

# 发光菌法在线监测水中生物毒性

郭少维, 王宇伟, 贝乐野, 陈露茜  
(上海理工大学 环境与建筑学院, 上海 200093)

**摘要:** 随着人类工农业活动的增加, 水体污染物种类及毒性作用日益复杂化。对水中生物毒性的在线监测, 已经迫在眉睫。根据发光菌法快速、灵敏、低廉特点, 将发光菌法运用于水中在线生物毒性监测, 能客观地反映水中有毒有害物质的毒性, 实时反映水中毒性的变化。本方法使用明亮发光杆菌作为测试菌种, 标准品为  $10 \text{ mg/L}$  的  $7\text{H}_2\text{O} \cdot \text{ZnSO}_4$ , 最佳测试温度在  $15^\circ\text{C}$ , 菌种复苏后稳定时间为  $24 \text{ h}$ , 通过测定实际水样, 加标抑制率为  $95.94 \sim 97.02\%$ 。

**关键词:** 发光菌; 在线监测; 生物毒性; 水体污染

中图分类号: X832 文献标识码: A 文章编号: 1672-643X(2013)02-0160-03

## Online monitor of biological toxicity in water by luminescent bacteria method

GUO Shaowei, WANG Yuwei, BEI Leye, CHEN Luxi

(College of Environment and Architecture, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

**Abstract:** With the increase of human activities in industry and agriculture, the species and the toxic effect of water pollutant are getting more and more complex. Therefore, the online monitor of the aquatic toxicity has been imminent. Advantaged in rapidness, sensitivity and cheapness, the luminescent bacteria method can be applied into the online monitor, which can objectively reflect the toxicity of toxic substances as well as the change of it. Photobacterium phosphoreum is used as the test strains in this method, and the standard is  $10 \text{ mg/L}$   $7\text{H}_2\text{O} \cdot \text{ZnSO}_4$ , the best test temperature is  $15^\circ\text{C}$  and the strain recovery time stabilization time after recovery is 24 hours. The proposed method was successfully applied to measure actual water sample, proforma rate of addition standard is between  $95.94\%$  and  $97.02\%$ .

**Key words:** luminescent bacteria; online monitor; biological toxicity; water pollution

## 0 前言

传统的生物监测主要以水蚤、藻类或鱼类为主的个体生物为受试对象, 这种监测方法虽然能反映毒物对生物的直接影响, 但是这种方法的最大缺点是实验周期长, 实验过程比较繁琐。针对传统生物毒性检测方法的不足, 以发光细菌为受试对象的发光菌法生物监测技术慢慢成熟起来<sup>[1]</sup>。相对于传统生物监测方法, 发光菌法表现出了灵敏度高、相关性好、反应速度快、成本低廉、自动化程度高等诸多优点。它不仅能测定单因子指标, 还能快速准确测出环境的综合毒性指标, 具有理化法无可比拟的优势<sup>[2-4]</sup>。根据发光菌对有毒物质的敏感性, 本文将介绍将发光菌法应用于在线监测水中生物毒性。

## 1 实验部分

### 1.1 实验原理

用于生物在线监测的发光细菌主要有明亮发光杆菌( $T_3$ )<sup>[5]</sup>、费氏弧菌、青海弧菌等, 其发光机理为:  $\text{FMNH}_2$  (还原性黄素) + LE (荧光酶)  $\rightarrow$   $\text{FMNH}_2 \cdot \text{LE} + \text{O}_2 \rightarrow \text{LE} \cdot \text{FMNH}_2 \cdot \text{O}_2 + \text{RCHO}$  (八碳以上长链脂肪醛)  $\rightarrow \text{LE} \cdot \text{FMNH}_2 \cdot \text{O}_2 \cdot \text{RCHO} \rightarrow \text{LE} + \text{FMN} + \text{H}_2\text{O} + \text{RCOOH} + \text{蓝绿光}$ 。<sup>[1]</sup>

当有毒物质与发光菌接触时, 通过影响细胞内与发光反应有关的代谢过程、酶的运作, 可抑制细菌发光, 导致发光下降。凡能够干扰或破坏发光细菌呼吸、生长、新陈代谢等生理过程的任何有毒物质都可以根据发光的发光细菌的强度变化来测定<sup>[6]</sup>。

收稿日期: 2012-11-26

作者简介: 郭少维(1960-), 男, 黑龙江哈尔滨人, 博士, 教授, 研究方向: 环境监测与环保仪器分析方法研究。

通讯作者: 王宇伟(1988-), 男, 湖北荆州人, 硕士研究生, 研究方向: 环境监测与环保仪器分析方法研究。

1.2 仪器与试剂

深圳朗石生物仪器 Lumifox8000 在线生物毒性仪,明亮发光杆菌,专用复苏稀释液(编号 RA802121010),专用渗透压调节液(编号 RA803121010),质控液(编号 RA804113115),100~1000 μL 移液枪(美国 Thermo scientific)。

1.3 实验步骤

(1)发光菌复苏。在 -20℃ 的冰箱中取冻干菌一周用量(3 支)。每瓶冻干菌中加入 2.5 mL 专用复苏稀释液,摇匀倒入石英玻璃菌液储存杯,在室温(15℃~25℃)静置 15 min 后将复苏后的冻干菌放置到 5℃ 低温冰箱稳定 24 h 后方可使用。

(2)专用渗透压调节液。吸取一周用量(100 mL)的专用渗透压调节液放置到盐水槽中即可。

(3)标准样品。将一周用量(5 mL)标准样品放入标准样品瓶中即可。

(4)纯水。将纯水吸入管(带有玻璃坠)插入 20 L 纯水桶底部即可。

(5)开机运行。开启仪器电源,待发光菌存放槽温度降至 5℃,测量仓温度降至 15℃,即可点击手动测试或者由中控室远程触发测试。

2 结果与讨论

2.1 标准样品及浓度选择

重金属标准样品选用 7H<sub>2</sub>O · ZnSO<sub>4</sub> 为代表,配置浓度为 1,2,5,10,20,50 mg/L 的 7H<sub>2</sub>O · ZnSO<sub>4</sub> 溶液,有机物标准样品选用苯酚为代表,配置浓度为 50,100,150,200 mg/L,然后和空白样品依次放入到 Lumifox8000 毒性仪中测试。样品与菌种混合,反应时间为 30 min,反应结果如图 1 和图 2。计算结果如表 1 和表 2。

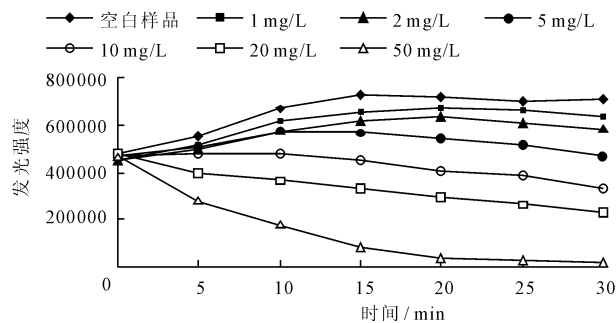


图 1 不同浓度 7H<sub>2</sub>O · ZnSO<sub>4</sub> 发光度

$$RLI(\%) = \frac{S_t}{(S_0 \times \frac{C_t}{C_0})} \times 100\%$$

式中: C<sub>0</sub> 为空白样品的初始发光值, C<sub>t</sub> 为空白样品在 t 时刻的发光值。S<sub>0</sub> 为测量样品的初始发光值, S<sub>t</sub> 为测量样品在 t 时刻的发光值。

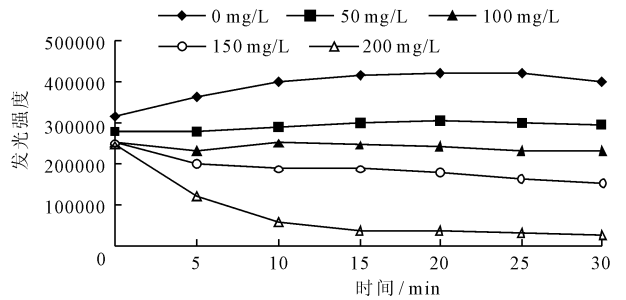


图 2 不同浓度苯酚发光度

表 1 不同浓度 7H<sub>2</sub>O · ZnSO<sub>4</sub> 的相对发光度 mg/L, %

7H <sub>2</sub> O · ZnSO <sub>4</sub>	1	2	5	10	20	50
相对发光度 RLI	95.10	86.70	69.20	48.40	32.60	2.20

表 2 不同浓度苯酚的相对发光度 mg/L, %

苯酚	50	100	150	200
相对发光度 RLI	82.27	72.25	48.35	9.89

根据国标 GB/T15441 - 1995 水质急性毒性的测定发光细菌法规定,标准品的抑制率应该达到 50%,所以 10 mg/L 的 7H<sub>2</sub>O · ZnSO<sub>4</sub> 和 150 mg/L 苯酚溶液都可选为在线生物毒性仪的标准品,由于苯酚易挥发,故本次试验选择 7H<sub>2</sub>O · ZnSO<sub>4</sub> 作为标准品。

2.2 测量仓最佳温度选择

分别在 5, 10, 15, 20, 25℃ 下测量 10 mg/L 7H<sub>2</sub>O · ZnSO<sub>4</sub> 的相对发光度 RLI, 结果如表 3。

表 3 不同温度下测定的 RLI 值 ℃, %

	5	10	15	20	25
RLI	61.20	54.10	47.30	53.21	56.80

可见在 15℃ 时,两种标准样品的 RLI 值最低,所以测量仓温度选择 15℃。

2.3 菌种复苏条件影响

(1)复苏温度。对同一批次的发光明亮杆菌,分别在 5,10,15,20,25,30℃ 的环境下进行 15 min 的复苏,复苏完成后测量其 C<sub>0</sub> 值,结果如表 4。

表 4 不同环境温度下复苏菌种的 CO 值 ℃

	5	10	15	20	25	30
CO 值	261230	343210	412021	432012	383651	246230

从表4可以看出,最佳复苏温度应该在15~25℃之间。温度过高或者过低复苏 $C_0$ 值会比较低,这样会导致其活性难以维持7d,致使最后2d由于菌种活性不够,测量误差偏大。

(2)复苏后稳定时间。将同一批菌种在20℃下复苏15min后,将菌种放入5℃冰箱中冷藏,然后分别在冷藏0,8,16,24,30,36h后进行纯水相对发光度测量,计算其CF值结果如表5。

复苏后稳定时间/h	0	8	16	24	30	36
CF值	0.77	0.84	0.92	0.98	1.01	1.02

$$CF = C_{30}/C_0$$

CF表示30min内菌种量的变化程度,CF越接近1,菌种越稳定。由表可见在复苏后冷藏24h的菌种CF达到0.98,所以复苏后的稳定时间选择为24h。

## 2.4 加标实验

取环境水样,直接测定,同时进行加标实验,实验结果如表6。

表6 水样毒性测定结果以及加标( $n=6$ )RLI值 %

	金墅港水源地渔洋山水源地	
测量值	96.23	108.71
加标10mg/L $H_2O \cdot ZnSO_4$	48.26	60.20
$7H_2O \cdot ZnSO_4$ 抑制率差值百分比	95.94	97.02

本方法抑制率差值计算公式为:

抑制率差值百分比 = (加标后水样RLI - 水样RLI) / 加标理论抑制率

加标理论抑制率为50%。在水源地水样中 $7H_2O \cdot ZnSO_4$ 的抑制率差值百分比在95.94%~97.02%。

## 2.5 实际水样3个月的监测结果

(1)以市场上销售的纯净水为空白对照样,将仪器设置为每4h测试一次水样和一次标准样品。每7d对仪器进行一次维护,更换菌种。2012年4月至6月对江苏省苏州市太湖金墅港和渔洋山水源地水质进行检查,结果见图3和图4。

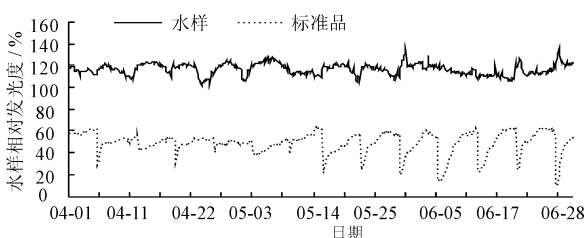


图3 金墅港水源地4-6月毒性曲线(2012年)

图中曲线表示水样和标准品的相对发光度,高于100%为光增益,低于100%为光损失。根据图3和图4上水样毒性曲线显示,水样相对发光度均在100%至140%之间,这说明这3个月来这两个水源地水里没有高浓度的急性毒性物质存在。

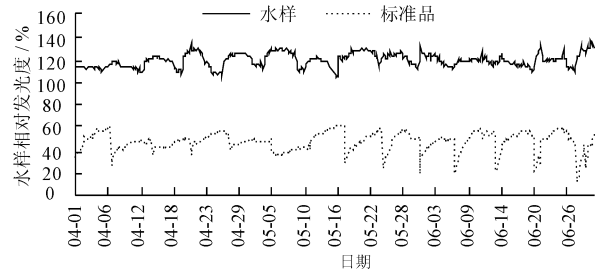


图4 渔洋山水源地4-6月毒性曲线(2012年)

(2)菌种刚复苏后,菌种对毒性的灵敏度比较高,在之后的一个周期内灵敏度会慢慢下降,所以在一个月周期内标准品的相对发光度会先急剧下降后再慢慢上升。

## 3 结语

(1)通过本次实验来看,发光菌法在线生物毒性仪能客观地反映有毒有害物质的毒性,实时反映水中毒性的变化,能起到生物预警的作用。

(2)对于菌种的开发研究方面,不仅要加强菌种的活性,保证菌种在7d里有足够的生物量进行生物毒性测试。而且进一步得提高菌种的灵敏度,使得菌种在一个周期内维持在一个较高的灵敏度,减少由于菌种原因带来的测量误差。

## 参考文献:

- [1] 彭强辉,陈明强,蔡强,等. 水质生物毒性在线监测技术研究进展[J]. 环境监测管理与技术, 2009, 21(4): 12-16.
- [2] 朱文杰,徐恶同,张秋卓,等. 净水技术, 2010, 29(4): 54-59.
- [3] Girotti S, Ferri E N, Furno M G, et al. Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria[J]. Analytica Chimica Acta, 2008, 608(1): 2-29.
- [4] 熊蔚蔚,吴淑杭,徐亚同,等. 生态环境, 2007, 16(4): 1085-1087.
- [5] KIM B C, GU M B. A multi-channel continuous water toxicity monitoring system: its evaluation and application to water discharged from a power plant[J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2005, 109(3): 156-164.
- [6] 贺志庆,王文波. 发光细菌的特性及其在环境监测方面的应用[J]. 化学工程与装备, 2008(2): 105-106.