

明亮发光杆菌 T3 法——发光细菌的急性毒性试验

发光细菌作为毒性检测的生物学方法，因其简便、快速、灵敏且成本较低而日益受到重视。本试验项目推荐两个方法。一为国家环境保护局于 1995 年发布的发光细菌法（GB/T15441-1995），采用的是海洋发光细菌菌种；二为淡水发光菌法，采用的是淡水型发光菌种。本方法适用工业废水、纳污水体及实验室条件下，可溶性化学物质的水质急性毒性监测。

1. 原理

基于发光细菌相对发光度与水样毒性组分总浓度呈显著负相关（ $P \leq 0.05$ ），因而可通过生物发光光度计测定水样的相对发光度，以此表示其急性水平。

水质急性毒性水平可按选用相当的参比物氯化汞浓度（以 mg/L 为单位）来表征，或选用 EC50 值（半数有效浓度，以样品液百分浓度为单位）来表征。

2. 样品的采集与保存

①采样瓶使用聚四氟乙烯衬垫的玻璃瓶，务必清洁、干燥。采集水样时，瓶内应充满水样不留空气。采样后，用塑胶带将瓶口密封。

②毒性测定应在采样后 6h 内进行。否则应在 2-5°C 下保存样品，但不得超过 24h。报告中应写明水样采集时间和测定时间。

③对于含固体悬浮物的样品须离心或过滤去除，以免干扰测定。

3. 仪器设备

①生物发光光度计：配置 2ml 或 5ml 测试管。

当氯化汞标准溶液浓度为 0.10mg/L 时，发光细菌的相对发光度为 50%，其误差不超过±10%。

②2ml 或 5ml 测试样品管（具标准磨口塞，为制造比色管的玻璃料制作，由专业玻璃仪器厂制造），分别适用于相应型号的生物发光光度计。

③微量注射器：10 μ l。 ④注射器：1ml。

⑤定量加液瓶：5ml。 ⑥吸管：2ml、10ml、25ml。

⑦试剂瓶：100ml。 ⑧量筒：100ml、500ml。

⑨棕色容量瓶：50ml、250ml、1000ml。 ⑩半微量滴定管（配磨口试液瓶，全套仪器均为棕色）：10ml。

4. 试剂和材料

除另有说明外，本方法所用试剂均应为符合国家标准分析纯试剂、蒸馏水或同等纯度的水。

①氯化汞 HgCl₂。

②氯化钠 NaCl，化学纯。

③明亮发光杆菌 T₃ 小种（Photobacterium phosphoreum T₃spp.）冻干粉（公司产品），安瓶瓶包装，每瓶 0.5g，在 2-5°C 冰箱内有效保存期为 6 个月。密度不低于每克 800 万个细胞；当按 5(3)④步骤将冻干粉复苏 2min 后即发光（可在暗室内检验，肉眼应见微光），稀释成工作液后每毫升菌液不低于 1.6 万个细胞（5ml 测试管）或 2 万个细胞（2ml 测试管）（均为稀释平板法测定）。在生物发光光度计上测出的初始发光量应在 600-1900mV 之间，低于 600mV 允许将倍率调至“×2”档，高于 1900mV 允许将倍率调整至“×0.5”档。仍达不到标准者，更换冻干粉。

④氯化钠溶液，3g/100ml：氯化钠 3g 于玻璃容器内，用量筒加蒸馏水 100ml。（需要使用者自己配制）

⑤氯化钠溶液，2g/100ml 氯化钠 2g，2-5°C 保存。（本公司已经附带了 10ml）

⑥参比物氯化汞标准溶液：0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.12、0.14、0.18、0.20、0.22、0.24mg/L。

⑦氯化汞母液， $\rho=2000\text{mg/L}$ ：1/万分析天平精确密封保存良好的无结晶水氯化汞 0.1000g 于 50ml 容量瓶中，用 3g/100ml 氯化钠溶液稀释至刻度，置 2-5°C 冰箱备用，保存期 6 个月。

⑧氯化汞工作液， $\rho=2\text{mg/L}$ ：用移液管吸氯化汞 2000mg/L 母液 10ml 于 1000ml 容量瓶中，用 3g/100ml 氯化钠溶液定容。再用移液管吸取氯化汞 20mg/L 液 25ml 于 250ml 容量瓶中，用 3g/100ml 氯化钠溶液定容。将此液倒入配有半微量滴定管的试液瓶，然后用 3g/100ml 氯化钠溶液将氯化汞 2mg/L 溶液按表 5-3-6 稀释成系列浓度（一律采用 50ml 容量瓶）。氯化汞工作液保存期不能超过 24h，超过者务必重配。

5. 试验程序

(1) 稀释样品液

① 样品液测定前稀释的条件：

样品液预试验：取事先加氯化钠至 3g/100ml 浓度的样品母液 2ml 装入样品管，并设一支 CK 管（氯化钠 3g/100ml 溶液），按 4②—③ 所述测定相对发光度。

若测得的样品，相对发光度低于 50% 乃至零，欲以 EC50 表达结果，则需稀释。

若测得的样品，相对发光度在 1% 以上，欲以与相对发光度相当的氯化汞浓度表达结果，则不需稀释。

② 样品液的稀释液：样品液的稀释液一律用蒸馏水，在定容前一律按构成氯化钠 3g/100ml 的浓度添加氯化钠或浓溶液（母液只能加固体）。

③ 样品液稀释浓度的选择：

预试验：按对数系列将样品液稀释成五个浓度：100%、10%、1%、0.1%、0.01%（其对数依次为 0、-1、-2、-3、-4），按 5(2) 和 5(3) 所述粗测一遍，视 1% - 100% 相对发光度落在哪一浓度范围。

正式试验：在 1% - 100% 相对发光度所落在的浓度范围内增配到 6-9 个浓度（例如，若落在 0.1% - 10% 之间，则应稀释成 0.1%、0.25%、0.5%、0.75%、1%、2.5%、5%、7.5%、10%；若落在 1% - 10% 之间，则应稀释成 1%、2%、4%、6%、8%、10%），按 5(2) - (3) 所述再测一遍；这 6-9 个浓度，也可通过查对数表，按等对数间距原则自行确定（例如，若落在 1% - 10% 之间，则应稀释成 10%、6.31%、3.98%、2.51%、1.58%、1.00% 其对数相应为 1.00、0.80、0.60、0.40、0.20、0.00，对数间距均为 0.2）。

(2) 测定条件

① 室温：20-25°C。

同一批样品在测定过程中要求温度波动不超过 $\pm 1^\circ\text{C}$ ，且所有测试器皿及试剂、溶液测前 1h 均置于控温的测试室内。

② pH：若需测定包括 pH 影响在内的急性毒性，不应调节待测样品 pH。

若需测定排除 pH 影响在内的急性毒性，需在测定前将待测样品和 CK（氯化钠 3g/100ml）的 pH 调至下值：主要含 Cu 的水样为 4.5，主要含其他金属的水样为 5.4，主要含有机化合物的水样为 7.0。

③ 溶解氧：本法只能测定包括溶解氧影响在内的急性毒性。

(3) 测定步骤

①试管的排列：于塑料或铁制试管架上按以下两种情况排列测试管。

a. 按 5(1)①所述，样品母液相对发光度为 1% 以上者，如下排列：

左侧放参比物氯化汞系列浓度溶液管，右侧放样品管。前排放氯化汞溶液和样品管，后一排放对照（CK）管，后二排放 CK 预试验管。每管氯化汞或样品液均配一管 CK（氯化钠 3g/100ml 蒸馏水溶液）。设三次重复。每测一批样品，均需同时配置测定系列浓度氯化汞标准溶液。

b. 按 5(1)①所述，样品母液相对发光度为 50% 以下乃至零者，如下排列：

左侧仅放氯化汞 0.10mg/L 溶液管（作为检验发光细菌活性是否正常的参比物浓度，其反应 15min 后的相对发光度应在 50% 左右），右侧放样品稀释液管（从低浓度到高浓度依次排列）。其他同 a。每测一批样品，均需同时配测氯化汞 0.10mg/L 溶液。

②加 3g/100ml 氯化钠溶液：用 5ml 的定量加液瓶给每支 CK 管加 2ml 或 5ml 氯化钠 3g/100ml（据仪器型号而定）。

③加样品液：用 2ml 或 5ml 吸管给每支样品管加 2ml 或 5ml 样品液（据 5(3)②而定）。每个样品号换一支吸管。

④发光细菌冻干菌剂复苏

从冰箱冷藏室 2-5°C 取出含有 0.5g 发光细菌冻干粉安瓿瓶和氯化钠溶液，投入置有冰块 1-1.5L 保温瓶，用 1ml 注射器吸取 0.5ml 冷的氯化钠 2g/100ml（适用于 5ml 测试管）或 1ml 冷的 2.5% 氯化钠（适用于 2ml 测试管）注入已开口的冻干粉安瓿瓶，务必充分混匀。2min 后菌即复苏发光（可在暗室内检验，肉眼应见微光）。备用。

⑤仪器的预热和调零：打开生物发光光度计电源，预热 15min，调零，备用。

⑥检验复苏发光细菌冻干粉质量：另取一空 2ml 或 5ml 测试管加 2ml 或 5ml 氯化钠 3g/100ml（据 5(3)②而定），加 10 μ l 复发光菌液，盖上瓶塞，用手颠倒五次以达均匀。拔去瓶塞，将该管放入各自型号仪器测试舱内，若发光量立即显示（或经过 5-10min 上升到）600mV 以上，此瓶冻干粉可用于测试，低于者按 4③处理。菌液发光量先缓慢上升，约持续 5-15min，后缓慢下降，约持续 4h。满 4h 的 CK 发光量应不低于 400mV，低于者更换冻干粉。

⑦给各测试管加复苏菌液：在发光菌液复苏稳定（约 0.5h）后，按 5(3)所述，从左到右，按氯化汞或样品管（前）-CK 管（后）-氯化汞或样品管（前）-CK 管（后）... 顺序，用 10 μ l 微量注射器（勿用定量加液器以减少误差）准确吸取 10 μ l 复苏菌液，逐一加入各管，盖上瓶塞，用手颠倒五次，拔去瓶塞，放回原位（每管加菌液间隔时间勿短于 30s。每管在加菌液的当时务必精确计时，记录到秒，即为样品与发光菌反应起始时间。立即将此时间加 15min，记作各管反应终止（即应该读发光量）的时间。

⑧发光细菌与样品反应达到终止时间的读数：按各管原来加菌液的先后顺序，当某管达到记录的反应终止时间，在不加瓶塞的情况下，立即将测试管放入仪器测试舱，读出其发光量（以光信号转化的电信号—电压毫伏数表示）。

⑨有色样品测定干扰的校正：

a. 拿掉仪器样品舱上的黑色塑料管口；

b. 取 - 2ml 测试管（直径 12mm），加氯化钠 3g/ml 溶液 2ml，将该管放进一装有少量氯化钠 3g/100ml 溶液的 5ml 管（直径 20mm）内，要使外管与内管的氯化钠 3g/100ml 液面平齐。此作 CK 管；

c. 另取一 2ml 测试管，加氯化钠 3g/ml 溶液 2ml，放入另一装有少量有色待测样品液的 5ml 管内，要使外管与内管的氯化钠 3g/ml 液面平齐。此作 CKc 管；

d. 于 CK 和 CKc 二管的内管中同时加复苏发光菌液 10 μ l（注意：必须是本批样品测

定所用同一瓶复苏菌液），立即记时到秒，等反应满 15min，迅速放入仪器测试舱，测定两支带有内管的 5ml 测试管的发光量。分别记下发光量 L1(CK 管) 和 L2(CKc 管)；

e. 计算因颜色引起的发光量 (mV) 校正值 $\Delta L = L_1 - L_2$;

f. 按 5(3)⑦和 5(3)⑧所述常规步骤测试带色样品管及其 CK 管 (氯化钠 3g/100ml 溶液) 的发光量 (mV)。所有 CK 管测得之发光量 (mV) 均须减去校正值 ΔL (mV) 后才能作为 CK 发光量 (mV)。

有色样品溶液测定干扰的校正示意图见图 5-3-1。

6. 质量保证与质量控制

①每支发光菌的发光强度和稳定性不尽相同, 同批样品测定过程中应使用同一支发光菌, 如果需做氯化汞标准曲线, 也应与样品使用同一支发光菌。如果一支不够用, 可采用同批的两支混合后使用。

②国际上一般通用反应时间为 5min 或 15min 两种, 鉴于我国目前所用发光杆菌的灵敏度和稳定性, 采用 15min。

③三次重复测定结果相对偏差确定为 $\leq 1\%$ 。

④测定应在采集样品后立即进行, 在 6h 内不能测定应低温保存, 但不得超过 24h。

⑤关于样品如何稀释的问题, 一般根据样品毒性大小决定, 但是在试验中至少要选择六个不同浓度。如果六个浓度的相对发光度在 1%-100% 之外, 可增配若干个浓度, 使之落在 1%-100% 相对发光度范围内, 以求相关方程。

⑥如果样品浓度为最高极限浓度 (即 100%) 时, 其相对发光率都不能使发光强度减少 50%, 则对样品的 EC50 值只能示为 $> 100\%$ 。

⑦鉴于发光细菌法实验因素的影响, 实验结果具有一定误差。在评价毒物的剂量一效应关系时, 应确定 95% 置信区间, 即 $T = a + bC \pm 2SE$ (SE 为剩余标准差), 以此求出的 EC50 也有一定的区间, 可根据这些结果确定实验结果的准确性和真实性。对于实验结果的重现性, 就大多数而言, 一般 EC50 值的变异系数在 6% - 10%。

7. 测试结果的表达

1) 计算样品相对发光度 (%), 并算出平均值:

相对发光度 (%) = 氯化汞管或样品管发光量 (mV) / CK 管发光量 (mV) $\times 100$

相对发光度 (%) 平均值 = (重复 1) (%) + (重复 2) (%) + (重复 3) (%) / 3

2) 符合 5(1)①中样品母液相对发光度在 1% 以上者, 建立并检验氯化汞浓度 (C) 与其相对发光度 (T, %) 均值的相关方程, 也可以绘制关系曲线。

①求出一元一次线性回归方程的 a (截距)、b (斜率、回归系数) 和 r (相关系数), 列出方程:

$T = a + bC$ 氯化汞

查相关系数显著水平 (P 值) 表, 检验所求 r 值的显著水平。若 $P \leq 0.01$, 且 $EC_{50} \text{ 氯化汞} = 0.10 \text{ mg/L} \pm 0.02 \text{ mg/L}$, 则所求相关方程成立; 反之, 不能成立, 必须重测系列氯化汞浓度的发光量。氯化汞溶液配制过夜者, 必须重配后再测定。

②也可以据建立的上述方程绘制关系曲线。即指定发光度为 10% 和 90%, 代入上式, 求出相应的二个氯化汞浓度, 在常数坐标纸上, 定出二点, 画一直线, 即为符合该方程的氯化汞浓度与相对发光度的关系曲线。

3) 符合 5(1)①中样品母液相对发光度低于 50% 乃至零, 欲以 EC50 表示结果者, 建立并检验样品稀释浓度 (C) 与其相对发光度 (T) 均值的相关方程, 绘制关系曲线。

按 7 之 2) 所述方法建立相关方程 $T = a + bC$ 样, 并检验相关系数 r、显著水平 (P 值)。

若 $P \leq 0.05$, 则所求相关方程成立; 反之, 不能成立, 必须重测样品稀释系列浓度的发光量。

8. 结果评价和报告

(1)用氯化汞浓度表达样品毒性

1)适用的条件：符合条件（样品母液相对发光度 > 1%）并按 7 之 2)建立了合格（ $P \leq 0.01$ 、 EC_{50} 氯化汞 = $0.10 \text{ mg/L} \pm 0.02 \text{ mg/L}$ ）的氯化汞浓度与其相对发光度相关方程者。

2) 表达方法：

①将测得的样品相对发光度，代入 7 之 2)的相关方程，求出与样品急性毒性相当的氯化汞浓度（一般用 mg/L）表示。

②测试结果报告同时列举样品相对发光度及其相当的氯化汞浓度值。

3)适用性：适用于相对发光度在 1% 以上，特别是 50% 以上（即不可能出现 EC_{50} 值）但低于 100%（即仍有中、低水平毒性）的样品毒性测定。

(2)用 EC_{50} 值表达样品毒性

1)适用的条件：符合条件（样品母液相对发光度低于 50% 乃至零）并按 7 之 3)建立了合格（ $P \leq 0.01$ ）的样品稀释液浓度与其相对发光度相关方程者。

2) 表达方法：

①将 T 代入 7 之 3)建立的相关方程，求出样品的 EC_{50} 值。这里的 EC_{50} 值以样品的稀释浓度（一般用百分浓度）表示。

②测试结果报告列举样品的 EC_{50} 值。

3) 适用性：适用于相对发光度在 50% 以下，特别是零（即毒性水平较高或很高）的样品毒性测定，后者无法以相当的氯化汞浓度表达毒性。

(3) 测定记录格式（见表 5-3-8）

(4) 测定结果报告

①实验室室温。

②采样地点、日期、时间。

③氯化汞浓度或样品稀释百分浓度与相对发光度的相关方程：

$$T = a + bC$$

$$r = P \leq EC_{50 \text{ 氯化汞}} = \text{mg/L}$$

$$L = a + bC \quad a = b =$$

$$\text{回归方程 } r = P <$$

④样品 EC_{50} 值（稀释百分浓度）或相对发光度（%）及相当的氯化汞浓度（mg/L）。