抗生素、阻燃剂、农药等多种物质, 其中 4-壬基酚 (4-Nonylphenol, NP) 的浓度最高可到 5μg/L^[7]。尽管饮用水中一些污染物的浓度很低, 但是它们的潜在风险仍不可忽视。Leung 等人分析了中国 113 个自来水中的药物浓度, 发现大部分物质的浓度低于 50ng/L, 然而, 风险评估结果发现, 有 4 种低含量药物迪美唑 (dimetridazole), 甲磺霉素 (thiamphenicol), 磺胺甲噁唑 (sulfamethazine) 和克拉霉素 (clarithromycin), 它们对婴幼儿具有潜在的风险, 值得引起注意^[8]。

然而这些污染物分布研究及风险物质筛查都是针对目标污染物的, 尚没有对于饮用水中非目标污染物识别的高通量分析方法, 无法反应水体污染的整体状况, 更无法实现高检出物质的风险评估。

1.1.2. 前处理技术

水样中污染物的浓度大部分在 ng/L 及以下, 直接测试难以达到仪器检测限, 因此为了满足仪器测试要求, 需要对环境水样进行富集前处理。传统的富集方法, 如液液萃取、树脂吸附等等, 由于方法及技术的成熟性, 被很多科研机构及环境监测单位使用^[9-10]。然而, 传统方法具有操作复杂、浓缩倍数不高、物质富集具有偏向性等缺点, 尤其是对于大体积样品, 耗时耗力, 需要损耗很多的溶剂, 造成了很高的污染和浪费^[11-12]。为了克服这些问题, 科学家发展了新的水样富集方法。目前, 应用最为广泛的是固相萃取技术 (Solid Phase Extraction, SPE), 它是美国环保局 (USEPA) 标准方法推荐的瞬时采样技术。具有操作简单、需要溶剂量少、能够富集大体积样品、省时省力等优势, 是目前最主流的水样有机污染物富集方法。

在固相萃取中, C18 和 HLB 是最常用的填料, 经常被用作水样中有机物的萃取填料。根据相关研究, C18 填料对极性有机污染物的萃取能力不够强, 会导致

部分流失。相较 C18 填料, HLB 吸附剂(乙烯苯-N-乙烯基吡咯烷酮共聚物), 对环境中的极性有机污染物和非极性有机污染物, 都能做到有效的提取与富集, 因此, 在水中有有机污染物的提取实验中, 目前 HLB 柱是应用最广泛的 SPE 材料^[13-14]。此外, 近年来一些针对某些类型的有机污染物进行优化的新型的 SPE 材料也在发展中, 例如、适用于吸附离子型有机物的 WAX、MAX, 针对极性水溶性的有机物的吸附进行优化的 TELOS ENV 等。TELOS ENV 柱以苯乙烯-co-二乙烯基苯为填料, Daniel Stalter^[15]等学者使用了 10 种吸附剂的 SPE 小柱富集了非挥发性消毒副产物(Disinfection By-Products, DBPs)类物质, 发现 TELOS ENV 的回收率是最高的, 且在酸性条件下它的富集效果更好。因此本实验将尝试使用这种填料的 SPE 小柱, 富集水中的有机污染物。

此外, 化合物的浓度, pH 值, 温度和离子强度也会影响 SPE 小柱对水中有机物富集的效果^[16], 而在这些理化参数中, 在前处理过程中 pH 值是最容易调节和控制的, 所以本研究也试图通过调节 pH 值, 提高对 SPE 对水中有机物的富集能力。

1.1.3. 高通量非目标分析技术

随着科学技术和化学分析的不断进步, 出现了多种高分辨质谱(HR-MS), 如飞行时间质谱(TOF)、傅里叶变换回旋共振质谱(FT-ICR-MS)、轨道阱(Orbitrap)等等。这些质谱可以得到物质的准确质量数和同位素分布信息, 并借助相应软件, 生成可能的分子式和可进行数据库匹配的分子碎片, 为化合物的高通量检出和鉴定提供了可能。Alida 等人发现液相色谱-飞行时间质谱法(LC-QTOF)对于物质的定性, 定量以及物质的确认方面均有优势。另外, Q-TOF 的扫描速度快, 一秒内可以获得数万乃至数十万张质谱全图^[17]。借助高分辨质谱, 高通量物质的非目标识别分析的可行性显著提高。

目前基于 Q-TOF 的非目标识别主要应用于代谢组学分析, 食品以及环境样品的分析检测。除此之外, 非目标识别也可以进一步分析和确认环境和生物样品

中多种农药的代谢产物或转化物^[18-20]。利用梯度洗脱, 高效液相色谱可以将性质差异较大的物质进行很好的分离, 故而在后续分析中能较好的识别物质出峰。此外, TOF 分析器具有其独特的优势。相较四级杆或离子阱等分析器, TOF 可以准确提取分子量, 也可对每种污染物进行元素分析, 进而得到同位素分布信息, 最终计算得到分子量, 找到对应物质。通过高分辨率质谱对饮用水进行筛选, 可获得全部物质的质谱和色谱信息, 以此为依据进行非目标筛查, 可以获得非目标污染物分子式清单。然而, 一个准确质量数可能对应多个分子式, 一个分子式可能具有很多结构式, 这些不确定性, 对物质的非目标识别提出了挑战。亟需开发非目标污染物识别与结构确定技术, 实现饮用水中非目标污染物的高通量筛查。

1.1.4. 基于化学分析的风险评估

饮用水环境中存在着种类繁多的有机污染物, 以现有的科学技术及经济发展水平, 我们无法做到对每种污染物都准确检测及管理, 因此, 结合污染物的毒性效应, 开展饮用水污染物的健康风险评估, 找到主要的风险因子, 对饮用水安全管理具有重要的作用。

美国 EPA 于 20 世纪 80 年代提出健康风险评价“四步法”, 把环境污染与人体健康相关联, 通过危害识别、剂量-反应关系评估、暴露评估和风险表征, 定量描述风险物质对人体产生健康危害的风险程度。基于以往研究成果, 通常从致癌风险和非致癌风险两方面评价有害化学物质的对人体健康的影响。

对于具有非致癌性风险物质, 一般认为动物或人体对其反应有剂量阈值, 假设低于阈值不会诱发损害健康的影响, 剂量反应关系为非线性 S 型变化。对于具有致癌性风险的物质, 一般假设生物体对致癌物的反应没有剂量阈值, 任何大于零的剂量都会产生对人体产生不利影响, 剂量反应关系为线性变化。

本研究基于高通量测试技术的分析结果, 结合致癌风险和非致癌风险, 对水中检出有机污染物进行风险评估, 对饮用水中的风险因子进行有效识别。

1.1.5. 基于生物污染的风险因子识别

生物污染是饮用水污染物中不可忽视的部分, 主要包括细菌性生物污染物、病毒性生物污染物、寄生虫、真菌性生物污染物以及生物毒素。一般来说, 绝大多数的细菌是无害的或者有益的, 但是也存在很多能够导致人类及动物疾病的致病细菌。细菌性生物污染物主要是指一些能够引起疾病的病菌, 例如不动杆菌属、放线杆菌属、气单胞菌属、大肠杆菌属、沙门氏菌属等。如今水体的生物污染物中, 致病性细菌的污染愈发严重, 有可能对人类的生存环境及自身健康产生严重的危害。因此了解致病细菌的检测方法对于人类探究针对致病细菌引起的疾病的预防、救治方法有重大的意义。

对于致病菌的检测, 传统的分离培养法一直以来是采用常规检验技术检验致病菌, 但是其过程费时费力。分子生物学技术用于致病菌的快速检测有着很大优势。PCR 技术是利用特异性引物扩增少量特定 DNA 片段的技术。它可以用来扩增水样中的致病基因作为指示基因来定性筛选样品中的致病细菌, 其最大的特点就是能够将微量的 DNA 片段快速、大量扩增, 是目前分子水平检测技术中最常用的几种方法之一。

高通量测序技术主要用于对环境样品中直接收集、扩增得到的基因材料的分析, 其中得到广泛应用的是以边合成边测序为核心思想的第二代测序, 主要包括 454 焦磷酸测序以及 Illumina 测序 (主要包括 Miseq 和 Hiseq 测序平台)。高通量测序可以在短时间内得到高通量的核酸序列, 能够更好地反应微生物群落结构的全貌, 广泛地应用于环境微生物群落结构的分析和特定微生物的筛查。

饮用水安全关乎每个人的健康与社会稳定发展。当前饮用水的常规监测指标已不能满足日益增长的水质安全需求, 急需建立高效、全面、成本低廉的监测技术, 实现水中高风险污染物及主要致病菌的快速鉴别, 为饮用水安全监测与管理提供数据支撑。然而污染物与微生物种类多样, 前处理富集技术的偏向性、化学结构式的非目标确定与致病菌的功能基因鉴定是制约高通量监测技术的关键。

1.2. 研究意义及目的

本研究针对饮用水中有机化学污染与生物污染种类繁多的现状, 以及饮用水标准中常规污染物与致病菌种类有限, 现有技术分析无法满足风险评估与健康保障的困境, 我们**重点关注的化学问题是**:

如何建立有效的科学方法识别饮用水中的非常规化学/生物风险因子并加以评估? 围绕饮用水中的非常规风险因子, 具体对策是:

(1) 建立了高回收率的前处理技术。通过酸碱度的调节和吸附材料的筛选建立了高效的非常规有机污染物富集方法, 比传统技术总峰面积提高两倍以上。

(2) 确立了高通量的非目标/可疑污染物鉴定技术与致病菌识别方法。基于液相色谱-飞行时间质谱法 (LC-QTOF) 建立了化学风险因子层级筛选方法, 实现了非常规污染物的高通量快速筛选与结构鉴定; 利用基因组技术建立了致病菌匹配方法, 解决了非常规微生物风险因子高通量识别问题。如此, 有效解决了污染物碎裂组合多样、结构鉴定难的问题。

(3) 形成了可靠的风险因子识别策略。进一步通过建立的高通量定量分析技术, 对水样中高风险物质进行识别, 识别出饮用水中高检出高响应物质与高丰度致病菌, 筛选出水体中的高风险因子, 为污染控制提供数据支撑。

2. 研究方法

2.1. 研究思路

基于前述关注的化学问题，以及提出的三个对策，我们制定了如下的研究思路与技术路线图。

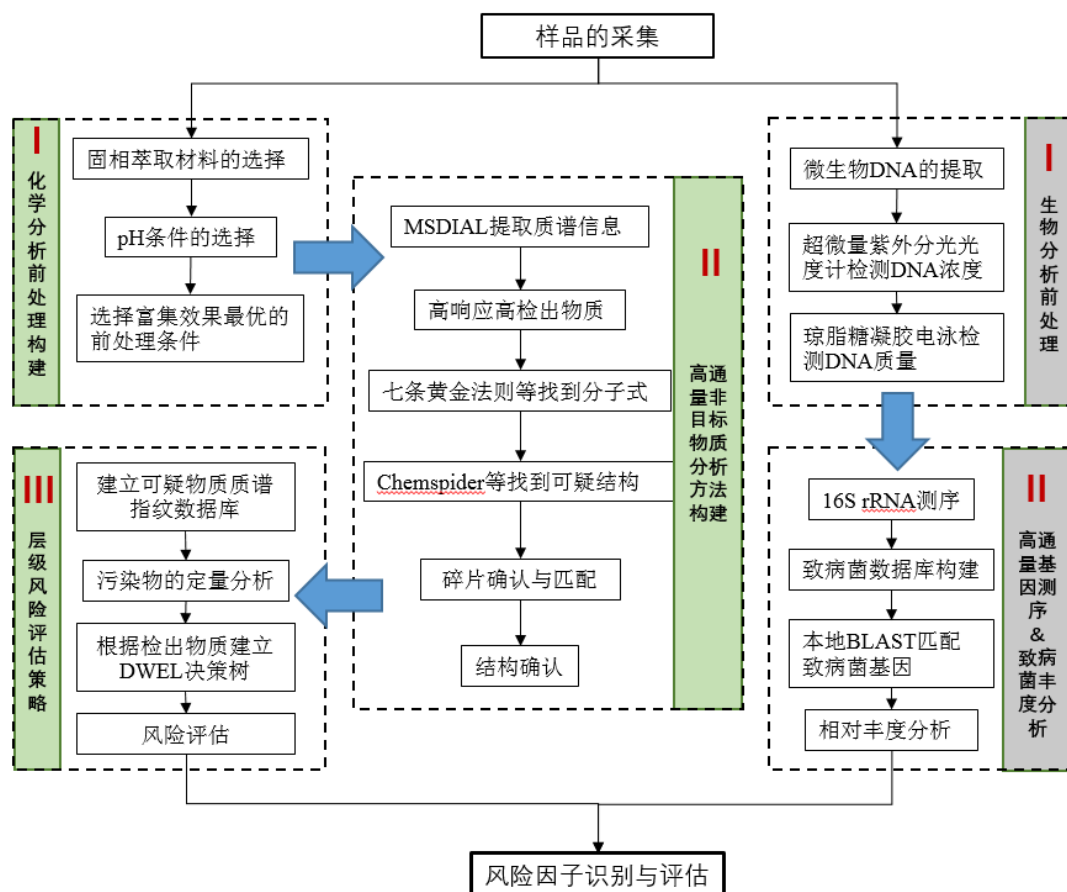


图 2-1 研究思路与技术路线图

2.2. 实验试剂与仪器

2.2.1. 实验试剂

甲醇 (Methyl alcohol, Merck 公司, 德国), HPLC, 纯度>99.9%; 二氯甲烷 (Dichloromethane, ROE 公司, 美国), HPLC, 纯度>99.9%; 正己烷 (n-Hexane,

Merck 公司, 德国), HPLC, 纯度>99.9%; 乙腈 (Acetonitrile, Merck 公司, 德国), HPLC, 纯度>99.9%; Milli-Q 超纯水 (Millipore 公司, 美国) 等。

2.2.2. 仪器设备

N-EVAP 112 氮气吹干仪 (Organomation Associates 公司, 美国); OA-SYS 加热系统 (Organomation Associates 公司, 美国); 平行蒸发仪 (BUCHI 公司, 瑞士); SHZ-III 循环水式真空泵 (南京科尔仪器有限公司); SDC-6 节能型智能恒温槽 (宁波新芝生物科技股份有限公司); 高效液相色谱质谱仪 LC-MS/MS (液相: Agilent Technologies 1260 infinity, Agilent Technologies 公司, 美国; 质谱: API 4000 LC/MS/MS System, AB SCIEX 公司, 美国); 高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱 (液相: Agilent Technologies 1260 infinity, Agilent Technologies 公司, 美国; 质谱: Triple TOF5600, AB SCIEX, 美国) 等。

2.3. 样品采集与前处理

在 2017 年 5 月, 6 月, 7 月, 采集了南京市 CB 水厂不同工艺段及运输管路水样 (图 2-2), 包括 4 个饮用水厂处理工艺阶段水样 (长江水源水 SW、沉淀池出水 ES、过滤池出水 FW、氯化消毒后出水 DW), 及 3 个自来水样品 TWA、TWB 和 TWC (沿配水管网分布, 分别距离饮用水厂 5km、10km 和 30km, 其中 TWB 和 TWC 之间经过一个二次氯化消毒池), 共计 21 个样品。每个点位采集水样 5L, 棕色玻璃瓶盛装, 运输至南京大学环境学院进行样品前处理, 样品均在 24 小时内完成富集。

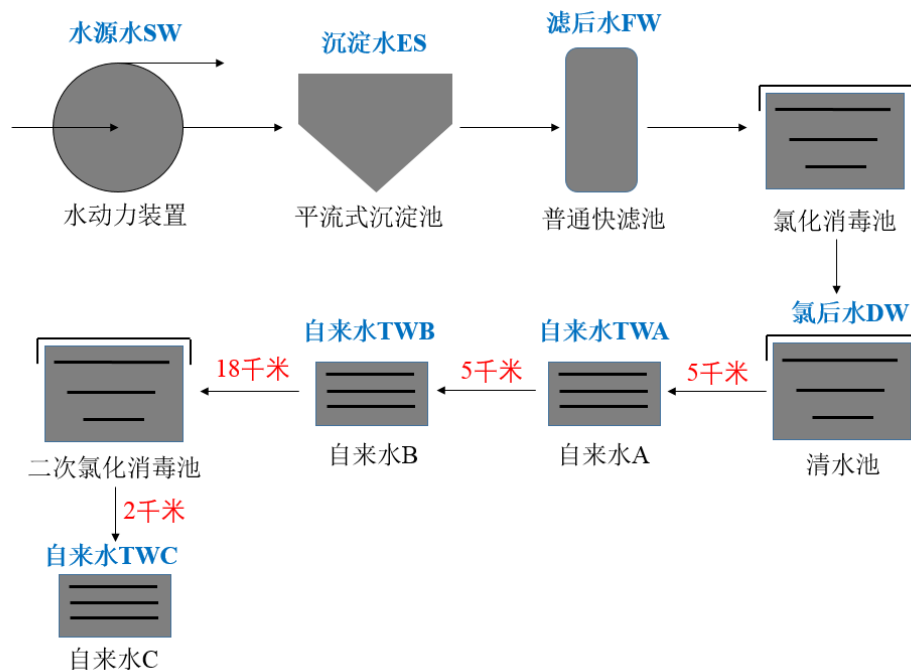


图 2-2 采样点分布图

水样运送回实验室后，采用固相萃取技术富集水中污染物，过柱流速约为 3-5 mL/min，小柱使用前分别用 10 mL 正己烷、10mL 二氯甲烷、10mL 甲醇和 10 mL Milli-Q 水活化。水样流经小柱过程中，保证小柱不干涸。上样结束后，对小柱进行干燥。干燥后的 SPE 柱分别用 5 mL 甲醇、5mL 二氯甲烷和 5mL 甲醇洗脱，合并洗脱液。洗脱液在旋转蒸发仪上旋蒸至近干，转移至氮吹管中。氮吹浓缩至近干，溶剂替换成甲醇，定容至 1 mL，转移到进样小瓶置于-20℃冰箱保存。

已有文献表明，基于不同的填料对饮用水中有机污染物富集时，TELOS ENV 和 HLB 效果较好，富集物具有最大的毒性效应。因此，本研究选择玻璃 TELOS ENV 小柱（聚苯乙烯-co-二乙烯基苯，百灵威，1g，6mL），和玻璃 HLB 柱（HLB，Waters，200mg，5mL），分别评估了它们对污染物的富集能力，以选择针对非目标污染物富集能力最强的吸附柱。此外，研究表明，不同 pH 条件对物质的富集不同，为了尽可能的富集更多的物质，预实验阶段，用硫酸调节水样 pH（3.0 和 7.0），评估了这 2 种 pH 条件下固相萃取柱对水中污染物的富集能力大小。

2.4. 非目标物质高通量分析方法

对于非目标污染物,利用高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱(HPLC-Q-TOF)对样品进行质谱全扫,进而利用挖掘和解析质谱谱图数据软件 PeakView 和 MSDIAL 对质谱数据进行处理,找到响应最高的物质并判定具体结构。

仪器条件如下:

液相色谱仪: Agilent HPLC 1260;

色谱柱: Agilent C18 柱 (2.1mm×150mm, 2.5μm); 柱温: 30℃;

流动相: A: 水 (含体积百分比为 5%乙腈), B: 乙腈;

流速: 0.4 mL/min; 进样体积为 10 μL。

非目标污染物筛查策略如表 2-1 所示:

表 2-1 非目标识别高检出高响应物质流程表

	步骤	方法
1	离子峰面积排序 高检出高响应的离子	MSDIAL
2	离子响应 (XIC) >1000;S:N>10; 同位素分布<20%峰宽>10s; 扣除空白	XIC Manager
3	基于精确质量数和同位素差异, 计算分子式	分子元素组成
4	基于七条黄金法则, 筛选分子式	七条黄金法则
5	打开二级 MSMS 谱图, 和 Chemspider 数据库进行结构匹配	Chemspider
6	Fragments Pane 程序进行碎片分析	Fragments Pane
7	MetFusion 进行碎片预测与匹配 Massbank 数据库确认结构	Met Fusion
8	文献报道或标样谱图相对比	文献、标样

借助 MSDAIL 软件, 将各个点位的峰信息提取至 excel 表中。对峰面积进行排序后, 找到高检出高响应的质量数。通过 Peakview 软件的 XIC Manager 程序, 得到符合条件的母离子。再基于质谱特征和七条黄金法则限制元素种类。七条黄

金法则的内容为^[21]：(1).限定元素数量。如果想要鉴别的化合物是天然化合物，那么各种元素的数量不可能无限地高，主要是通过限定质量范围来限定各个元素数量的最大可能数值。(2).LEWIS and SENIOR 检验。LEWIS 法则最简单的要求是要满足分子含有主族元素，尤其是 C、O、N，可以完全充满 s、p 轨道的方式共享电子；SENIOR 法则包含三方面：价态总数以及原子的奇数价态的总数是偶数，价态总数 $\geq 2 \times$ 原子数-1。(3).同位素模式筛选。同位素丰度模式的相对误差应该限定在较小的范围如 2-5%，此方法可有效鉴别元素 Cl, Br, S。(4).元素 H 和 C 比值检验。一般这个比值不会特别大，也不会特别小，基于 Wiley 质谱数据库，该数据库分子式中超过 99.7%的 H/C 比值在 0.2-3.1 之间，所以在筛选时可将 H/C 限定在这个范围内。(5).杂原子比值核查，基于 Wiley 质谱数据库，在 99.7%的置信范围内，N/C 比值在 0-1.3 之间，O/C 比值在 0-1.2 之间，P/C 比值在 0-0.3 之间，S/C 比值在 0-0.8 之间。(6).元素可能性检查，基于 Beilstein 数据库和 Dictionary of Natural Products 数据库得到了不同元素组成条件下可能的各元素数量范围。(7).三甲基硅烷基检验，一般应用在利用气相色谱质谱联用（GC-MS）的时候。

之后再用 Peakview 软件找到具体质量数并与 ChemSpider 数据库进行匹配，结合质量误差及断键可能性，对可能结构式进行进一步确认。对于找到的结构式，可查找文献或购买标样进行质谱全扫，进行最终的确认。

此外，确定了非目标筛查出的化合物的准确性的置信度区间，设立了 5 级置信水平（图 2-3，Level 1-Level 5），随着分子式结构式的进一步确定，置信水平不断升高。



图 2-3 非目标物质筛选置信水平

2.5. 可疑物质高通量分析

利用液相质谱联用仪 (LC-MS/MS) 实现可疑物质的高通量定性定量分析。在非目标污染物识别的基础上, 结合欧盟水框架指令 (Water Framework Directive, WFD) 中常检出物质, 确立了 341 种可疑物质清单, 并基于 LC-MS/MS 建立了定性、定量测试方法。其中包括 102 种农药类物质、150 种药物类物质、53 种极性污染物、5 种表面活性剂和 31 种城市污染物。

仪器条件如下:

色谱柱: Waters ACQUITY BEH C18 柱 (2.1 mm×50 mm, 2.5μm);

柱温: 40℃;

流动相: A: 水, B: 甲醇;

流速: 0.4 mL/min;

进样体积: 5 μL。

2.6. 风险评估方法

对于污染物的潜在风险, 我们采用风险商 (Risk Quotients, RQs) 来表征。风

险商是环境检测浓度与饮用水当量水平（Drinking Water Equivalent Level, DWEL）之间的比值。将得到的比值与 1 进行比较，如果大于 1 则说明有风险可能性。对于环境检测浓度，我们使用在水样中检测到的最高浓度作为参考。对于饮用水当量水平 DWEL，我们参考了 Snyder 的决策树^[22]，具体流程如图 2-4：

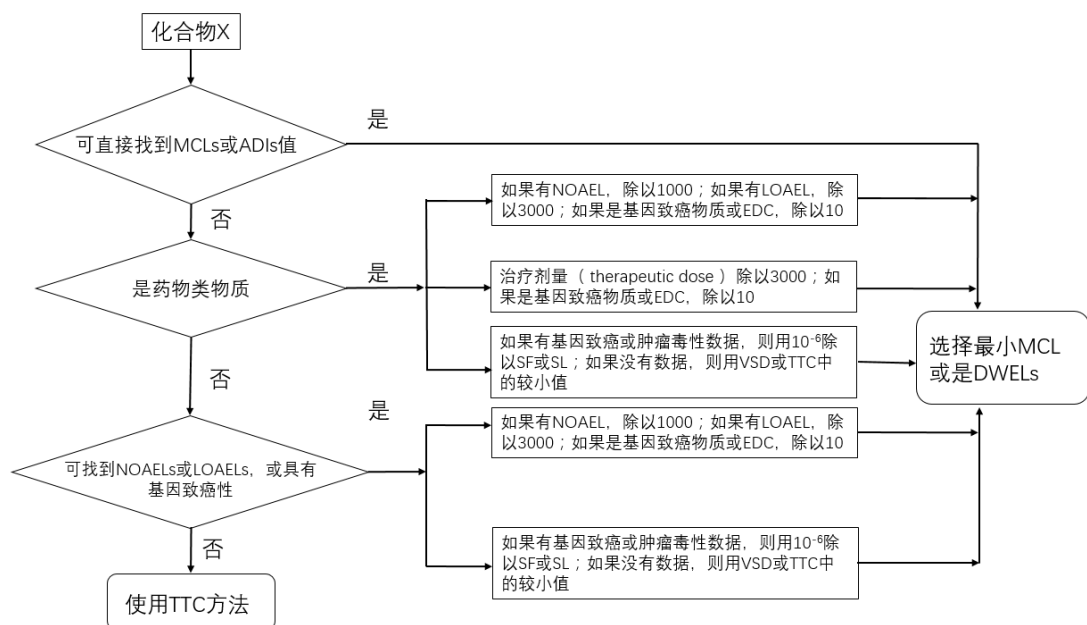


图 2-4 化合物 DWEL 的决策树流程

MCL: Maximum Contaminant Level, 最高污染水平

ADI: Acceptable Daily Intake, 每日允许摄入量

NOAEL: No Observed Adverse Effect Level, 无明显损害作用水平

LOAEL: Lowest Observed Adverse Effect Level, 最低可见有害作用水平

SF/SL: Slope Factor, 比例因子

VSD: Virtually Safe Dose, 实际安全剂量

TTC: Threshold of Toxicologic Concern, 毒理学阈值

EDC: Endocrine Disrupting Chemicals, 内分泌干扰物

具体公式：

$$(1) \text{ DWEL } (\mu\text{g/L}) = \frac{\text{ADI} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{kg-d}} \right) \times 70\text{kg}}{\frac{2\text{L}}{\text{d}}}$$

$$(2) RQ = \frac{Cs (\mu\text{g/L})}{DWEL (\mu\text{g/L})}$$

2.7. 分子生物学实验

2.7.1. 样品前处理

水样运输至实验室后, 采样真空抽滤装置将所有水样过微孔滤膜 (0.45 μm), 滤膜用作下一步 DNA 提取。

滤芯运输至实验室后, 取出内部滤膜, 置于 50 mL 烧杯中, 每次使用 30 mL PBS (1 $\times$, pH7.4) 洗脱表面附着物, 可使用超声清洗器辅助洗脱, 洗脱液置于 50 mL 离心管中, 6000 $\times$ g 离心 10 min, 弃去上清液。滤膜反复清洗三次, 保留沉淀, 使用 3 mL PBS (1 $\times$, pH7.4) 重悬浮。

2.7.2. DNA 提取

采用 MPFastDNA SPIN kit for Soil 提取样品中的 DNA。微孔滤膜剪碎分装至裂解管中, 滤芯处理后的悬浊液分装至三个裂解管中, 后续步骤按照试剂盒推荐步骤进行, 最终得到 DNA 溶液。

2.7.3. DNA 检测

使用超微量紫外分光光度计检测 DNA 浓度 (NanoDrop One, Thermo, 美国), 使用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。

2.7.4. 16S rRNA 测序

DNA 样品送至诺禾致源公司进行 16S rRNA 测序, 得到原始测序序列。

2.8. 测序数据处理分析

(1) 使用 QIIME 平台对原始测序序列进行处理, 包括拼接、质控、OTU 确

定、进化分类注释和多样性分析。

(2) 使用 NCBI 下载致病菌序列，构建致病菌数据库。

(3) 使用本地 BLAST 工具，以致病菌数据库为参考数据库，确定致病菌丰度。

2.9. 采样与实验实况图

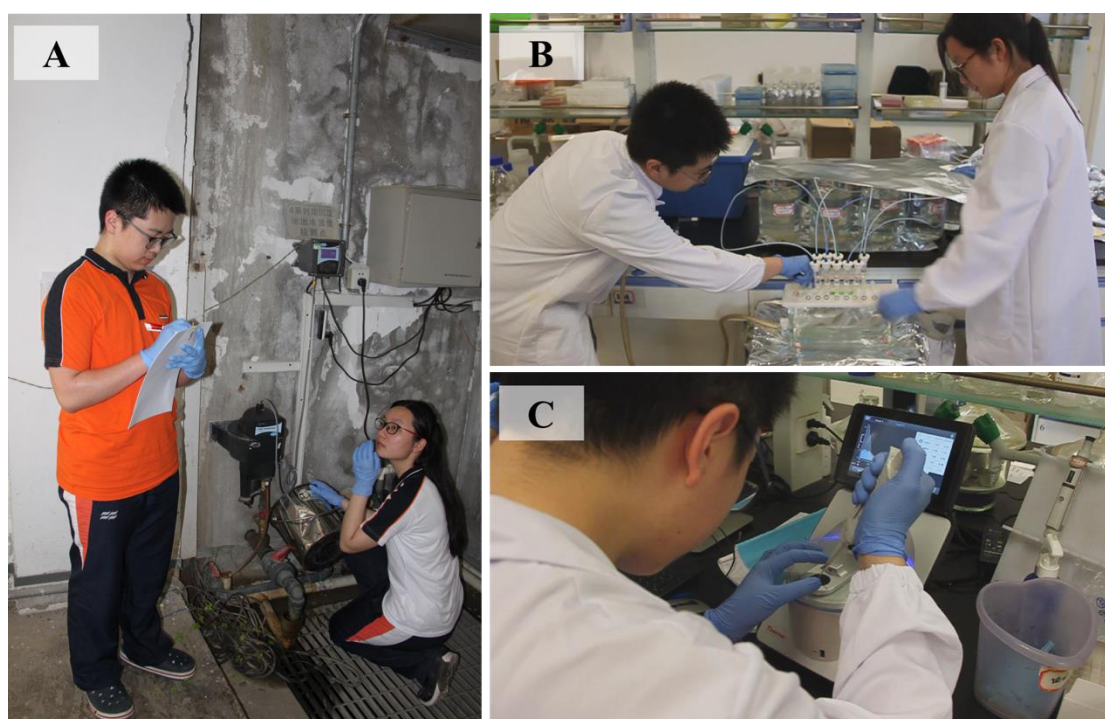


图 2-5 团队成员采样与实验实况图

(A) 采样—2017 年 7 月于 CB 水厂采集沉淀池出水

(B) 化学分析—采用固相萃取技术富集水中污染物

(C) 分子生物学实验—使用超微量紫外分光光度计检测 DNA 浓度

3. 结果与讨论

3.1. 前处理方法的建立

水样在分别经过两种柱子 HLB 和 TELOS ENV 富集后, 将洗脱液浓缩替换溶剂后使用高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱(HPLC-Q-TOF)对样品进行质谱全扫, 基于非目标筛查的方法进行峰的提取。

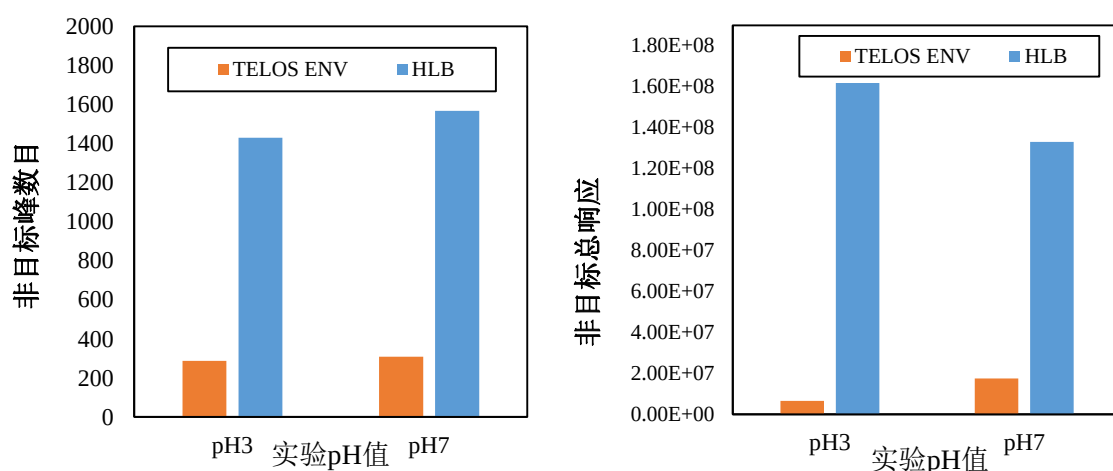


图 3-1 两种 SPE 材料富集液的非目标峰数目/总响应对比

非目标提取的结果显示, 在 pH3 和 pH7 时, HLB 富集到的物质数目分别为 1430 和 1568 个, 而 TELOS ENV 分别只有 287 和 308 个。并且 HLB 提取到峰的总响应在两个 pH 条件下均可达到 1×10^8 以上, 但 TELOS ENV 都在 2×10^7 以下 (如图 3-1)。

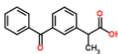
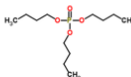
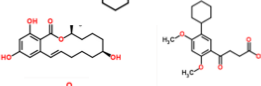
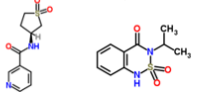
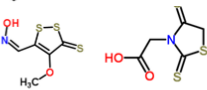
非目标总提取结果表示, 两种 pH 值条件下, HLB 材料的小柱所能富集到的物质种类和物质的浓度相对于 TELOS ENV 更好, 故应采用 HLB 小柱作为 SPE 的富集材料。从图 3-1 可以看出, 基于非目标鉴别, 在 pH=3 和 pH=7 两种条件下非目标峰数目基本一致, 而 pH=3 条件下的非目标峰面积明显高于 pH=7, 说明 pH=3 的条件下更适合非目标污染物的富集。故在正式实验中, 选用了 pH=3 的富集条件, 使用浓硫酸将水样调节 pH3.0 后, 再使用 HLB 小柱进行富集。

3.2. 饮用水中非目标污染物分析

通过使用 **MSDIAL viewer** 软件, 识别所有饮用水样的质谱全扫图中的响应峰, 并保存成 **excel** 格式, 数据具体包括: 出峰的保留时间, 离子化模式 (负离子模式), 母离子质量数, 二级子离子质量数及响应, 各个点位及空白样品下的出峰面积。扣除掉没有二级信息的峰及在空白点位中峰面积>1000 的峰后, 共找到 3868 种物质。依据峰面积大小进行排序, 挑选出所有样品中峰面积排序均在前 10% 的物质。基于质谱特征和 7 条黄金法则, 限定了物质的元素组成。将 **PeakView** 软件与数据库 **ChemSpider** 相关联, 找到物质的可能分子式与结构式, 并对可能结构式进行诊断性分析。筛选结果表明, 共有 3 种物质断键符合, 且方式合理并与数据库谱图一致。通过购买标样, 与标样谱图比对, 最终确认了离子 253.0864 为化合物酪洛芬 (**Ketoprofen**), 265.155 为磷酸三丁酯 (**TBP**), 259.0161 为环磷酰胺 (**Cyclophosphamide**)。

以酪洛芬为例, 具体筛选流程如图 3-2: 在质谱信息解析阶段, 对各离子进行峰面积大小排序。找到离子 253.0864, 其在各个点位均有检出, 且峰面积排序均在 10%, 满足高检出高响应的物质筛选条件 (步骤 1)。打开 **Peakview** 软件, 扣除背景值, 找到离子 253.0864, 且满足 $XIC > 1000$, $S:N > 10$ 等条件 (步骤 2)。根据精确质量数 253.0864 和同位素差异, 计算得到多个分子式: $C_{16}H_{14}O_3$ 、 $C_{12}H_{10}N_6O_1$ 、 $C_{14}H_{12}N_3O_2$ 等 (步骤 3)。基于七条黄金法则, 找到最可能的分子式为 $C_{16}H_{14}O_3$ (步骤 4)。打开该离子的二级谱图, 基于 **Chemspider** 数据库中的物质谱图并结合离子 253.0864 的二级谱图, 进行子离子匹配及排序, 找到多种可疑结构式。其中酪洛芬的分数最高, 为最可能的物质结构式 (步骤 5)。将酪洛芬结构文件与离子二级谱图相匹配, 进行断键判断。断键结果表明, 响应最高的子离子 209.1537, 为酪洛芬去羧基的结果, 符合断键且方式合理 (步骤 6)。**Massbank** 数据库进一步显示酪洛芬存在响应最高子离子 209.0971, 与样品离子二级谱图相符, 已基本确定该离子物质为酪洛芬 (步骤 7)。最终购买酪洛芬的标样并进行 **TOF** 测试, 标样出峰保留时间 23min, 一级母离子 253.0849, 最高响应

表 3-1 高响应高检出物质非目标分析结果

母离子 (M-H)	分子式	结构式	置信度水平	物质确认
253.0864	C ₁₆ H ₁₄ O ₃		Level 1	<u>Ketoprofen</u>
265.155	C ₁₂ H ₂₇ O ₄ P		Level 1	<u>Tributyl phosphate (TBP)</u>
259.0161	C ₇ H ₁₅ Cl ₂ N ₂ O ₂ P		Level 1	Cyclophosphamide
319.1535	C ₁₈ H ₂₄ O ₅		Level 2a	-
239.0489	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₃ S		Level 3	-
205.9411	C ₅ H ₅ NO ₂ S ₃		Level 3	-

3.3. 可疑物质分析

3.3.1. 可疑物质定性分析

基于高检出的非目标污染物,结合欧盟 WFD 项目中的 338 种高检出的物质,组成了可疑物质数据库 (341 种物质),包括各化合物的英文名称、中文名称、CAS 以及一级、二级质谱信息。进而利用 LC-MS/MS 建立了可疑物质定性分析方法,并进一步利用标样对检出的物质进行定量分析。结合各物质的检测限,共在 3 次采样的所有自来水样品中检出了 74 种污染物。

在检出的 74 种污染物中,药物数量最多,其次是农药和城市污染物,极性化合物和表面活性剂均无检出。通过计算各物质在所有自来水样品中的检出率,发现 100%检出的物质共有 32 种,包括 11 种农药、11 种药物和 10 种城市化合物 (表 3-2)。检出率在 80~99%的有 13 种物质,50~79% (17 种),1~49% (12 种)。

表 3-2 水样中检出率 100%的物质信息表

物质	中文名	分类	CAS	结构式
BBP	邻苯二甲酸丁苄酯	城市污染物	84-69-5	C ₁₆ H ₂₂ O ₄
Bendiocarb	恶虫威	农药	22781-23-3	C ₁₁ H ₁₃ NO ₄
Bezafibrate	苯扎贝特	药物	41859-67-0	C ₁₉ H ₂₀ ClNO ₄
Bupropion	丁氨苯丙酮	药物	34911-55-2	C ₁₃ H ₁₈ ClNO
DEHP	邻苯二甲酸二异辛酯	城市污染物	117-81-7	C ₂₄ H ₃₈ O ₄
DEP	邻苯二甲酸二乙酯	城市污染物	84-66-2	C ₁₂ H ₁₄ O ₄
Diclofenac	双氯芬酸	药物	15307-86-5	C ₁₄ H ₉ Cl ₂ NO
DMP	邻苯二甲酸二甲酯	城市污染物	131-11-3	C ₁₀ H ₁₀ O ₄
DNBP	邻苯二甲酸二丁酯	城市污染物	84-74-2	C ₁₆ H ₂₂ O ₄
Ethion	乙硫磷	农药	563-12-2	C ₉ H ₂₂ O ₄ P ₂ S ₄
Flutamide	氟他胺	药物	13311-84-7	C ₁₁ H ₁₁ F ₃ N ₂ O ₃
Isoproturon	异丙隆	农药	34123-59-6	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O
Ketoprofen	酪洛芬	药物	22071-15-4	C ₁₆ H ₁₄ O ₃
Linuron	利谷隆	农药	330-55-2	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂
Mefenamic acid	甲灭酸	药物	61-68-7	C ₁₅ H ₁₅ NO ₂
Metalaxyl	甲霜灵	农药	57837-19-1	C ₁₅ H ₂₁ NO ₄
Metamitron	苯嗪草酮	农药	41394-05-2	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O
Metoprolol acid	美托洛尔酸	药物	56392-14-4	C ₁₄ H ₂₁ NO ₄
Metribuzin	赛克津	农药	21087-64-9	C ₈ H ₁₄ N ₄ OS
Pentoxifylline	己酮可可碱	药物	6493-05-6	C ₁₃ H ₁₈ N ₄ O ₃
Perfluorobutanoic acid	七氟丁酸	城市污染物	375-22-4	C ₄ HF ₇ O ₂
Pioglitazone	吡格列酮	药物	111025-46-8	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O ₃ S
Pirimicarb	抗蚜威	农药	23103-98-2	C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₂
Propanil	敌稗	农药	709-98-8	C ₉ H ₉ Cl ₂ NO
Risperidone	利培酮	药物	106266-06-2	C ₂₃ H ₂₇ FN ₄ O ₂
Ropinirole	罗匹尼罗	药物	91374-21-9	C ₁₆ H ₂₄ N ₂ O
TBEP	磷酸三(2-丁氧基)乙酯	城市污染物	78-51-3	C ₁₈ H ₃₉ O ₇ P
TBP	磷酸三丁酯	城市污染物	126-73-8	C ₁₂ H ₂₇ O ₄ P
TCEP	磷酸三(2-氯乙基)酯	城市污染物	115-96-8	C ₆ H ₁₂ Cl ₃ O ₄ P
TDCPP	磷酸三(1,3-二氯-2-丙基)酯	城市污染物	13674-87-8	C ₉ H ₁₅ Cl ₆ O ₄ P
Thiamethoxam	噻虫嗪	农药	153719-23-4	C ₈ H ₁₀ ClN ₅ O ₃ S
Trifloxystrobin	肟菌酯	农药	141517-21-7	C ₂₀ H ₁₉ F ₃ N ₂ O ₄

3.3.2. 可疑物质定量分析

根据定量数据计算各个点位中检出物质的总浓度 (图 3-3), 其中水源水 SW 中物质含量最多, 随着水处理工艺的进行, 物质总浓度不断减小。TWC 点位作为二次加氯点, 在二次氯化消毒后, 物质浓度有所减小, 与文献报道结果相一致。



图 3-3 各点位污染物总浓度情况

图 3-4 给出了检出物质在三种水样中的浓度分布情况。ABC 分别代表了药物、农药和城市污染物。由图可以看出, 大部分污染物的浓度在 10ng/L 以下, 仅有少量物质浓度 50ng/L 以上。且对于这三类水而言, 饮用水中物质的含量普遍较低。具体浓度检出情况详见附表。

在所有检出的物质中, 有 12 种物质的去除率超过 50%, 得到了有效的去除。这 12 种物质包括 5 种药物、4 种城市化合物和 3 种农药。其中邻苯二甲酸丁苄酯 (BBP) 的去除率最高, 可达 91.2%。此外, 有 19 种物质去除率低于 20%, 药物种类和农药物质种类相同, 均为 8 种, 城市污染物仅有 3 种。

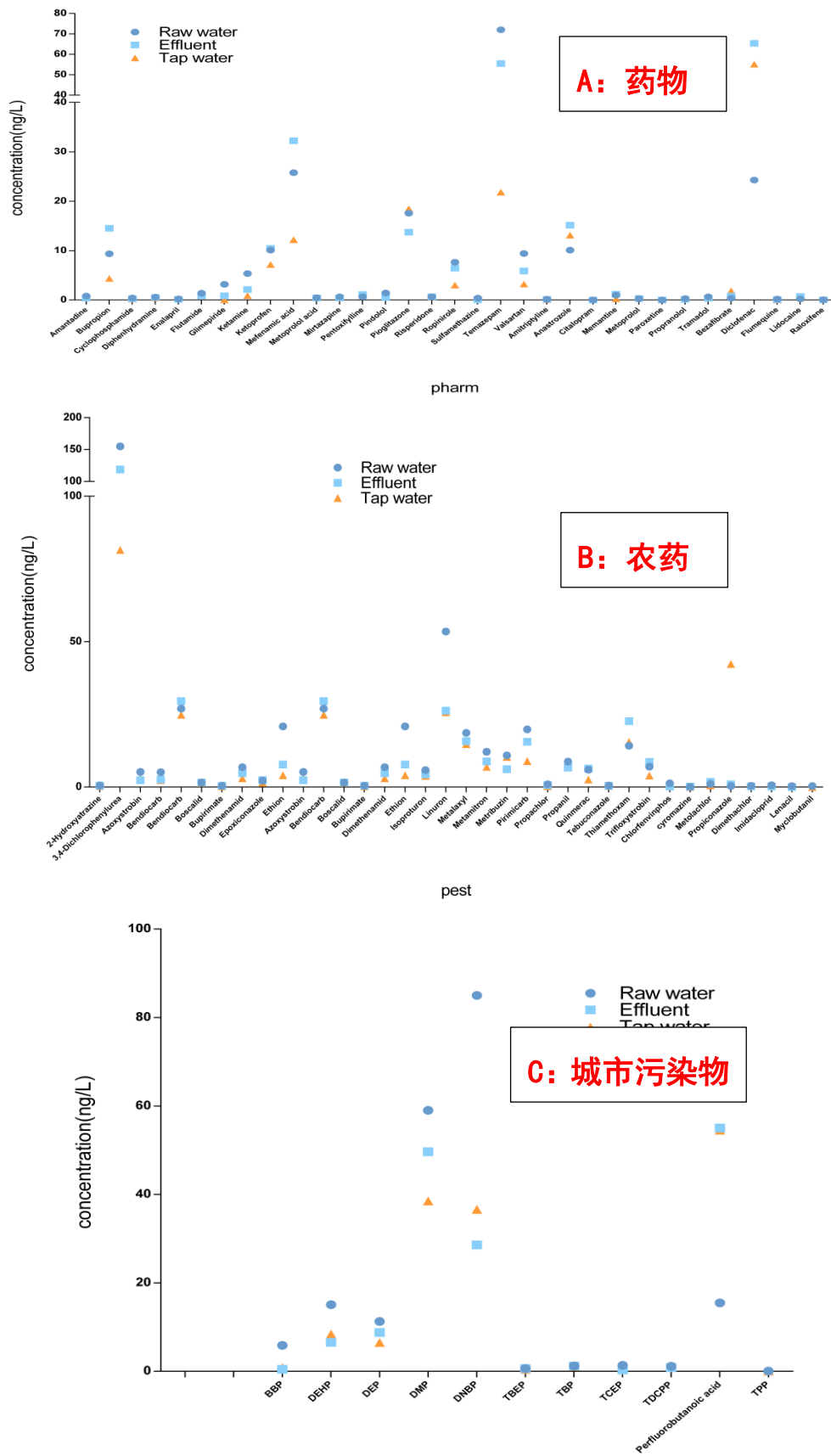


图 3-4 各类物质在饮用水厂出水进水及饮用水中浓度分布情况

3.4. 风险评估

对于检出的 74 种物质，通过查找文献及网站信息，计算求得各物质的饮用水当量水平 DWEL，进而得到风险商 RQs，如表 3-3：

表 3-3 74 种检出物质的风险商值

物质	分类	检出率%	自来水中最大 检出浓度 ng/L	DWEL ug/L	毒性数据来源	RQ
Ropinirole	药物	100.00	13.27	3.57E-03	Therapeutic dose	3.72E+00
Anastrozole	药物	91.67	15.15	4.76E-03	Therapeutic dose	3.18E+00
Temazepam	药物	66.67	84.90	3.57E-02	Therapeutic dose	2.38E+00
Pioglitazone	药物	100.00	69.95	7.14E-02	Therapeutic dose	9.79E-01
Glimepiride	药物	75.00	2.50	4.76E-03	Therapeutic dose	5.25E-01
Memantine	药物	50.00	2.95	2.38E-02	Therapeutic dose	1.24E-01
Montelukast	药物	16.67	2.65	4.76E-02	Therapeutic dose	5.56E-02
Loperamide	药物	16.67	0.75	1.90E-02	Therapeutic dose	3.92E-02
Valsartan	药物	91.67	14.47	3.81E-01	Therapeutic dose	3.80E-02
Risperidone	药物	100.00	0.67	1.80E-02	Therapeutic dose	3.71E-02
Mefenamic acid	药物	100.00	69.05	2.38E+00	Therapeutic dose	2.90E-02
Perfluorobutanoic acid	城市污染物	100.00	148.40	5.30E+00	EU Panel	2.80E-02
Pindolol	药物	91.67	0.97	4.76E-02	Therapeutic dose	2.05E-02
Ketamine	药物	91.67	4.37	3.33E-01	Therapeutic dose	1.31E-02
Cyclophosphamide	药物	75.00	0.31	2.60E-02	CSF	1.19E-02
Bisoprolol	药物	66.67	0.23	2.38E-02	Therapeutic dose	9.61E-03

物质	分类	检出率%	自来水中最大 检出浓度 ng/L	DWEL ug/L	毒性数据来源	RQ
Mirtazapine	药物	75.00	0.62	7.14E-02	Therapeutic dose	8.74E-03
Diclofenac	药物	100.00	107.30	1.70E+01	Therapeutic dose	6.31E-03
Ziprasidone	药物	16.67	1.09	1.90E-01	Therapeutic dose	5.72E-03
Flutamide	药物	100.00	6.54	1.19E+00	Therapeutic dose	5.49E-03
DEHP	城市污染物	100.00	11.15	4.00E+00	CalEPA MCL	2.79E-03
Raloxifene	药物	33.33	0.72	2.86E-01	Therapeutic dose	2.53E-03
Metoprolol acid	药物	100.00	0.75	4.76E-01	Therapeutic dose	1.58E-03
Metoprolol	药物	83.33	0.54	4.20E-01	Therapeutic dose	1.30E-03
Amantadine	药物	66.67	1.15	9.52E-01	Therapeutic dose	1.21E-03
Ethion	农药	100.00	16.49	1.40E+01	ATSDR MRL	1.18E-03
Tramadol	药物	50.00	1.09	9.52E-01	Therapeutic dose	1.14E-03
Bupropion	药物	100.00	31.81	4.20E+01	VSD	7.57E-04
Paroxetine	药物	50.00	0.06	9.52E-02	Therapeutic dose	6.30E-04
Ketoprofen	药物	100.00	20.59	3.30E+01	Therapeutic dose	6.24E-04
TCEP	城市污染物	100.00	0.90	1.80E+00	EPA SF	4.99E-04
Enalapril	药物	58.33	0.82	1.70E+00	Therapeutic dose	4.81E-04
Bendiocarb	农药	100.00	33.10	1.40E+02	JMPR ADI	2.36E-04
Diphenhydramine	药物	75.00	0.77	4.20E+00	Therapeutic dose	1.84E-04
Pentoxifylline	药物	100.00	2.51	2.10E+01	VSD	1.20E-04
Propiconazole	农药	75.00	258.40	2.45E+03	JMPR ADI	1.05E-04
Citalopram	药物	75.00	0.04	3.40E-01	Therapeutic dose	1.04E-04
Thiamethoxam	农药	100.00	26.12	3.50E+02	EU Panel	7.46E-05
Chlorfenvinphos	农药	41.67	1.21	1.75E+01	JMPR ADI	6.94E-05
Propanil	农药	100.00	9.95	1.75E+02	EPA RfD	5.69E-05
DMP	城市污染物	100.00	114.25	2.80E+03	NOAEL/LOAEL	4.08E-05

物质	分类	检出率%	自来水中最大 检出浓度 ng/L	DWEL ug/L	毒性数据来源	RQ
Pirimicarb	农药	100.00	26.39	7.00E+02	JMPR ADI	3.77E-05
Propranolol	药物	50.00	0.42	1.30E+01	Therapeutic dose	3.24E-05
Linuron	农药	100.00	43.00	1.75E+03	EU Panel	2.46E-05
Lidocaine	药物	83.33	0.77	3.50E+01	Therapeutic dose	2.19E-05
Bezafibrate	药物	100.00	1.46	6.70E+01	Therapeutic dose	2.18E-05
Azoxystrobin	农药	91.67	7.62	3.50E+02	EU Panel	2.18E-05
Sulfamethazine	药物	50.00	0.47	2.20E+01	Therapeutic dose	2.14E-05
DNBP	城市污染物	100.00	72.70	3.50E+03	EPA RfD	2.08E-05
Amitriptyline	药物	50.00	0.23	1.30E+01	Therapeutic dose	1.74E-05
Trifloxystrobin	农药	100.00	14.40	1.40E+03	JMPR ADI	1.03E-05
Metalaxyl	农药	100.00	21.52	2.10E+03	EPA RfD	1.02E-05
TDCPP	城市污染物	100.00	1.69	1.90E+02	CalEPA NSRL	8.89E-06
Quinmerac	农药	91.67	11.09	1.75E+03	EU Panel	6.34E-06
Metamitron	农药	100.00	11.01	1.75E+03	EU Panel	6.29E-06
Flumequine	药物	16.67	0.20	3.50E+01	NOAEL/LOAEL	5.60E-06
Metribuzin	农药	100.00	18.41	3.50E+03	EU Panel	5.26E-06
BBP	城市污染物	100.00	2.93	6.00E+02	CalEPA NSRL	4.89E-06
Propachlor	农药	91.67	1.48	4.55E+02	EPA RfD	3.25E-06
Dimethenamid	农药	91.67	7.08	2.45E+03	JMPR ADI	2.89E-06
cyromazine	农药	16.67	0.43	3.50E+02	EU Panel	1.24E-06
Boscalid	农药	91.67	1.64	1.40E+03	JMPR ADI	1.17E-06
Dimethachlor	农药	8.33	0.78	7.00E+02	EU Panel	1.12E-06
Isoproturon	农药	100.00	6.06	7.00E+03	EU Panel	8.65E-07
Metolachlor	农药	83.33	3.96	5.25E+03	EPA RfD	7.54E-07
TBP	城市污染物	100.00	2.05	2.80E+03	ATSDR MRL	7.33E-07

物质	分类	检出率%	自来水中最大 检出浓度 ng/L	DWEL ug/L	毒性数据来源	RQ
TBEP	城市污染物	100.00	1.51	3.20E+03	ATSDR MRL	4.73E-07
Tebuconazole	农药	91.67	0.48	1.05E+03	JMPR ADI	4.53E-07
Flufenoxuron	农药	25.00	0.63	1.40E+03	JMPR ADI	4.51E-07
Imidacloprid	农药	8.33	0.64	1.75E+03	EU Panel	3.67E-07
Bupirimate	农药	58.33	0.49	1.75E+03	EU Panel	2.82E-07
DEP	城市污染物	100.00	18.21	2.10E+05	ATSDR MRL	8.67E-08
TPP	城市污染物	8.33	0.12	7.00E+03	ATSDR MRL	1.70E-08
Lenacil	农药	8.33	0.04	3.50E+03	EU Panel	1.20E-08

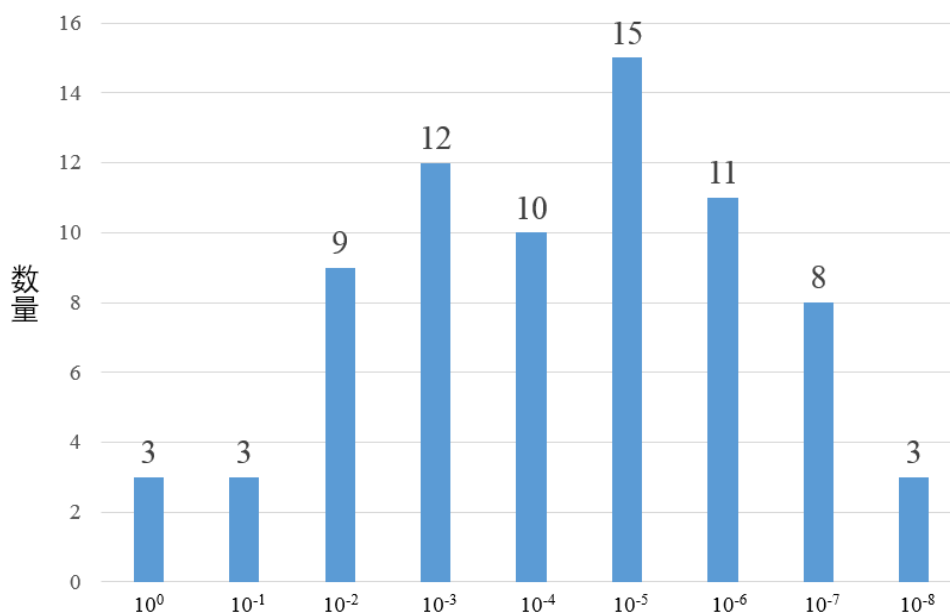


图 3-5 风险商分布情况

风险商分布情况可以看出, 有 6 种物质的 RQ 大于 0.1, 具有潜在的风险。这 6 种物质均为药物类物质, 分别是罗匹尼罗 Ropinirole (3.72)、阿纳托唑 Anastrozole (3.18)、羟基安定 Temazepam (2.38)、吡格列酮 Pioglitazone (0.98)、格列美脲 Glimepiride (0.52) 和美金刚 Memantine (0.12)。根据 LiverTox 网站公布的信息, 阿纳托唑、罗匹尼罗、羟基安定、吡格列酮和美金刚均具有一定的肝毒性, 根据 Drugbank 的毒性数据显示, 羟基安定和格列美脲均可以和蛋白质结合, 从而影响人体健康。

各点位饮用水中可检出污染物的健康风险波动较大, 无论是水处理工艺还是管网运输过程中的风险都具有显著差异, 风险商为 3.95 到 7.39, 显著大于 1, 因此其风险不容忽视。高风险物质的浓度变化是造成点位总风险变化的主要原因。六种高风险物质罗匹尼罗、阿纳托唑、羟基安定、吡格列酮、格列美脲和美金刚对各点位风险的总体贡献可达 97-99%。

3.5. 致病菌分布研究

3.5.1. 管网自来水三次采样中潜在致病菌相对丰度分布（种水平）

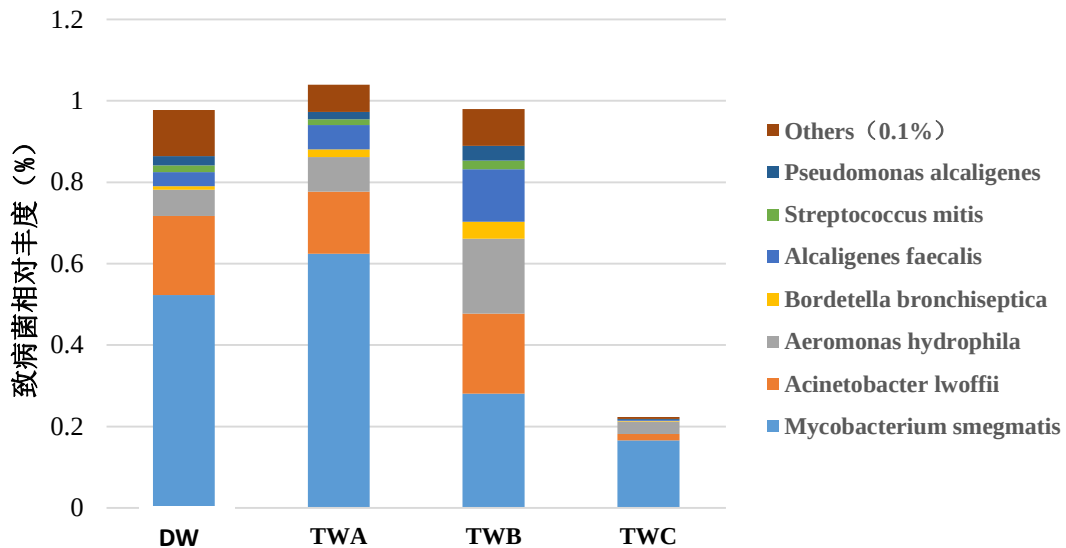


图 3-6 管网自来水第一次采样中潜在致病菌相对丰度分布情况示意图

(潜在致病菌相对丰度= (致病菌 OTU 条数/总细菌 OTU 条数))

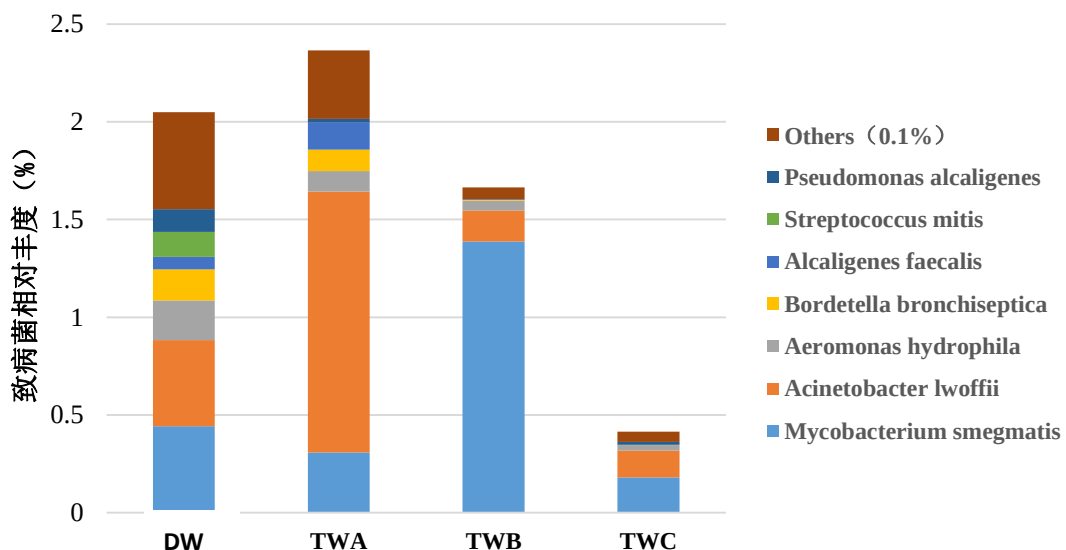


图 3-7 管网自来水第二次采样中潜在致病菌相对丰度分布情况示意图

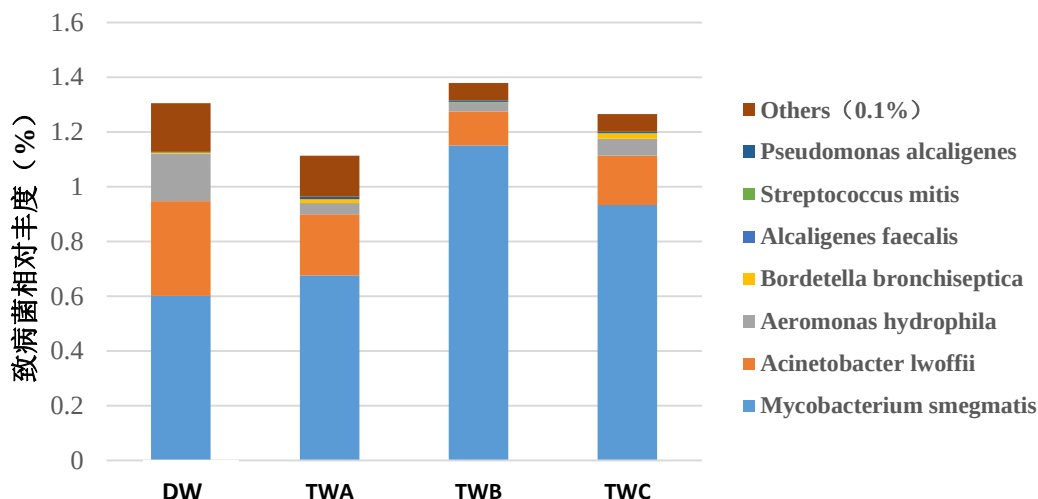


图 3-8 管网自来水第三次采样中潜在致病菌相对丰度分布情况示意图

管网自来水样品采集包括：氯化消毒出水（DW）、TWA、TWB、TWC（沿配水管网分布，分别距离饮用水厂 5km、10km 和 30km）由于采样时间的差异，每个地点的三次结果中潜在致病菌相对丰度数值存在一定的差异性。三次过程中检出的相对丰度处于 0.1% 以上的潜在致病菌种在图中显示，分别为耻垢分枝杆菌，鲁氏不动杆菌，嗜水气单胞菌，带化红球菌，大肠杆菌，红串红球菌，干燥棒状杆菌，支气管炎博德特菌，布氏弓形菌，粪产碱杆菌。由图 3-6、图 3-7、图 3-8 显示，潜在致病菌的总丰度不超过 5%。在这些潜在致病菌中，耻垢分枝杆菌与鲁氏不动杆菌之和占了 40% 以上，是明显的优势菌种。耻垢分枝杆菌通常被认为是非致病的，但是有文献指出在在在一些很罕见的例子中，也会导致疾病。鲁氏不动杆菌是一种人类致病菌，特别对于免疫功能不全的病人易导致尿路感染。另外鲁氏不动杆菌还与某类肠胃炎相关，嗜水气单胞菌对许多生物都有危害，因为其会产生气单胞菌溶素，会造成组织损伤。

3.5.2. 饮用水厂处理过程三次采样中潜在致病菌相对丰度变化

饮用水厂处理过程的样品采集包括：水源水（SW），沉淀池出水（ES），滤池出水（FW），以及氯化消毒出水（DW）。经过沉淀与过滤，潜在致病菌的相对丰度变化在三次中并不一致，但变化不大。但是经过氯化消毒(s)处理后可以发现潜

在致病菌相对丰度在达到最高 (2%-4%), 很有可能是氯化消毒去除了大量的非致病型细菌, 而对于潜在致病菌去除较弱。

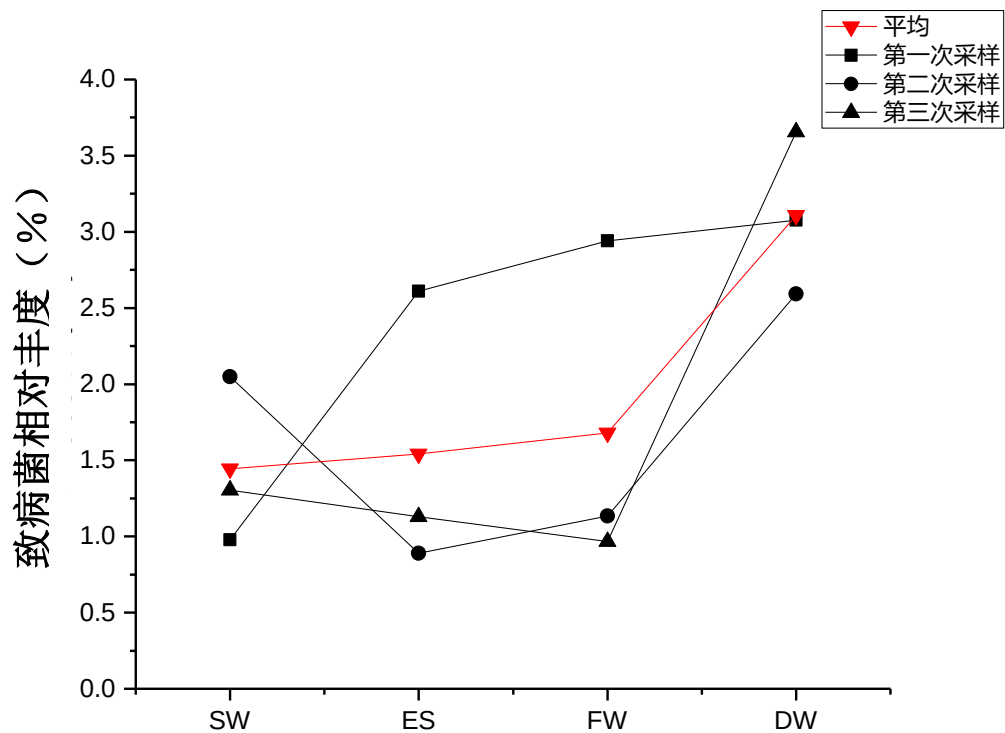


图 3-9 水处理过程中潜在致病菌相对丰度变化情况示意图

(潜在致病菌相对丰度= (致病菌 OTU 条数/总细菌 OTU 条数))

4. 结论与展望

4.1. 研究结论

本研究围绕如何建立有效的科学方法识别饮用水中的非常规化学/生物风险因子并加以评估这一化学问题, 建立了高回收率的前处理技术、高通量的非目标/可疑污染物鉴定技术与致病菌识别方法, 并进而形成了可靠的风险因子识别策略。

在此基础上, 针对 CB 水厂不同工艺段及管网的 7 个点位进行了 3 次采样, 评价了高检出有机污染物与致病菌的分布特征与潜在风险。

结果表明, 饮用水中共检出 74 种有机污染物, 其中药物类及农药类物质占总量的 85% 以上。酪洛芬、磷酸三丁酯和环磷酰胺为高响应、高检出污染物, 七氟丁酸、双氯芬酸、丙环唑和酞酸二甲酯等为高浓度污染物, 罗匹尼罗、阿纳托唑、羟基安定、吡格列酮、格列美脲和美金刚为高风险物质。耻垢分枝杆菌, 鲁氏不动杆菌, 嗜水气单胞菌等为主要致病菌, 存在一定的健康风险。4 个饮用水点位中, DW 点位污染物总风险最高, 风险商总和可达 7.08, 同时致病微生物相对丰度也达到最高, 具有不可忽视的风险。水处理过程后污染物的风险变化不大, 然而在随管网输送过程中, 点位的总风险逐渐降低, 6 种高风险物质对总风险的贡献率可达 97% 以上。对于致病菌而言, 在经过氯化消毒后, 相对丰度达到最高值, 但是随着管网输送, 其丰度也随之不断减小。

4.2. 未来展望

本研究通过酸碱度调节和吸附材料筛选建立的水体非目标污染物前处理方法, 相比传统技术总峰面积提高两倍以上, 实现了水样中有机污染物的高效富集。基于 LC-QTOF 建立了化学风险因子层级筛选方法, 实现了高检出高响应污染物的快速筛选与结构鉴定。利用基因组技术建立了致病菌匹配方法, 解决了微生物风

险因子高通量识别问题。

本研究基于上述高回收率的前处理技术、高通量的非目标/可疑污染物鉴定技术与致病菌识别方法,最终形成了可靠的风险因子识别策略,能够快速、有效、系统地鉴别饮用水中的风险因子,为污染控制与饮用水安全管理提供了技术参考与数据支撑。该策略可进一步应用于污水、地表水及地下水的风险物质的识别、风险评估及风险溯源,为水环境的监测与管理提出参考性意见。

当然本研究也存在着一些不足,如质谱数据库的局限性,导致很多物质在确认分子式且找到可疑结构式的基础上,在数据库中无法找到对应质谱图进行对比验证,而购买标样验证则相对成本较高且耗时耗力。此外,在物质鉴定过程中,一些物质仅能确认分子式,而找不到具体结构式,故部分高检出高响应物质可能未能做到有效鉴别。如何加强高通量非目标物质鉴别的效率,应成为未来努力的方向。

本次研究的开展,从课题构思、实验开展、数据处理到报告撰写这一整个过程中,我们学到了很多。一方面,我们学到了很多化学及生物的知识,掌握了很多实验技能,如固相萃取技术、微生物 DNA 的提取等,拓宽了视野和知识面,培养了学习科学知识及进行科学研究的兴趣与热情;另一方面,我们的个人能力也得到了很大的提升,比如如何在有限的时间内,学会设计实验、安排实验进程、进行成员分工,这对时间管理能力、团队协作能力、组织能力和创新能力都是非常好的锻炼。尽管我们在进行研究的过程中多次遇到挫折,但我们都没有轻言放弃,而是坚持了下来,最终也得到了一定的成果。在构建高通量非目标分析方法的时候,由于数据量巨大且过程复杂,耗费的时间很长,但我们从懵懵懂懂到现在,已经可以熟练的运用多个软件和数据库,最终得以实现对高检出高响应物质的有效鉴别。

5. 参考文献

- [1] European Union. Drinking water Stand[S]. Council Directive 98/83/EC on the quality of water intended for human consumption. Adopted by the council ,1998.
- [2] 俄罗斯卫生部, 俄罗斯国家饮用水卫生标准[S]. 2002.
- [3] World Health Organization. Guidelines for Drinking-water Quality[S].3td ed. Geneva, 2004
- [4] US EPA. Drinking Water stands and Health Advisories [S] .2004.
- [5] De Jesus Gaffney V, Almeida C M M, Rodrigues A, et al. Occurrence of pharmaceuticals in a water supply system and related human health risk assessment[J]. Water research, 2015, 72: 199-208.
- [6] Benotti M J, Trenholm R A, Vanderford B J, et al. Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in US drinking water[J]. Environmental science & technology, 2008, 43(3): 597-603.
- [7] Stackelberg P E, Gibs J, Furlong E T, et al. Efficiency of conventional drinking-water-treatment processes in removal of pharmaceuticals and other organic compounds[J]. Science of the Total Environment, 2007, 377(2): 255-272.
- [8] Leung H W, Jin L, Wei S, et al. Pharmaceuticals in tap water: human health risk assessment and proposed monitoring framework in China[J]. Environmental health perspectives, 2013, 121(7): 839.
- [9] 李松, 饶竹, 宋淑玲. 全国地下水调查中 12 种半挥发性必检组分的测定[J]. 岩矿测试, 2008, 27(2):91-94.
- [10] 杨利奎, 陈亚妍. 水中痕量有机污染物的 XAD 树脂吸附浓缩法[J]. 国外医学: 卫生学分册, 1991, 18(1): 19-21.
- [11] Chiron S, Fernandez Alba A, Barcelo D. Comparison of on-line solid-phase disk extraction to liquid-liquid extraction for monitoring selected pesticides in environmental waters[J]. Environmental science & technology, 1993, 27(12): 2352-2359.
- [12] Masque N, Marcé R M, Borrull F. New polymeric and other types of sorbents for solid-phase extraction of polar organic micropollutants from environmental

- water[J]. Trac trends in analytical chemistry, 1998, 17(6): 384-394.
- [13] Grung M, Lichtenthaler R, Ahel M, et al. Effects-directed analysis of organic toxicants in wastewater effluent from Zagreb, Croatia[J]. Chemosphere, 2007, 67(1): 108-120.
- [14] Zhao J L, Ying G G, Wang L, et al. Determination of phenolic endocrine disrupting chemicals and acidic pharmaceuticals in surface water of the Pearl Rivers in South China by gas chromatography–negative chemical ionization–mass spectrometry[J]. Science of the total environment, 2009, 407(2): 962-974.
- [15] Stalter D, Peters L I, O'Malley E, et al. Sample Enrichment for Bioanalytical Assessment of Disinfected Drinking Water: Concentrating the Polar, the Volatiles, and the Unknowns[J]. Environmental science & technology, 2016, 50(12): 6495-6505.
- [16] Jeong Y, Schäffer A, Smith K. Equilibrium partitioning of organic compounds to OASIS HLB® as a function of compound concentration, pH, temperature and salinity[J]. Chemosphere, 2017, 174: 297-305.
- [17] Castro-Perez J, Plumb R, Liang L, et al. A high-throughput liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for screening glutathione conjugates using exact mass neutral loss acquisition[J]. Rapid communications in mass spectrometry, 2005, 19(6): 798-804.
- [18] Hernández F, Pozo Ó J, Sancho J V, et al. Strategies for quantification and confirmation of multi-class polar pesticides and transformation products in water by LC–MS 2 using triple quadrupole and hybrid quadrupole time-of-flight analyzers[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2005, 24(7): 596-612.
- [19] Gyenge-Szabó Z, Szoboszlai N, Frigyes D, et al. Monitoring of four dipyrone metabolites in communal wastewater by solid phase extraction liquid chromatography electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2014, 90: 58-63.
- [20] Creusot N, Budzinski H, Balaguer P, et al. Effect-directed analysis of endocrine-disrupting compounds in multi-contaminated sediment: identification of novel ligands of estrogen and pregnane X receptors[J]. Analytical and bioanalytical chemistry, 2013, 405(8): 2553-2566.

- [21] Kind T, Fiehn O. Seven golden rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry[J]. BMC bioinformatics, 2007, 8(1): 105.
- [22] Snyder S A, Stanford B D, Bruce G M, et al. Identifying hormonally active compounds, pharmaceuticals, and personal care product ingredients of health concern from potential presence in water intended for indirect potable reuse[J]. Final Report. Alexandria (VA), USA: Water Reuse Research Foundation, 2010.

6. 贡献说明

	毕霁麟	刘静怡
采样		
采样前准备	✓ 联系饮用水厂工作人员	✓ 准备采样及实验材料
水样的采集	✓ 采集水样	✓ 采集水样
化学分析		
化学分析前处理方法的构建	✓ 摸索水样 pH 调节、固相萃取柱的选择等前处理条件	
建立可疑物质质谱指纹数据库		✓ 购买标样、配制混标溶液、建立质谱方法
建立层级风险评估中 DWEL 值决策树	✓ 查找相关数据并整理 DWEL 值的计算方法	✓ 查找相关数据并整理 DWEL 值的计算方法
水样的化学前处理及仪器测试	✓ 前处理及仪器测试	✓ 前处理及仪器测试
高通量非目标物质方法构建及高检出高响应物质的筛查	✓ 构建和筛查	✓ 构建和筛查
有机污染物的检出与定量数据分析	✓ 检出与分析	
有机污染物的风险评估		✓ 风险评估
分子生物学实验		
生物分析前处理	✓ 水样过膜, DNA 提取等	✓ 水样过膜, DNA 提取等
检测 DNA 浓度	✓ 超微量紫外分光光度计	
检测 DNA 质量		✓ 琼脂糖凝胶电泳
拼接、质控、OTU 确定、进化分类注释和多样性分析等	✓ 分析与计算	
构建致病菌数据库并计算致病菌相对丰度		✓ 分析与计算

7. 致谢

在本项目研究中得到了南京大学张徐祥教授与史薇副教授课题组的极大支持,感谢刘鹏博士与沈艳红硕士手把手、不厌其烦地带我们去采样,教我们掌握基础的研究技术手段和大型仪器设备的使用方法,指导我们用更为科学的语言进行表述。如此,我们才能顺利完成本研究工作。同时还使我们了解到了我国水厂水安全保障所面临的困难与瓶颈技术,也明白了很多待人接物的道理。

南京外国语学校的曹志兵老师、陈静老师不仅仅是我们的课堂老师,也是我们参加化学竞赛的指导老师,更是在化学STEM项目中鼓励我们进行更进一步的探索。本项目的选题也是两位老师、南京大学的研究人员以及我们共同多次商讨后的结果。

在此,我们研究小组成员向给予我们帮助的所有老师和同学们表示崇高的敬意和衷心的感谢。

8. 参赛队员简历

队员一：毕霁麟 (Daniel Bi)，南京外国语学校高二

姓名：毕霁麟 (Daniel Bi)

性别：男

出生日期：2000 年 12 月

就读学校

2007.09--2008.06 Eagle View Elementary School, Fairfax, VA

2008.09--2010.06 南京市琅琊路小学

2010.09--2013.06 南京市琅琊路小学分校 (汉江路小学)

2013.09--2016.06 南京市外国语学校初中

2013.09 至今 南京市外国语学校高中

获得荣誉

成绩优秀，长期以来，对科研活动充满兴趣，参加了各类学科竞赛并取得优秀成绩。特别对化学、环境等学科充满兴趣，利用课余时间参与各类科研活动，撰写科学论文并得到国际会议采纳。

2013 年 江苏省青少年信息学奥林匹克比赛 (小学组) 一等奖

2014 年 江苏省机器人大赛 (初中组) 二等奖

2016 年 ASDAN 国际可持续发展工程奥林匹克竞赛 (ISWEEEP) 选拔赛全国冠军

2016 年 英国皇家化学学会新星挑战赛 (RSC3) 区域金奖

2017 年 第六届全国语言学奥林匹克竞赛二等奖

2017 年 中国大智汇创新研究挑战赛全国一等奖

2017 年 31 届中国化学奥林匹克竞赛 (江苏赛区) 省一等奖

队员二：刘静怡，南京外国语学校高二

姓名：刘静怡

性别：女

出生日期: 2001 年 5 月

就读学校

2007.09--2013.06 南京市拉萨路小学

2013.09--2016.06 南京市外国语学校初中

2013.09 至今 南京市外国语学校高中

获得荣誉

成绩优秀, 初中到高中以来一直名列前茅, 中考全校第一。受家庭的熏陶, 对化学和生物特别感兴趣。学习之余在南京大学和南京医科大学积极参与与化学和生物相关的科研兴趣活动。

2014 年 江苏省四好少年

2015 年 南京市中学生作文大赛一等奖

2016 年 南京市三好学生

2017 年 中国大智汇创新研究挑战赛全国一等奖

2017 年 第四届国际青少年创新设计大赛全国二等奖

9. 指导教师简介

指导教师一：曹志兵

姓名：曹志兵，南京外国语学校

指导学科：化学

获得荣誉：中学化学高级教师。多年担任重点班的教学任务，并担任班主任、教研组长等工作。曾获得过“南京市普通中学高中学科教学先进个人”、“南京市学科带头人”等荣誉称号，是南京市化学核心组成员，有丰富的中学教学经验，培养了多名优秀的年轻教师。指导诸多学生在化学奥林匹克竞赛中获奖，其中申峻嵘同学获得 1998 年全国中学生化学冬令营第 5 名、2015 年成一鸣同学获得江苏省化学竞赛第一名。在省级以上期刊发表论文 30 多篇。

指导教师二：陈静

姓名：陈静，南京外国语学校

指导学科：化学

获得荣誉：中学化学一级教师。多年担任中学化学的教学任务，并担任班主任、备课组长等工作。在江苏省、南京市等开设多节研究课与讲座，参与多项科研课题，并在全国核心期刊以及省级以上期刊上发表多篇论文。在多项教学竞赛中获奖，曾获“南京市优秀青年教师”、“南京市普通高中教学先进个人”以及“南京外国语学校第八届校学科带头人”等荣誉称号，所带班级曾获“南京市教育局直属学校先进团(总)支部”荣誉称号。是南京外国语学校化学 STEM 项目的核心人员。