基于定位栏试验的奶牛粪便中雌激素含量特征

李 艳[1,2],潘 杰[1],梁紫薇[2,3],胡嘉梧[2],刘姜艳[1,2],贺德春[2*],李廷真[1**] (1.重庆三峡学院,三峡库区水环境演变与污染防治重庆市重点实验室,重庆 404130；2.生态环境部华南环境科学研究所,广东 广州 510530；3.仲恺农业工程学院,广东 广州 510225)

摘要：为探究奶牛粪便中雌激素含量特征,采用定位栏试验收集奶牛粪便样,采用超高效液相色谱串联(UPLC-MS/MS)法对粪便中 4 种天然雌激素(雌酮;17α-雌二醇,17β-雌二醇,雌三醇)和 2 种人工合成雌激素(17α-炔雌醇,己烯雌酚)的含量进行测定,结果表明:6 种雌激素的检出率居于 8.33%~98.89%之间,4 种天然雌激素中,除雌三醇检出率为 8.33%外,其余 3 种的检出率均在 90%以上;2 种人工合成雌激素检出率分别为 52.22%(17α-炔雌醇)和 64.44%(己烯雌酚);6 种雌激素总浓度范围为 1.51~658.98μg/kg(干重),总雌激素活性当量浓度范围为 3.76~478.50μg/kg(干重).不同生长阶段奶牛粪便中雌激素含量存在显著差异,6 种雌激素总含量排序为泌乳牛>犊牛>育成牛,其中位值分别为 79.21,47.20,25.72μg/kg.不同季节采集的粪便样品中雌激素含量总体表现为冬季与春季相对较高,夏季和秋季相对较低,其中秋季粪便样品中 6 种雌激素含量显著低于其他季节. 养殖场粪便堆放场样品中雌激素总含量在 7.63~3921.92μg/kg 之间,显著高于通过定位栏试验采集的鲜粪中的雌激素含量.不同生长阶段、不同季节、不同采样点采集的牛粪样品中雌激素含量均存在较大差异,在开展奶牛养殖雌激素排放量调查及风险评估工作中,应充分考虑采样时间和采样点位的影响.

关键词：奶牛；粪便；雌激素；生长阶段；季节差异

中图分类号：X713,171.5 **文献标识码**：A **文章编号**：1000-6923(2022)01-0119-08

Characterizing the estrogen content in cow feces based on gestation crate experiment. LI Yan[1,2], PAN Jie[1], LIANG Zi-wei[2,3], HU Jia-wu[2], LIU Jiang-yan[1,2], HE De-chun[2*], LI Ting-zhen[1**] (1.Chongqing Key Laboratory of Water Environment Evolution and Pollution Control in Three Gorges Reservoir, Chongqing Three Gorges University, Chongqing 404130, China；2.South China Institute of Environmental Science, Ministry of Ecology and Environment, Guangzhou 510530, China；3.Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China). *China Environmental Science*, 2022,42(1)：119~126

Abstract：To explore characteristics of estrogen content in cow feces, fecal samples were collected from the gestation crates to quantify the contents of 4 natural estrogens (including estrone, 17α-estradiol, 17β-estradiol, estriol) and 2 synthetic estrogens (17α-ethinylestradiol, diethylstilbestrol) with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The results showed that the detection frequency (DF) of 6 estrogens ranged from 8.33% to 98.89%. The DF of detected natural estrogens was higher than 90%, except for estriol (8.33%); while the DF of synthetic estrogens were 52.22% and 64.44% for 17α-estradiol and diethylstilbestrol, respectively. The total content of 6 estrogens was in the range of 1.15~658.91μg/kg (dry weight, dw). The total estrogenic activity was equivalent to the content of 3.76~478.50μg/kg (dw). A significant difference in the total content (median) of 6 estrogens among different growth stages was observed in the order of: lactating cows (79.21μg/kg) > calves (47.20μg/kg) > heifers (25.72μg/kg). The content of estrogens in fecal samples demonstrate large seasonal variations: relatively higher in winter and spring than in summer and autumn andthe lowest concentration of 6 estrogens was observed in autumn. The total concentration of 6 estrogens in the feces collected from fecal stock dump ranged from 7.63 to 3921.92μg/kg which were significantly higher than that in fresh feces from gestation crate. Clearly, cow growth stage, sampling time (season) and sampling sites influenced the content of estrogens in cow feces, which should be fully considered in the investigation and risk assessment of estrogen emissions for cow breeding.

Key word：dairy cows；feces；estrogen；growth stage；seasonal variation

雌激素属于一类典型的内分泌干扰物质,主要由人类、动物通过尿液和粪便排泄到环境中[1].环境中雌激素在痕量浓度下(ng/L)即可干扰生物体内分泌系统,进而影响生物正常的生长、发育、生殖等过程,导致雌性动物性早熟及雄性动物雌性化等现象,具有极高的生态风险[2-5].随着畜禽养殖业的快速发

收稿日期：2021-05-31

基金项目：中央级公益性科研院所基本科研业务专项项目(PM-zx097-202104-121);三峡库区水环境演变与污染防治重庆高校市级重点实验室开放基金(WEPKL2019ZD-01,WEPKL2016XX-01);国家重点研发计划项目(2017YFD0800701)

* 责任作者，贺德春，研究员，hedechun@scies.org; 李廷真，教授，litingzhen@163.com

展,畜禽养殖对全球雌激素排放的贡献逐年增加[6].据测算,2014 年我国奶牛、肉牛和猪的雌激素排放量总和约为 50.5t[7];其中,通过畜禽粪便排入环境中的雌激素中约 90%源于奶牛和肉牛粪便[8],主要以雌酮(E1)、17α-雌二醇(17α-E2)、17β-雌二醇(17β-E2)和雌三醇(E3)等天然雌激素为主[9],还包括17α-炔雌醇(17α-EE2)和己烯雌酚(DES)等人工合成雌激素.由于雌激素的分布普遍性、毒性和持久性[10-11],畜禽粪便排放造成的环境污染问题及其生态健康风险不容忽视.

目前国内外在奶牛等主要畜禽粪污雌激素含量及周边环境雌激素污染特征等方面开展了大量研究[12-14].但关于粪便中雌激素含量的研究多数是基于单次采样或养殖场内平均布点混合采样而开展的,未能考虑畜禽不同生长阶段及不同季节排泄粪便中雌激素含量的差异[15-17].同时,由于这种采样方式不可避免导致粪便中混入了部分尿液,据此测定的粪便雌激素含量特征与实际情况可能存在较大差异,不利于科学准确地开展畜禽粪便中雌激素环境污染的治理与防控.本研究采用定位栏试验对不同生长阶段的奶牛开展 4 个季节采样监测,系统研究奶牛不同生长阶段、不同季节排放粪便中雌激素的含量与分布特征,以期为科学准确测算奶牛粪便雌激素排放量、制定合理的污染与风险防控对策等提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 试验地点与试验动物

本试验在四川省成都市某奶牛养殖场进行.试验奶牛分成乳牛、育成牛、犊牛 3 个饲养阶段,每个饲养阶段奶牛各选取 5 头开展定位栏试验.整个试验过程的饲料、饮水、环境与试验点常规饲养管理一致.

1.2 粪便收集

奶牛采用单头定位饲养,试验动物只能站立、蹲卧,不能转身,保证动物的粪尿不相互混合,地面铺设橡胶垫或用水泥地面,保障粪便能全量收集.

1.3 样品采集与保存

采样时间与频率:整个试验周期分 4 个季节进行,分别在 2018 年冬季、2019 年春季、夏季及秋季开展,每个季节连续监测 3d.

样品采集:每个定位栏每天分别定时收集试验奶牛的新鲜粪便,称重后混合均匀,采集 1 份样品,样品量不少于 500g;同时分别在奶牛场粪便堆放场中平均布点采集堆积一周左右的粪便样品,样品量不少于 500g;样品保存在-20℃冰箱中待测.

1.4 样品分析

粪便样品中雌激素的含量测定采用之前报道的分析方法[18].含水率依据《复混肥料中游离水含量的测定 真空烘箱法》(GB/T 8576-2010)[19]进行测定.

1.5 数据处理

1.5.1 雌激素活性 采用雌二醇当量 EEQ (17β-estradiol equivalents)表征雌激素活性,计算公式[20]如下:

$$EEQ_i = MEC_i \times EEF \quad (1)$$

式中: MEC_i 为雌激素 i 实测浓度,μg/kg; EEF 为雌二醇当量因子,17α-E2、17β-E2、E1、E3、DES、17α-EE2 对应的 EEF[21-22]分别为 0.125, 1, 0.59, 0.26, 8.0, 8.71.

1.5.2 雌激素日排泄量 奶牛粪便雌激素日排泄量可以通过粪便中检测到的雌激素浓度和平均日粪便产量来计算.每头奶牛雌激素的日粪便排泄量可通过以下公式[13]计算:

$$M_i = C_i \times C_g \times (1-W) \quad (2)$$

式中:M_i 是选定生长阶段通过每头奶牛每日粪便排泄的目标雌激素 i 的估计质量, μg/(d·头); C_i 是奶牛干粪便中雌激素的测定浓度,μg/kg; C_g 是选定生长阶段每头奶牛的新鲜粪便日产量,kg/d; W 代表新鲜粪便中含水率,%.

1.5.3 数据分析 采用 Excel 2016 整理数据,应用 IBM SPSS Statistics 20.0 中非参数检验(Kruskal-Wallis 检验)对样本数据进行显著性分析,利用 Origin pro 2018 进行作图.

2 结果与讨论

2.1 奶牛粪便中雌激素的含量特征

奶牛粪便中 6 种雌激素的检出率在 8.33%~98.89%之间(表 1),4 种天然雌激素中,除雌三醇检出率较低外(8.33%),其余 3 种雌激素(E1、17α-E2、17β-E2)的检出率均在 90%以上,2 种人工合成雌激素的检出率分别为 52.22%(17α-EE2)和 64.44% (DES),6 种雌激素总量检出范围为 1.51~658.98 μg/kg(干重).这与文献报道中奶牛粪便主要排泄 E1、17α-E2、17β-E2 相符(表 2).人工合成雌激素 DES 与 17α-EE2

常被用作激素类药物和饲料添加剂来提高动物养殖效益[23],本研究中 DES 与 17α−EE2 虽然检出浓度较低,但检出率均高于 50%,表明该养殖场可能存在使用人工合成雌激素的行为.

如图 1 所示,泌乳牛、犊牛、育成牛鲜粪中雌激素含量存在显著差异(P<0.05),其 6 种雌激素总浓度中位值依次为 79.21μg/kg(泌乳牛)、47.20μg/kg(犊牛)、25.72μg/kg(育成牛).各生长阶段奶牛粪便中的雌激素均以 E1、17α−E2、17β−E 为主.其中犊牛粪便中未检出合成雌激素,而 17α−E2 含量明显高于育成牛与泌乳牛.泌乳牛粪便中E1 含量中位值为 60.02μg/kg,占雌激素总含量的 76%,约为犊牛与育成牛粪便中 E1 含量的 3 倍. Tao 等[16]在犊牛、妊娠期奶牛、泌乳牛粪便样品中自由态雌激素仅检出 17β−E2,与本研究中各生长阶段粪便样品中 17β−E2 是同一数量级. Zheng 等[24]报道的美国一养殖场采集的新鲜奶牛粪便中雌激素素含量要远高于本研究.不同地区对于奶牛养殖场粪污处理方式存在差异,关于奶牛粪污中雌激素含量部分研究以液态或半液态肥料为主[25-27],有限的文章报道了奶牛粪便中雌激素含量.表 2 列出了已有研究报道的奶牛粪便中雌激素含量,不同研究报道的雌激素含量与雌激素种类差异较大,其主要原因可能与研究对象品种、生长阶段、饲养条件、样品采集方式等不同有关[28].

采用雌二醇当量(EEQ)表征雌激素活性.犊牛、育成牛、泌乳牛粪便雌激素雌二醇当量浓度中位值分别为 27.52,42.16,71.93μg/kg.如图 1 所示,育成牛与泌乳牛粪便中雌激素活性主要由 E1、17α−EE2、DES 贡献,占比为 16.71%~49.22%.其原因为 E1 是粪便样品中检出浓度最高的雌激素;虽然 17α−EE2、DES 检出含量相对较低,但其雌激素活性较高,排放到环境中对水生生物具有较强的危害性.根据 Partridge 等[29]研究,即使在短期的低剂量(1ng/L)暴露情况下,17α−EE2 也会通过影响雄性海龙对雌性海龙的吸引力来影响交配行为.与育成牛和泌乳牛相比,犊牛粪便中雌二醇当量浓度相对较低;因为犊牛粪便中未检出合成雌激素,检出的雌激素以 E1 和 17α−E2 为主,所以犊牛粪便样品的雌激素活性相对较低.虽然 17α−E2 雌激素活性较低,但 E2 异构体在不同的生物体内可能具有不同的雌激素活性.Huang 等[3]发现,17α−E2 在鱼类中的雌激素作用大于哺乳动物;而在青鳉鱼中,17α−E2 的雌激素活性大约是 17β−E2 的 30 倍.因此,由奶牛粪便中 17α−E2 造成的环境污染风险不容被忽视[30-31].

表 1　奶牛粪便中雌激素含量(μg/kg,干重)分布 (n=180)

Table 1　Estrogens concentrations (μg/kg, dw) in the feces of dairy cows (n=180)

项目	E3	17α−E2	17β−E2	E1	17α−EE2	DES	总和	ΣEEQ
最小值	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.51	3.76
最大值	<LOQ	88.65	36.68	517.51	9.98	4.75	658.98	478.50
均值	0.40	10.18	7.99	57.21	1.41	1.04	78.23	63.73
中位数	n.d.	4.15	6.18	25.72	<LOQ	<LOQ	37.43	30.75
检出率(%)	8.33	93.33	95.56	98.89	52.22	64.44		

注:n.d.表示未检出或低于检出限,按1/2检出限参与统计处理;<LOQ表示低于定量限,按1/2定量限参与统计处理;下同.

表 2　文献报道中奶牛粪便中雌激素含量(μg/kg)

Table 2　Literature review of estrogen concentrationsin the feces of dairy cow (μg/kg)

地区	样品类型	雌激素						参考文献
		E3	17α−E2	17β−E2	E1	17α−EE2	DES	
沈阳	犊牛粪便(n=9)	n.d.	−	3.3±0.7	n.d.	n.d.	−	[32]
安徽	青年期奶牛粪便(n=6)	−	61.91	172.61	160.7	−	−	[15]
	干奶期奶牛粪便(n=6)	−	429.61	239.4	412.82	−	−	[15]
深圳	妊娠期奶牛粪便(n=9)	n.d.	−	8.2±0.9	n.d.	n.d.	−	[16]
	泌乳牛粪便(n=9)	n.d.	−	6.1±2.4	n.d.	n.d.	−	[16]
安徽	泌乳期奶牛粪便(n=6)	−	759.33	131.53	204.79	−	−	[15]
山西	泌乳牛粪便(n=3)	n.d.	−	75.2−98.2	26.8−36.2	−	−	[7]
河北	泌乳牛粪便(n=10)	−	−	69.45	48.17	−	−	[33]
上海	奶牛粪便(n=3)	−	−	21.0±1.1	51.5±2.1	4.6±0.1	7.5±0.4	[34]

续表 2

地区	样品类型	雌激素						参考文献
		E3	17α−E2	17β−E2	E1	17α−EE2	DES	
北京、河北	奶牛粪便(*n*=23)	0.34	−	24	15	n.d.	−	[35]
沈阳	奶牛粪便(*n*=3)	5830±80	420±20	<LOQ	1181±20	−	−	[32]
南京	奶牛粪便(*n*=10)	33.68	−	38.82	−	21.78	−	[36]
南京	奶牛粪便(*n*=3)	n.d.	−	109.14±10.52	−	126.00±11.47	−	[37]
南京	奶牛粪便(*n*=15)	181.958		17.72		19.13	−	[17]
吉林	奶牛粪便(*n*=3)	n.d.	94.6	82	212.63	−	−	[38]
黑龙江	奶牛粪便(*n*=10)	n.d.	220.62	88.05	246.95	−	−	[38]
辽宁	奶牛粪便(*n*=4)	n.d.	272.83	215.83	337.68	−	−	[38]
美国	奶牛粪便(固液分离)(*n*=3)	n.d.	32	<10	98	−	−	[39]
美国	奶牛粪便(干堆半固体)(*n*=30)	−	500	160	300	−	−	[40]
	奶牛粪便(干堆固体)(*n*=15)	−	180	<100	180	−	−	[40]
美国	牛粪干堆(半固态)(*n*=18)	−	603	236	349	−	−	[41]
美国	牛粪干堆(固态)(*n*=12)	−	289	113	203	−	−	[41]
美国	奶牛粪便(*n*=1)	−	6.2	16.6	16.1	27.4	−	[42]
美国	奶牛粪便(*n*=6)	n.d.	1416±104	153±25	535±62	−	<LOQ	[24]
美国	奶牛粪便(堆积两周)(*n*=6)	−	172	37	697	−	−	[24]
美国	奶牛粪便(堆积 6 个月)(*n*=3)	n.d.	33.33	n.d.	99.67	n.d.	−	[43]
荷兰	奶牛粪便(*n*=3)	<LOQ	155	48	50	−	−	[44]
德国	奶牛粪便(分娩前 100d)(*n*=10)	−	9.0	5.5	0.9	−	−	[45]
	奶牛粪便(分娩前 60d) (*n*=10)	−	13.9	7.0	0.1	−	−	[45]
	奶牛粪便(分娩前 30d)(*n*=10)	−	19.1	12.7	4.1	−	−	[45]
	奶牛粪便(分娩前 10d) (*n*=10)	−	42.2	23.4	9.4	−	−	[45]
	奶牛粪便(分娩前 5d) (*n*=10)	−	60.0	32.8	11.6	−	−	[45]
本文	犊牛粪便 (*n*=60)	n.d.	17.95	5.84	22.35	n.d.	n.d.	
	育成牛粪便(*n*=60)	n.d.	1.32	5.27	16.15	<LOQ	<LOQ	
	泌乳牛粪便(*n*=60)	n.d.	6.18	11.29	60.02	<LOQ	<LOQ	

注:采用中位值描述其平均水平;−表示无相关数据.

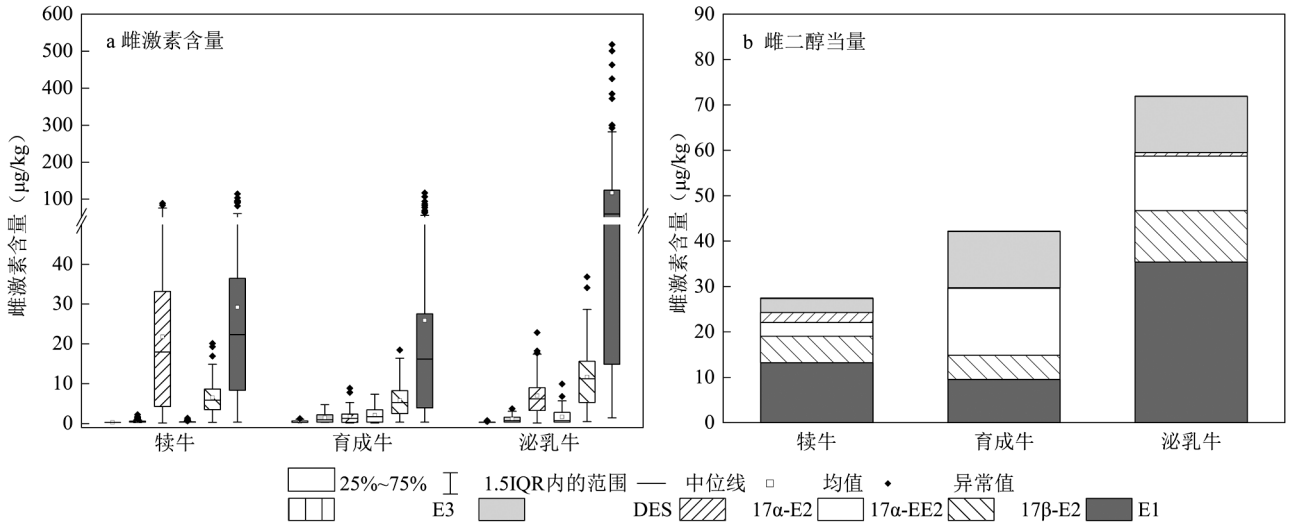

图 1 各生长阶段奶牛粪便雌激素含量特征

Fig.1 Characteristics of estrogen contents in fece of dairy cows at different growth stages

2.2 奶牛粪便中雌激素含量特征的季节差异

不同生长阶段奶牛粪便中雌激素含量具有显著的季节性差异(图 2).泌乳牛粪便样品中雌激素总含量为春季(193.22μg/kg)>冬季(136.00μg/kg)>夏季(69.67μg/kg)>秋季(13.33μg/kg),秋季泌乳牛粪便样品中雌激素含量显著低于其他季节(P<0.05).泌乳牛粪

便样品中 E1 贡献较高,占每个季度雌激素总量的31.96~85.69%.春季与夏季的泌乳牛粪便样品中17α−E2、DES 显著高于其他季节(P<0.05),育成牛粪便样品中雌激素总含量为依次为冬季(39.65μg/kg)>夏季(36.65μg/kg)>春季(29.46μg/kg)>秋季(7.31μg/kg),冬季与秋季育成牛粪便样品中 DES 与 17α−E2 显著低于春季与夏季(P<0.01).17α−EE2 在春季没有检出,显著低于其他季节(P<0.05).犊牛粪便样品中雌激素总含量依次为春季(56.26μg/kg)>夏季(35.70μg/kg)>秋季(32.96μg/kg)>冬季(56.14μg/kg),春季与冬季雌激素含量相对高于夏季与春季;犊牛粪便中的 E3、17α−E2、17α−EE2、17β−E2 检出浓度较低,不同季节间无显著差异(P>0.05);冬季犊牛粪便中 E1 浓度显著高于秋季(P<0.05),约为秋季含量的 4 倍.春季、夏季、秋季、冬季粪便样品中雌激素总含量中位数分别为60.76, 55.12, 12.78, 69.24μg/kg,总体表现为冬季与春季含量相对高于夏季、秋季,该结果与 Hill 等[46]研究结果相似.奶牛生理周期与季节间不同的环境条件(温度、湿度、光照、气压、环境污染程度等)变化可能是造成奶牛粪便中雌激素含量季节性差异的主要原因.研究表明,奶牛畜舍温度湿度表现出显著的季节差异性[47].奶牛舒适的环境温度为 5~25℃,当夏季环境温度过高时,奶牛遭受热应激可能引起采食量的波动,营养消耗增加和牛体不适等,直接影响卵泡发育、生殖器官蛋白和激素的合成,进而影响雌激素的分泌及排泄,并且这种影响会持续到秋季[48-49].

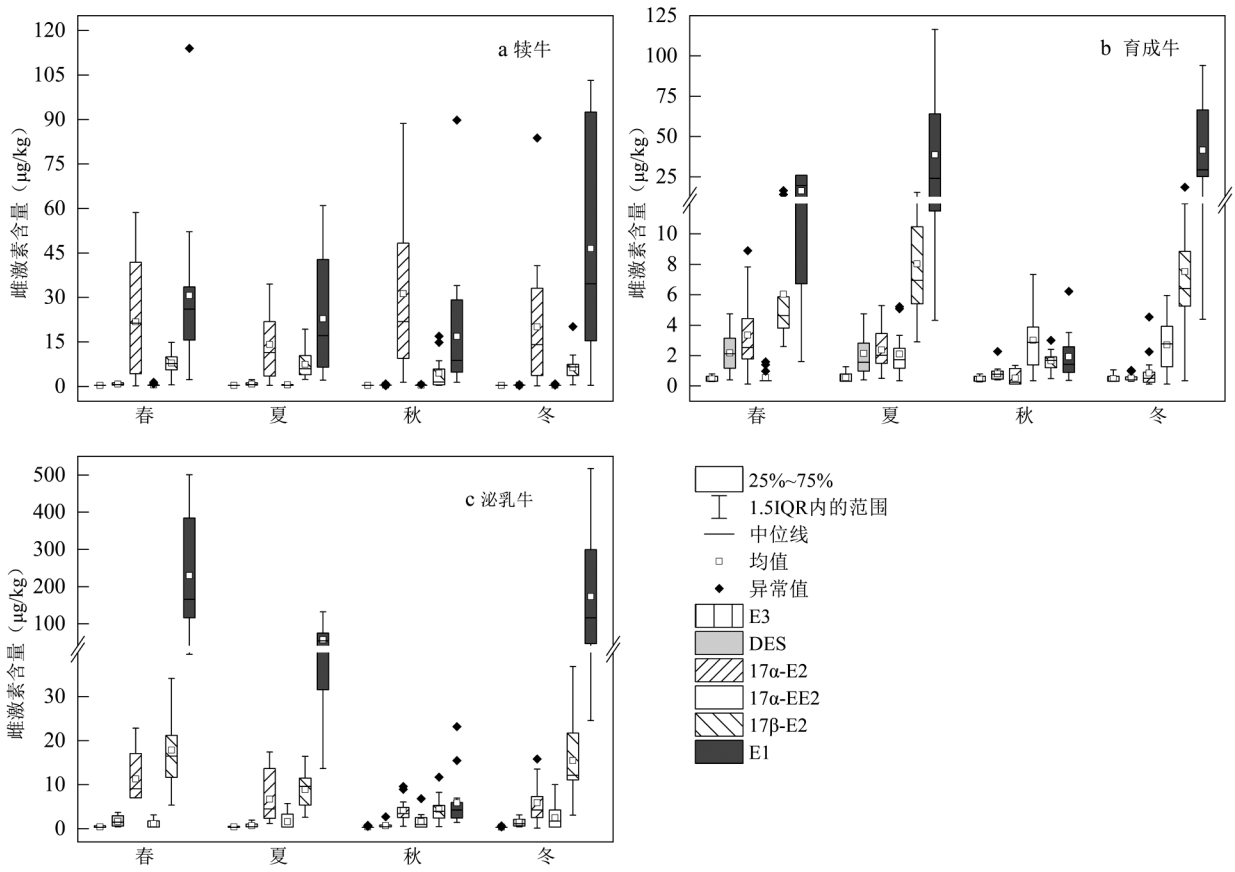

图 2　不同季节奶牛粪便中雌激素含量特征

Fig.2　Characteristics of estrogen concentrations in the feces of dairy cows in different seasons

2.3　牛粪堆场样品中雌激素含量特征

奶牛粪便利用之前在堆场内暂时自然堆放,是中国传统奶牛养殖场的普遍管理方式.由表 3 可知,牛粪堆场样品中检出的雌激素以 E1、17β−E2、17α−E2 为主,E3、17α−EE2、DES 检出率与检出浓度均较低,这与奶牛粪便主要排泄的雌激素种类一致.其中 E1、17β−E2 在粪便堆场样品中检出率为100%,E1 检出浓度最高,其含量中位值为 124.43μg/kg.粪便堆积场样品中 6 种雌激素总含量范围为7.63~3921.92μg/kg.

与定位栏鲜粪样品比,牛粪堆场样品中雌激素含量明显较高,这可能是由于粪便堆场样品中混入

了部分尿液[28],且堆存过程中结合态雌激素转化为自由态雌激素[50];Möstl 等[51]研究发现,奶牛粪便堆体表面样品中总雌激素含量高达 1000μg/ kg,而堆体内部样品只有约 27μg/kg.另有研究表明,E1 是 E2 两种异构体的降解产物[52].E1 通常是堆放粪便样品中最常检测到的雌激,本研究中牛粪堆场样品中 E1 的含量明显高于其他雌激素.这表明粪便在堆存的过程中,粪便中的雌激素存在转化、降解等过程,堆放的时间也对堆积粪便中雌激素含量具有一定的影响.因此,在评估奶牛养殖通过粪便排放的雌激素负荷时,如采用从粪便堆场样品的浓度进行估算,可能会导致估算结果存在偏差.

表 3 牛粪堆场样品中雌激素含量(μg/kg)分布(n=24)

Table 3 Estrogen concentrations (μg/kg) of feces samples collected from fecal stock dump(n=24)

雌激素	E3	17α-E2	17β-E2	E1	17α-EE2	DES
最小值	n.d.	n.d.	<LOQ	5.34	n.d.	n.d.
最大值	<LOQ	923.07	295.19	2692.68	3.23	5.78
均值	0.59	105.19	57.67	640.52	0.72	0.74
中位数	n.d.	13.18	16.48	124.43	n.d.	n.d.
检出率(%)	29.17	91.67	100	100	20.00	16.67

2.4 不同生长阶段奶牛粪便雌激素日排放量

研究采集 4 个季度的犊牛、育成牛、泌乳牛粪便样品各 60 份,经计算得到犊牛、育成牛、泌乳牛每日产粪量均值分别为 0.91, 20.43, 23.32kg,含水率均值分别为 70.38%、78.22%、80.64%.犊牛日产粪量明显低于育成牛、泌乳牛.张振伟等[53]的研究表明,产粪量与奶牛的体重有关,随着体重的增加,产粪量也会相应增加.

结合各生长阶段奶牛粪便中雌激素含量, 参照 1.5.2 计算各生长阶段奶牛每天通过粪便排放的雌激素量, 结果见表 4.泌乳牛、育成牛、犊牛每天通过粪便排泄的雌激素含量分别为 364.28, 115.55, 12.70μg/(d·头),明显低于 Hui 等[7]研究中估算的每头奶牛雌激素日排泄量 1159.86~1533.12μg/(d·头),其主要原因可能是估算方法及基础数据来源不同导致的.每头泌乳牛粪便中雌激素日排泄量(364.27μg/(d·头))与 Tao 等[16](192~671μg/(d·头))和 Johnson 等[54](199μg/(d·头))的研究结果非常接近.犊牛、育成牛、泌乳牛粪便雌激素日排泄量差异较大,主要是由于泌乳牛日产粪量与粪便中雌激素含量较高于育成牛、犊牛、泌乳牛通过粪便排泄的雌激素对环境中雌激素污染贡献较大.

表 4 不同生长阶段奶牛粪便中雌激素日排泄量[μg/(d·头)]

Table 4 Daily excretion of estrogens in the feces of dairy cows at different growth stages[μg/(d·cow)]

雌激素	E3	17α-E2	17β-E2	E1	17α-EE2	DES	合计
犊牛	0.08	4.84	1.57	6.02	0.09	0.10	12.70
育成牛	1.40	5.87	23.43	71.84	6.14	6.87	115.55
泌乳牛	1.42	27.89	50.93	270.84	6.23	6.97	364.28

3 结论

3.1 新鲜奶牛粪便中 4 种天然雌激素和 2 种人工合成雌激素均有检出,但以 3 种天然雌激素 E1、17β-E2、17α-E2 为主.不同生长阶段奶牛粪便中雌激素含量存在显著差异,6 种雌激素的总含量排序为泌乳牛>犊牛>育成牛.

3.2 奶牛粪便中雌激素含量存在显著的季节性差异,冬季与春季的含量相对高于夏季与秋季.在评估奶牛养殖通过粪便排放的雌激素负荷时,应考虑采样时间对结果的影响.

3.3 奶牛场牛粪堆场样品中雌激素含量明显高于定位栏的鲜粪样品.在评估奶牛养殖通过粪便排放的雌激素负荷时,如采用牛粪堆场样品的雌激素含量进行估算,可能会导致结果存在偏差.

参考文献:

[1] Hanselman T A, Graetz D A, Wilkie A C, et al. Manure-borne estrogens as potential environmental contaminants: A review [J]. Environmental Science & Technology, 2003,37(24):5471-5478.

[2] 童 心,胡柏杨,陈兴财,等.类固醇雌激素的环境暴露及其迁移转化 [J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2017,43(6):734-746.
Tong X, Hu B Y, Cheng X C, et al. Environmental exposure of steroid estrogens and their migration and transformation behavior [J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences), 2017,43(6): 734-746.

[3] Huang C, Zhang Z, Wu S, et al. In vitro and in vivo estrogenic effects of 17alpha-estradiol in medaka (Oryzias latipes) [J]. Chemosphere, 2010,80(5):608-612.

[4] Valdehita A, Quesada-Garcia A, Delgado M M, et al. In vitro assessment of thyroidal and estrogenic activities in poultry and broiler manure [J]. Science of the Total Environment, 2014,472:630-641.

[5] 包国章,董德明,李向林,等.环境雌激素生态影响的研究进展 [J]. 生态学杂志, 2001,20(5):44-50,54.
Bao G Z, Dong D M, Li X R, et al. Progress of Studies on Ecological Effects of Ecoestrogen [J]. Chinses Journal of Ecology, 2001,20(5):

44−50,54.

[6] Zhang Q Q, Xing C, Cai Y Y, et al. How much do human and livestock actually contribute to steroids emission and surface water pollution from past to the future: A global research [J]. Science of the Total Environment, 2021,772:145558.

[7] Hui Z, Shi J, Liu X, et al. Occurrence of free estrogens, conjugated estrogens, and bisphenol A in fresh livestock excreta and their removal by composting in North China [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2014,21(16):9939−9947.

[8] Hanselman T A, Graetz D A, Wilkie A C, et al. Determination of steroidal estrogens in flushed dairy manure wastewater by gas chromatography−mass spectrometry [J]. Journal of Environmental Quality, 2006,35(3):695−700.

[9] 余薇薇,朱家悦,陈　垚,等.集约化养殖场中类固醇雌激素的环境行为与处理途径 [J]. 环境工程, 2017,35(3):174−178.
Yu W W, Zhu J Y, Chen Y, et al. Reserch advances in environmental behavior and treatments of steriod estrogens in intensive farm [J]. Environmental Engineering, 2017,35(3):174−178.

[10] Yu W, Du B, Yang L, et al. Occurrence, sorption, and transformation of free and conjugated natural steroid estrogens in the environment [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2019,26(10):9443−9468.

[11] 王　琳,陈兴财,姜晓满,等.不同形态雌激素的环境行为及污染控制 [J]. 农业环境科学学报, 2021,40(8):1623−1634.
Wang L, Chen X C, Jiang X M, et al. Environmental behaviors and pollution control for different forms of steroid estrogens [J]. Journal of Agro−Environment Science, 2021,40(8):1623−1634.

[12] Zhang Q Q, Zhao J L, Ying G G, et al. Emission estimation and multimedia fate modeling of seven steroids at the River Basin Scale in China [J]. Environmental Science & Technology, 2014,48(14): 7982−7992.

[13] Liu S, Ying G G, Zhou L J, et al. Steroids in a typical swine farm and their release into the environment [J]. Water Research, 2012,46(12): 3754−3768.

[14] 宋晓明,杨悦锁,温玉娟,等.雌激素在地下环境中的归宿及其生态调控 [J]. 中国环境科学, 2016,36(9):2828−2840.
Song X M, Suo Y Y, Juan W Y, et al. Fate and ecological regulation of steroidal estrogens in subsurface environment [J]. China Environmental Science, 2016,36(9):2828−2840.

[15] 张梦涛,郑　溪,曹　飞,等.安徽省奶牛养殖场粪便中甾体雌激素污染特征研究 [J]. 安徽农业科学, 2015,43(16):263−267.
Zhang M T, Zheng X, Cao F, et al. Pollution characteristics of steroid estrogens in feces from concentrated dairy feeding farms of Anhui Province [J]. Jounal of Anhuiui Agricultural Sciences, 2015,43(16): 263−267.

[16] Tao H Y, Zhang J, Shi J, et al. Occurrence and emission of phthalates, bisphenol A, and oestrogenic compounds in concentrated animal feeding operations in Southern China [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2021,207:111521.

[17] 付银杰,凌婉婷,董长勋,等.应用 UE−SPE−HPLC/FLD 法检测养殖业畜禽粪便中雌激素 [J]. 应用生态学报, 2013,24(11):3280−3288.
Fu Y J, Ling W T, Dong C X, et al. Estrogens determination of livestock dung based on UE−SPE−HPLC [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2013,24(11):3280−3288.

[18] 贺德春,胡嘉梧,梁紫薇,等.同位素内标−高效液相色谱−串联质谱法测定畜禽粪便中 6 种雌激素 [J]. 生态环境学报, 2021,30(2):383−390.
He D C, Hu J W, Liang Z W, et al. Determination of six estrogens in livestock manures by isotope internal standard−high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry [J]. Ecology and Environment Sciences, 2021,30(2):383−390.

[19] GB/T 8576−2010　复混肥料中游离水含量的测定 真空烘箱法 [S].
GB/T 8576−2010　Determination of free water for compound fertilizers−Vacum oven method [S].

[20] Körner W, Spengler P, Bolz U, et al. Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in southwestern Germany. 2. Biological analysis [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2001,20(10):2142−2151.

[21] 隋　倩,黄　俊,余　刚.中国城市污水处理厂内分泌干扰物控制优先性分析 [J]. 环境科学, 2009,30(2):384−390.
Sui Q, Huang J, Yu G. Priority analysis for controlling endocrine disrupting chemicals in municipal wastewater treatment plants of China [J]. Chines Journal of Evironment Science, 2009,30(2):384−390.

[22] Shappell N W, Hyndman K M, Bartell S E, et al. Comparative biological effects and potency of 17alpha− and 17beta−estradiol in fathead minnows [J]. Aquatic Toxicology, 2010,100(1):1−8.

[23] Adeel M, Song X, Wang Y, et al. Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review [J]. Environment International, 2017,99:107−119.

[24] Zheng W, Yates S R, Bradford S A. Analysis of steroid hormones in a typical dairy waste disposal system [J]. Environmental Science & Technology, 2008,42(2):530.

[25] Wenzel A, Kuechler T, Mueller J. Konzentrationen oestrogen wirksamer substanzen in umweltmedien. [R]. Gemany German Environmental Protection Agency, Project, 1998.

[26] Rechsteiner D, Schrade S, Zahner M, et al. Occurrence and fate of natural estrogens in Swiss cattle and pig slurry [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020,68(20):5545−5554.

[27] Sarmah A K, Northcott G L, Leusch F D L, et al. A survey of endocrine disrupting chemicals (EDCs) in municipal sewage and animal waste effluents in the Waikato region of New Zealand [J]. Science of the Total Environment, 2006,355(1):135−144.

[28] Combalbert S, Hernandez−Raquet G. Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010,86(6):1671−1692.

[29] Partridge C, Boettcher A, Jones A G. Short−term exposure to a synthetic estrogen disrupts mating dynamics in a pipefish [J]. Hormones and Behavior, 2010,58(5):800−807.

[30] Gadd J B, Tremblay L A, Northcott G L. Steroid estrogens, conjugated estrogens and estrogenic activity in farm dairy shed effluents [J]. Environmental Pollution, 2010,158(3):730−736.

[31] Mashtare M L, Khan B, Lee L S. Evaluating stereoselective sorption by soils of 17alpha−estradiol and 17beta−estradiol [J]. Chemosphere, 2011,82(6):847−852.

[32] Liu N, Shi Y E, Li M, et al. Simultaneous determination of four trace estrogens in feces, leachate, tap and groundwater using solid−liquid extraction/auto solid−phase extraction and high−performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. Journal of Separation

Science, 2015,38(20):3494−3501.

[33] 刘 敏.畜禽粪便土地利用中典型内固醇雌激素的分析和降解研究 [D]. 广州:暨南大学, 2011.
Liu M. The study on analysis and degradation of typical steroid estrogens in animal waste during land use. [D]. Guangzhou:Jinan University.

[34] 胡双庆,袁哲军,沈根祥.典型畜禽粪污中雌激素排放特征 [J]. 环境科学研究, 2020,33(1):227−234.
Hu S X, Yuan Z J, Shen G X. Characteristics of estrogen in typical livestock and poultry waste [J]. Research of Environmental Sciences, 2020,33(1):227−234.

[35] Li C, Li Y, Li X, et al. Veterinary antibiotics and estrogen hormones in manures from concentrated animal feedlots and their potential ecological risks [J]. Environmental Research, 2021,198:110463.

[36] Xu P, Zhou X, Xu D, et al. Contamination and risk assessment of estrogens in livestock manure: A case study in Jiangsu Province, China [J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2018,15(1):125.

[37] 韩 进,程鹏飞,周 贤,等.畜禽粪便堆肥过程中雌激素降解特征 [J]. 农业资源与环境学报, 2019,36(5):679−686.
Han J, Cheng P F, Zhou X, et al. Characteristics of estrogen degradation in livestock manures during composting [J]. Journal of Agricultural Resources and Environment, 2019,36(5):679−686.

[38] Han W, Li Y X, Yang M, et al. Presence and determination of manure−borne estrogens from dairy and beef cattle feeding operations in northeast China [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2011,86(5):465−469.

[39] Raman D R, Layton A C, Moody L B, et al. Degradation of estrogens in dairy waste solids: Effects of acidification and temperature [J]. Transactions of the ASAE, 2001,44(6):1881.

[40] Raman D R, Williams E L, Layton A C, et al. Estrogen content of dairy and swine wastes [J]. Environmental Science & Technology, 2004,38(13):3567−3573.

[41] Williams E. Estrogen concentrations in animal waste holding facilities: implications for manure management practices [D]. Tennessee: University of Tennessee, 2002.

[42] Andaluri G, Suri R P, Kumar K. Occurrence of estrogen hormones in biosolids, animal manure and mushroom compost [J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2012,184(2):1197−1205.

[43] Shappell N W, Elder K H, West M. Estrogenicity and nutrient concentration of surface waters surrounding a large confinement dairy operation using best management practices for land application of animal wastes [J]. Environmental Science & Technology, 2010,44(7): 2365−2371.

[44] Vethaak A, Rijs G, Schrap S, et al. Estrogens and xeno−estrogens in the aquatic environment of the Netherlands: Occurrence, Potency and Biological Effects [R]. Netherlands: Dutch National Institute of Inland Water Management and Waste Water Management (RIZA), 2002.

[45] Hoffmann B, de Pinho T G, Schuler G. Determination of free and conjugated oestrogens in peripheral blood plasma, feces and urine of cattle throughout pregnancy [J]. Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes, 1997,105(5):296−303.

[46] Hill D, Morra M J, Stalder T, et al. Dairy manure as a potential source of crop nutrients and environmental contaminants [J]. Journal of Environmental Sciences, 2021,100:117−130.

[47] 赵寿培,李雪梅,高玉红,等.冀中平原奶牛舍温热环境评价及温热参数与生理指标的相关性分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2020,47(11): 3510−3517.
Zhao S P, Li X M, Gao Y H, et al. Evaluation of thermal environment of cowshed and correlation analysis between thermal parameter and physiological parameter ofdairy cows in central plain of Hebei [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2020,47(11):3510−3517.

[48] 张志登.热应激对宁夏地区泌乳奶牛生产性能及血液生化指标的影响 [D]. 银川:宁夏大学, 2019.
Zhang Z D.Effect of heat stress on production performance and blood biochemical parameters of lactating cows in Ningxia [D]. Yin chuan: Ningxia university.

[49] 刘江静.季节对荷斯坦奶牛体温和活动量影响及返情规律研究 [D]. 长春:吉林农业大学, 2019.
Liu J J. The study on effct of seasons on body temperature and activity of Holatein cows, and the rules of returing estrus after cows breeding [D]. Changchun: Jilin Agricultrural University.

[50] 王 真,张洪昌,沈根祥,等.结合态雌激素在堆肥过程中的降解与转化研究 [J]. 农业环境科学学报, 2019,38(12):2860−2870.
Wang Z, Zhang H C, Shen G X, et al. Degradation and transformation of conjugated estrogens during composting [J]. Journal of Agro−Environment Science, 2019,38(12):2860−2870.

[51] Möstl E, A D, Palme R. Östrogenkonzentration im Mist trächtiger Rinder [J]. Wiener tierärztliche Monatsschrift, 1997,84:140−143.

[52] 余薇薇,杨 硕,杨 伦,等.养殖场沼液中雌激素排放特征及去除效果研究 [J]. 中国环境科学, 2020,40(5):2103−2109.
Yu W W, Yang S, Yang L, et al. Study of emission characteristics and removal efficiency of estrogens in biogas slurry at farm [J]. China Environmental Science, 2020,40(5):2103−2109.

[53] 张振伟,庞伟英,周玉香,等.宁夏地区不同生长阶段奶牛产污系数的对比分析 [J]. 家畜生态学报, 2015,36(1):50−54.
Zhang Z W, Pang W Y, Zhou Y X, et al. Comparative analysis on pollutant producing coefficients of lactating cows at different growth stages in NingXia [J]. Journal of Domestic Animal Ecology, 2015, 36(1):50−54.

[54] Johnson A C, Williams R J, Matthiessen P. The potential steroid hormone contribution of farm animals to freshwaters, the United Kingdom as a case study [J]. Science of the Total Environment, 2006, 362(1−3):166−178.

作者简介：李 艳(1997−),女,湖南郴州人, 重庆三峡学院硕士研究生, 研究方向为新型污染物控制技术研究.