

应用发光菌测定有机化合物的毒性

袁 星 郎佩珍

(东北师范大学环境科学系, 长春, 130024)

洪 晖 赵元慧 韩朔睽 王连生

(南京大学环境科学与工程系, 南京, 210008)

马 梅 王子健

(中国科学院生态环境研究中心, 北京, 100085)

摘 要

本文介绍了化合物对发光菌半数抑制发光强度的毒性测定方法, 测定了几十种芳烃类化合物的毒性, 发现不同取代基或取代位置的芳烃毒性不同, 并且对发光菌的毒性与对黑呆头鱼的毒性有相关性。

关键词: 发光菌, 芳烃, 毒性测定。

化合物种类的迅速增加, 给环境造成越来越大的压力, 目前已有许多种生物实验方法用于化合物的危险评价。利用发光菌作为指示生物的方法, 是一种快速、简便、灵敏、廉价的新方法^[1,2], 并与其他水生生物测定的毒性数据有一定的相关性, 因此, 该方法对有毒化学品的筛选和评价具有重要意义, 也可作为评价环境污染物毒性的指标^[3]。

1. 原理

明亮发光杆菌 (*Photobacterium phosphoreum*) 正常生活状态下, 体内萤光素在有氧参与时, 经萤光酶的作用会产生荧光, 当受到外界因素的影响, 如化合物的毒性作用时, 发光减弱, 并呈线性相关^[4]。

2. 仪器、试剂和菌种

2.1 仪器

中科院南京土壤研究所制 DXY-2 型生物毒性测试仪或德国 BERTHOLD 公司 LUMAT LB9501 化学生物发光仪 (配有低背景试管); 恒温振荡器; 超声波清洗器; 恒温电磁搅拌器; 玻璃仪器及灭菌设备。

2.2 试剂

(1) 3%氯化钠 (分析纯) 溶液。

* 国家自然科学基金资助项目; 参加本项工作的还有张新丽, 赫奕同志。

(2) 培养液: 酵母浸出汁 0.5g, 胰蛋白胨 0.5g, NaCl 3g, Na_2HPO_4 0.5g, KH_2PO_4 0.1g, 甘油 0.3g, 加蒸馏水至 100ml, $\text{pH}=7\pm 0.5$; 如果加 1.6g 琼脂粉则制成固体斜面。

(3) 待测化合物用 3%NaCl 溶液配成适当浓度, 经超声波溶解, 对于 $\lg K_{ow}>4$ 的有机物, 先配成丙酮溶液, 转入容量瓶, 用氮气吹干, 再加 3%NaCl 超声溶解并定容, 均配成有机物溶解度以下。

2.3 菌种

明亮发光菌 T₃ 变种, 购自中科院南京土壤所微生物室。

3. 操作步骤

3.1 菌种的培养

将冻干粉用 0.5ml 3%NaCl 悬浮, 转入 50ml 培养液, 20℃ 培养 24h, 或由保存的斜面菌种接到新斜面上, 20℃ 培养 24h, 转接第二斜面, 同样再转第三斜面上, 24h 培养后置 4℃ 冰箱备用。挑取一接种环菌种接入内有 50ml 培养液的 150ml 三角瓶中, 振荡培养 16h 左右, 为培养好的菌液。

3.2 发光菌半数发光抑制浓度 EC_{50} 的测定^[4]

待测化合物配成 5 个以上的浓度等级, 各取 2ml 加入具塞磨口比色管 ($\phi 1.2\text{cm}$, h 5cm), 以 2ml 3%NaCl 作空白对照, 各三个平行。将培养好的菌液 1ml 用 200ml 3%NaCl 溶液稀释混匀, 迅速取 0.5ml 于各比色管中, 加塞上下振摇 10 次, 去塞, 于 15min 或 30min 用生物毒性测试仪测定发光强度。或直接将冻干粉 5mg 加 1ml 2%NaCl 混匀, 在 3℃ 下复苏 3min, 然后用 3%NaCl 稀释 10 倍, 0.1ml 菌液与 0.9ml 试样液混合 10min, 测发光强度。王子健、马梅等用此方法测定复杂环境样品的毒性, 也获得有意义的结果。

4. 计算方法

记录样品管和对照管的发光强度, 求:

$$\text{相对发光率} = \frac{\text{样品管发光强度}}{\text{对照管发光强度}} \times 100\%$$

将浓度对数和相对发光率进行回归分析, 用直线内插法求出相对发光率为 50% 时对应的化合物浓度, 即 EC_{50} 值。

5. 实例介绍

(1) 测定了十三种氯代芳烃对发光菌半数发光抑制浓度, 其 $\lg \text{EC}_{50}$ 值列于表 1。

(2) 研究 27 种硝基芳烃对发光菌的毒性, 结果显示, 测定 15min 和 30min 的发光强度, 以及用直线内插法或回归方程计算的数值基本一致, 并且取代基种类或取代位置不同, 其毒性不同, 如表 2 所示。如含一个硝基的芳烃中, 毒性顺序为: 邻位, $\text{NO}_2 > \text{Cl} > \text{NH}_2 > \text{OH} > \text{OCH}_3$; 间位, $\text{NO}_2 > \text{CH}_3 > \text{Br} > \text{OCH}_3 > \text{Cl} > \text{OH} > \text{NH}_2$; 对位, $\text{Br} > \text{NO}_2 > \text{OCH}_3 > \text{CH}_3 > \text{NH}_2 > \text{Cl} > \text{OH}$ 。比较 17 种硝基芳烃对发光菌的 15min EC_{50} 值与文献中对黑呆头鱼 (*Fathead minnow*) 的 LC_{50} 值之间有较好的相关性, 据此相关方程, 以 21 种硝基芳烃对发光菌的 EC_{50} 值, 预测对黑呆头鱼的 LC_{50} 值, 结果与文献报导相近。

表 1 氯代芳烃对发光菌的毒性 ($-lg EC_{50}$)Table 1 Toxicity ($-lg EC_{50}$) of the chlorinated benzens to *Photobacterium phosphoreum*

化 合 物	$-lg EC_{50}$	化 合 物	$-lg EC_{50}$
1,2,4,5-四氯苯	5.51	对-溴氯苯	4.50
1,2,4-三氯苯	4.50	2,4,5-三氯甲苯	4.86
1,2,3-三氯苯	4.53	2,5-二氯甲苯	4.38
1,4-二氯苯	4.39	对-氯甲苯	3.88
1,3-二氯苯	4.24	对-硝基氯苯	3.94
1,2-二氯苯	4.38	间-硝基氯苯	4.05
氯苯	3.86		

表 2 硝基芳烃对发光菌的毒性数据 (15min EC_{50})¹⁾Table 2 Toxicity data of aromatic nitro-compounds to *Photobacterium phosphoreum*

化 合 物	$lg 1/EC_{50}$ (mol/l)	化 合 物	$lg 1/EC_{50}$ (mol/l)
硝基苯	3.26	间-硝基溴苯	4.41
邻-二硝基苯	5.86	对-硝基溴苯	5.97
间-二硝基苯	4.26	邻-硝基苯胺	3.71
对-二硝基苯	5.81	间-硝基苯胺	3.21
间-硝基甲苯	4.51	对-硝基苯胺	3.97
对-硝基甲苯	3.99	2,4-二硝基苯胺	3.51
2,4-二硝基甲苯	4.64	邻-硝基苯酚	3.53
2,6-二硝基甲苯	4.27	间-硝基苯酚	3.34
邻-硝基氯苯	3.97	对-硝基苯酚	3.70
间-硝基氯苯	3.81	邻-硝基苯甲醛	3.50
对-硝基氯苯	3.94	间-硝基苯甲醛	4.12
2,5-二氯硝基苯	4.22	对-硝基苯甲醛	5.32
3,4-二氯硝基苯	4.11	α -硝基萘	4.79
2,4-二硝基氯苯	5.58		

1) 直线内插法

6. 注意事项

- (1) 菌种需定期转接, 斜面、菌液等避光保存。
- (2) 发光菌发光不太稳定, 因时间、温度、菌量等的改变而变化, 室温每改变 $1^{\circ}C$, 发光强度将改变 10%。
- (3) 最好是使用对数生长期的菌液, 发光强度大约 800—1200 读数之间。
- (4) 难溶、易光解、易挥发的化合物需格外注意。

参 考 文 献

- [1] Ribo J M et al. , 1983. Effects of Selected Chemicals to Photoluminescent Bacteria and their Conditions with Acute and Sublethal Effects on Other Organisms. *Chemosphere*, 12 : 1421
- [2] De Zwart D. et al. , 1983. The Microtox as an Alternative Assay in the Acute Toxicity Assessment of Water Pollutants. *Aquat. Toxicology*, 4 : 129
- [3] 顾宗藻, 1987. 发光细菌法检测水土环境毒性的进展和评价. 环境科学与技术, (2) : 2
- [4] 中国科学院南京土壤研究所, 1991. 生物毒性测试仪简介

DETERMINATION OF TOXICITY OF CHEMICALS
TO PHOTOLUMINESCENT BACTERIA

Yuan Xing Lang Peizhen

(Department of Environmental Sciences, Northeastern Normal University, Changchun, 130024)

Hong Hu Zhao Yuanhui Han Shuokun Wang Liansheng

(Department of Environmental Sciences and Engineering, Nanjing University, Nanjing, 210008)

Ma Mei Wang Zijiang

(Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100085)

ABSTRACT

This paper reported the determination of EC_{50} of chemical to *Photobacterium Phosphoreum*. The toxicities of decades substituted aromatic hydrocarbons was detected. The results showed that the toxicities were different with different substituent groups and the site of substitution. A relationship between the EC_{50} to *Photobacterium Phosphoreum* and the LC_{50} to *Fathead minnow* was found.

Keywords: photoluminescent bacteria, aromatic hydrocarbons, determination of toxicity.