

双层管用于发光细菌检测水样毒性时的色度修正

瞿 琰, 卢湘岳, 刘赞

(华东师范大学资源与环境学院环境科学系, 上海 200062)

摘要: 阐述了应用发光细菌检测有色水样毒性时, 水样色度会引起附加发光抑制的原因, 提出应用同心双层检测玻管, 可以对有色水样色度引起的附加发光抑制加以修正。通过比较单层管和双层管测定标准曲线间的差异、设置阴性对照和阳性对照评价该方法的可靠性, 以及用该方法检测有色水样活性黑 KN-B 溶液的急性毒性实验, 结果表明, 用同心双层检测玻管可以有效修正由水样色度引起的附加发光抑制。

关键词: 发光细菌; 同心双层检测玻管; 水质; 色度修正

中图分类号: X835 文献标识码: A 文章编号: 1006-2009(2006)06-0018-03

Color Correction for Luminescent Bacteria Toxicity Test with Co-concentric Double-Deck Test Tubes in Toxicity Detection of Colored Water Samples

QU Jing-yan, LU Xiang-yue, LU Yun

(Department of Environmental Science and Technology, School of Resources and Environment Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract The excess luminescence-inhibition caused by color of water samples is described in toxicity detection of luminescent bacteria test. This inhibition can be corrected by use of co-concentric double-deck test tubes in the detecting process. The calibration curve of single-deck test tube and that of double-deck test tube were compared in luminescent bacteria tests, and test reliability was evaluated with negative and positive controls. Experimental results show that luminescence depression can be effectively corrected by co-concentric double-deck test tubes at detecting the acute toxicity of colored water samples with active black KN-B.

Key words Luminescent bacteria; Co-concentric double-deck test tube; Water quality; Color correction

发光细菌检测法快速简便、灵敏度高, 被广泛应用于各种化学样品的毒性检测^[1,2]。然而, 当样品有颜色时, 其色度会遮挡部分光线, 产生附加的发光抑制^[3], 使发光细菌检测法的应用受限制。

在 GB/T 15441-1995《水质急性毒性的测定 发光细菌法》中, 要求用外套大管内加有色水样的方法修正样品色度的干扰。但是, 直到目前也没有关于该修复方法可靠性的报道, 并且常用的生物发光光度计也无法容纳外套大管。利用同心双层检测玻管分离有色水样和发光细菌, 将菌液置于内管而有色水样置于外管, 可以使发光细菌的发光强度不受水样毒性影响。当发光光线在穿过外层有色水样时, 水样色度会削减发光强度, 此时测得的相对抑光率由水样色度引起, 故可以称之为“附加发

光抑制”。现应用该法比较单层管和双层管测得标准曲线间的差异, 并且利用阴性和阳性对照, 对方法的可靠性进行了验证。另外, 通过测定有色水样活性黑 KN-B 溶液的急性毒性, 也检验了双管法的实用性。

1 材料和方法

1.1 材料、试剂与仪器

青海弧菌 (*Vibrio qinghaiensis* sp. nov. strain Q67) 冻干粉^[4]; 活性黑 KN-B 苯酚 (国产, 分析纯)。RS 9901 生物发光光度计, 通用的单层检测

收稿日期: 2006-05-12 修订日期: 2006-11-07

作者简介: 瞿 琰 (1982-), 女, 上海人, 硕士研究生, 从事环境生理与毒理工作。

玻管: 直径 10 mm、壁厚 1 mm、管高 45 mm; 同心双层检测玻管 (由同心内管和外管组成): 内管直径 5 mm、壁厚 0.5 mm, 外管直径 10 mm、壁厚 1 mm、管高 45 mm, 见图 1。

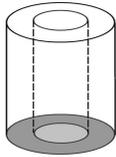


图 1 同心双层检测管

1.2 实验

实验分为标准曲线、样品、阴性和阳性对照等若干组, 每组分别用单层管和双层管检测, 菌液置于单层管或双层管内管, 其中:

空白对照组——在单层管和双层管内、外管中均加 8.5 g/L NaCl 溶液;

标准曲线组——配制质量浓度为 60 mg/L、120 mg/L、180 mg/L、240 mg/L、300 mg/L、360 mg/L、420 mg/L、480 mg/L 苯酚溶液, 在双层管内管加苯酚溶液, 外管加 8.5 g/L NaCl 溶液;

有色水样组——活性黑 KN-B 溶液质量浓度为 10 mg/L、18 mg/L、32 mg/L、56 mg/L、100 mg/L, 在双层管外管加有色水样, 内管加 8.5 g/L NaCl 溶液;

阴性和阳性对照组——在管外包裹 1、2、3、4 层色度均匀的蓝色透光色带, 取代水样色度遮挡光亮, 色带的可见光吸收光谱在 500 nm~700 nm 之间, 与活性黑 KN-B 溶液一致: 双层管内、外管均加 8.5 g/L NaCl 溶液和菌液, 模拟水样色度对发光的单独影响, 用于检测附加发光抑制; 单层管阴性对照管内加 8.5 g/L NaCl 溶液, 细菌发光强度不受毒物的抑制, 但会经管外包的透光色带衰减, 模拟有色度但对发光细菌代谢没有影响的被测水样; 单层管阳性对照管内加 120 mg/L、240 mg/L、360 mg/L、480 mg/L 的苯酚溶液, 管内溶液的毒性随管外透光色带层数的增加而上升, 模拟有毒有色水样对菌体发光的影响。

1.3 操作步骤与数据处理

青海弧菌冻干粉于 4℃ 下复苏, 加入 8.5 g/L NaCl 溶液, 混匀, 制成细菌悬液。在待测水样中加入定量菌液, 15 min 后测定混合液的发光强度 I 。计算相对抑光率:

$$RI(\%) = (1 - I_{\text{样品}} / I_{\text{空白}}) \times 100\%$$

取 3 次重复实验的均值, 以水样质量浓度为横坐标, 以平均相对抑光率为纵坐标作图, 线性拟合并建立相关方程。

单层管拟合曲线的斜率 K 高于双层管的部分 ΔK , 表明水样毒性对菌体发光产生了抑制效应, 据此建立由水样毒性引起的菌体发光相对抑光率与水样浓度间的相关方程: $y = \Delta K x$

计算水样的半数有效质量浓度 (EC_{50}), 并将水样质量浓度代入方程计算相对抑光率, 作为评价水样毒性的指标^[5]。

2 结果与讨论

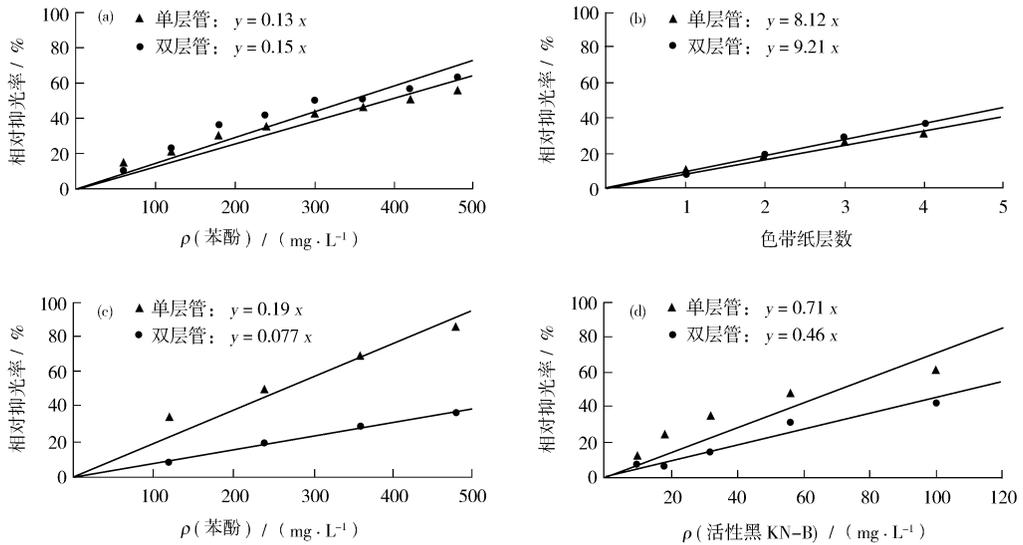
2.1 数据拟合曲线

用双层管将水样色度与毒性分离进行色度修正的结果见图 2。

图 2 为实验数据的拟合曲线, 其中标准曲线 (a) 显示了苯酚毒性同发光细菌发光强度之间的关系, 表明双层管的光损耗比单层管高 (T 检验, $\alpha < 0.01$), 原因在于发光菌分布体积比单层管少; 多了一层内管后, 增加了玻璃管的折光, 从而增加了光量的物理损耗。

阴性对照 (b) 显示了在无毒害情况下, 外包的透光色带层数与发光细菌发光强度间的关系, 当菌体发光仅受外层色带遮挡时, 双层管的光损耗同样高于单层管。阳性对照 (c) 显示了用双层管分离水样毒性和色度的效果。单层管的相对抑光率高于双层管, 是因为单层管中由水样毒性引起的发光抑制与由色度产生的附加发光抑制相互叠加, 而双层管中发光细菌加于内管中, 未受水样毒害, 发光量仅受外层色带的遮挡, 这样将水样色度引起的附加发光抑制分离了出来。扣除水样色度引起的附加发光抑制, 即可得到单层管与双层管拟合曲线斜率的差值, 当该差值比标准曲线斜率低时, 也表明双层管的光损耗高于单层管。

活性黑水样 (d) 反映了双层管法检测发光细菌在活性黑 KN-B 溶液中受毒害情况。单层管的发光细菌抑光率高于双层管, 原因在于单层管中的发光细菌既受到水样的毒害, 发光量又受到水样色度的遮挡; 而双层管用于修正附加发光抑制, 水样置于外管; 发光细菌置于含有 8.5 g/L NaCl 溶液的内管中, 其发光仅受到外管水样色度的遮挡。



a——标准曲线; b——阴性对照; c——阳性对照; d——活性黑水样

图 2 用双层管将水样色度与毒性分离进行色度修正的结果

2.2 方法系统误差

对图 2 中标准曲线、阴性和阳性对照组的单层管和双层管结果进行了比较, 结果表明, 双层管的光损耗高于单层管, 两者的相对偏差在 (13.5 ± 0.2)% 之内, 标准曲线和阴性对照的相对偏差 = $(K_{\text{双层管组}} - K_{\text{单层管组}}) / K_{\text{单层管组}} \times 100\%$; 阳性对照的相对偏差 = $[(K_{\text{单层管组}} - K_{\text{双层管组}}) - K_{\text{标准曲线}}] / K_{\text{标准曲线}} \times 100\%$, 表明双层管法修正水样色度的系统误差一致。综合各拟合曲线表达的结果, 建立由水样色度引起的附加发光抑制的校正方程:

$$\Delta K = (K_{\text{单层管组}} - K_{\text{双层管组}}) / (1 - 13.5\%)$$

2.3 双层管法修正水样色度在有色水样毒性检测中的应用

以活性黑 KN-B 溶液为例, 根据校正方程, 得到发光细菌的相对抑光率同活性黑 KN-B 质量浓度的线性方程为: $y = 0.290x$

式中: y 为平均相对抑光率; x 为活性黑 KN-B 溶液的质量浓度。

得出活性黑 KN-B 的 EC_{50} 为 172.4 mg/L, 由 100 mg/L 活性黑 KN-B 溶液毒性引起的相对抑光率为 29.0%。活性黑 KN-B 是双偶氮染料, 该染料的生物伤害主要表现在代谢产物的致癌性等方面, 其急性毒性效应不明显^[6]。但是, 活性黑 KN-B 的色度对菌体发光会产生高度抑制, 从而导致检测到的毒性结果偏高。

3 结论

同心双层检测玻管可以修正水样色度对发光细菌发光的干扰, 同时提出的根据对照试验建立的校正方程, 证实了该方法的有效和可靠。该方法对 GB/T 15441-1995《水质急性毒性的测定发光细菌法》中用外套大管修正样品色度方法作了改进, 实验证明改进方法具有可靠性, 为非连续性生物发光测试仪检测有色水样毒性时, 排除水样色度的干扰提供了便捷。

[参考文献]

[1] REN S J, FRYM IER P D. Toxicity of metals and organic chemicals evaluated with bioluminescence assays [J]. *Chemosphere*, 2005, 58: 543-550.

[2] 马宁, 肖利红. 不同污染指示菌对河流的细菌学评价 [J]. *环境监测管理与技术*, 2002, 14(1): 24-26.

[3] LAPPALAINEN J, JUVONEN R, VAAJASAARIK, et al. A new flash method for measuring the toxicity of solid and colored samples [J]. *Chemosphere*, 1999, 38(5): 1069-1083.

[4] 马梅, 童中华, 朱文杰, 等. 新型淡水发光菌 (*Vibrio qinghaiensis* sp. - Q67) 应用于环境样品毒性测试的初步研究 [J]. *环境科学学报*, 1998, 18(1): 86-91.

[5] 国家环境保护总局《水和废水监测分析方法》编委会. *水和废水监测分析方法* [M]. 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.

[6] 钟金汤. 偶氮染料及其代谢产物的化学结构与毒性关系的回顾与前瞻 [J]. *环境与职业医学*, 2004, 21(1): 58-62.

本栏目责任编辑 张启萍