

# 有色样品在发光细菌测试研究中的可能和局限性

- I. Jäger, C. Hafner, C. Hercher Hydrotox 公司(德国)  
 G. Sanna, C. Pezzella Neapel 大学(意大利)  
 E. Mois, M. Cludts Celabor srl(比利时)  
 C. Junghans, D. Schlosser UFZ 莱比锡(德国)  
 C. Prunty Questor 中心(英国)  
 A. Jarosz-Wilkolazka, A. Olszewska 卢布林大学(波兰)  
 K. Yesiladali 伊斯坦布尔技术大学(土耳其)  
 E. Enaud, S. Vanhulle 鲁汶大学(比利时)

**摘要:**研究了废水净化和新型染料开发的新方法 除废水脱色和工业适用性外,毒性测试也必不可少 作为筛选,发光细菌测试适用于迅速评价有色样品的毒性,且成本低廉。

**关键词:**发光细菌测试,有色样品,废水,染料,毒性测试

欧洲研究项目“SOPHIED——欧洲颜色行业的新型可持续生物工艺”的框架有3个主要目标:

- 生物技术脱毒和纺织品废水脱色;
- 传统染料环境友好型生物技术开发;
- 生物技术的发展和新型染料的合成。

为此,在项目估量工作包中,对新开发的废水净化就染料所涉及(生态)毒性和工业质量的脱毒及脱色方面作出了评价。包括选择合适的测试方法测试染料和废水的毒性及生态毒性。因此测试方法必须满足以下要求:

- 为有效方法,在可能的情况下被定向至标准化过程;
- 当样品数量很大时,测试过程应快速、经济;

- 当只有数量有限的样品材料可供使用时,测试过程应几乎无需材料;

- 测试过程必须适用于深色染色样品的评价;

- 参与合作的伙伴在技术上必须能够在其实验室中建立此测试过程。

发光细菌测试被选为生态毒性研究的首个筛选测试。此测试用于环境样品毒性研究的生物测试。遵照 ISO 1134-2(2007),发光细菌测试被标准化地应用于废水中。测试被普遍公认,也被 OSPAR 工作组“整体污水评估”(WEA)推荐作为废水研究的细菌测试(OSPAR, 2000, 2005, 2007)。在不同欧洲国家(如比利时、爱尔兰、葡萄牙、德国、荷兰、瑞典、英国,OSPAR, 2007)的废水框架中,

发光细菌测试以标准化形式已被使用多年。该测试执行简单,在简短的指令后,可迅速、经济地付诸实施,且仅需少量样品( $\geq 10$  ml 或 50 mg)。有色样品可利用颜色校正试管或在更新的仪器中通过综合自动测量并计算吸附量。

## 1 方法

发光细菌测试为生物测试过程。该测试过程中,水内有毒物质的累积影响可在没有任何确切成分或个别物质的生态毒性下测量(EC50——浓度影响或 IC50——抑制浓度)。测试基于一个事实,即毒素可以减少海洋细菌 *Vibrio fischeri* 的正常发光。发射光的减少与毒素的浓度成正比,并可用光度计测量。

### 1.1 有色样品

有色样品必须予以颜色校正,否则可能得到假阳性结果,因为染料分子通过细菌可自身吸收发射光。可以利用相对繁琐的颜色校正试管手动进行颜色校正或用仪

器中的颜色校正集成工具自动进行颜色校正。因此在细菌发光被测定前,样品吸收首次细菌发射光的波长范围(490 nm)内被测量,自动计算吸附和发射。在该项目的框架中使用了光度计“LUMISTox 300”(Hach Lange 公司 LPV 321)。可自动进行颜色校正。

## 1.2 样品制备

废水样品可在 2 ~ 5°C 的电冰箱中存储长达 24 h,在 -18°C 下存储 2 个月(EN ISO 5667-16, 1999)。航运时,样品必须放在带有冷却元件或干冰的绝缘包装(例如泡沫聚苯乙烯盒)中全天快递运输。运输过程中不能解冻样品。

测试前,在室温下解冻冷冻样品。测量电导率、pH 值和光密度(OD)。若 pH 值在 6 ~ 8.5 之间,无需调整。其他情况下,用 HCl 或 NaOH 调整 pH 值至  $7.0 \pm 0.2$ 。因为所使用的细菌为海洋细菌,所以当样品的电导率低于 35 mS/cm 时,可添加氯化钠至 2%。鉴于进行颜色校正的可能性受限,样品的

光密度(490 nm)必须最大化至 1.8。否则必须通过原液浓缩或用 2% 的 NaCl 进行适当调整。

## 1.3 测试性能

测试采用海洋发光细菌 *Vibrio fisheri*。将购买的细菌冻干(Nr. Hach Lange 公司 LCK 482)。生产商采用二氯酚、硫酸锌和重铬酸钾来控制每批细菌的敏感性。在预定浓度下测量抑制值,并在检测报告给出。

首次筛选,在最大可能测试浓度(对应的光密度为 1.8)下测量染料的抑制效应。为确定 EC50,用 2% NaCl 溶液以几何级数对样品进行稀释。解冻 12 ml 的再水化液(Hach Lange 公司:LCX047)并保存于 15°C LUMIST 热块中

(Hach Lange 公司 LZV 093)。在约 500  $\mu$ l 的再水化液中溶解已在 -20°C 储存的液体干燥细菌,然后转移到约 11.5 ml 的残留体积中。500  $\mu$ l 的细菌悬液于 15°C, 15 min 后将其转移

到试管中(Hach Lange 公司 LZP 187)。

再经 15 min 后开始测量。每个浓度重复测量两次。首先测量未放样品时的光发射,然后添加样品并在 15°C 下孵化 30 min。测定光发射  $t_{30}$  值。利用 LUMISTox 软件(Hach Lange 公司 LZV 093),自动计算每个样品的抑制值(%),必须同时考虑颜色校正。

## 1.4 结果评价

在结果的评价中确定校正因子,这验证了测量的有效性。其值必须介于 0.6 ~ 1.8 之间。否则测

表 2 染料检测

名称	CAS-号
分散染料	
分散红 1	2872-52-8
分散蓝 1	2475-45-8
分散黄 1	2832-40-8
活性染料	
活性蓝 19	2580-78-1
活性黑 5	17059-24-8
活性红 4	17681-50-4
活性黄 81	59112-78-6
直接染料	
直接红 R	573-58-0
直接蓝 1	2610-05-1
直接黑 38	1937-37-7
酸性染料	
酸性蓝 62	4368-56-3
酸性红 299	57741-47-6

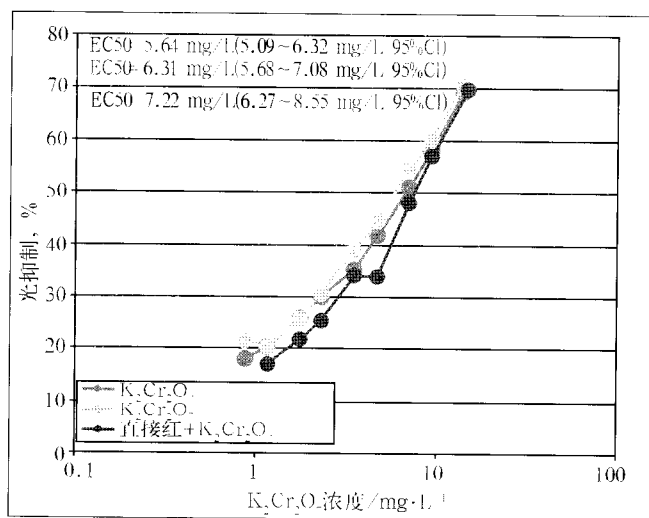


图 1 EC50 重铬酸钾的测定

量无效,不得列入结果评价中。此外,两个平行测量之间的方差必须小于3%。

根据抑制数据(%)作剂量-效应曲线,利用最大似然回归进行概率值变换后,在一定置信区间计算EC50。在研究框架中使用统计学软件ToxRat(ToxRat-Solutions, 2004)。

## 1.5 测试方法的有效性

由于SOPHIED项目框架中的测试是在几个不同的实验室内实施,为了确保结果的有效性和可比性开发了室内质量控制。为此,每一个实验室通过在2%的NaCl溶液中加入K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>,在14, 9.3, 7, 4.6, 3.5, 2.3, 1.8, 1.75和1.16 mg/L的测试浓度下,作剂量-效应曲线。此外,在相同K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>浓度范围内添加25 mg/L的直接红R(CAS号573-58-0)测量曲线,以便检验颜色校正的正确性。

## 1.6 废水

4种模式的废水样品用微生物或酶进行不同处理,以获得样品的脱色和脱毒(表1)。在发光细菌测试中给出了样品的毒性即抑制值(%)。因此,平行测定未处理样品作为对照样,即样品在处理前后都进行测试。

## 1.7 染料

12种不同的商业染料及项目所开发的新型纺织品染料应用于此发光细菌测试研究。为了包括4类最重要的染料化学基团,所选染料为分散染料、活性染料、酸性染料和直接染料(表2)。代表了最重要和最常见的化学结构,如单-,双-和三-偶氮染料,蒽醌和铬

表3 废水样品结果

废水样品	处 理	与对照样相比的残留毒性, %
酸性染浴(羊毛)	菌株 PS344	108.4
酸性染浴(羊毛)	菌株 GS333	100.2
酸性染浴(羊毛)	菌株 PO332	6.3
酸性染浴(羊毛)	菌株 PO332 EM	1.1
酸性染浴(羊毛)	活性污泥	52.5
酸性染浴(羊毛)	漆酶	36.2
酸性染浴(皮革)	菌株 PS344	54.8
酸性染浴(皮革)	菌株 GS333	98.0
直接染浴	菌株 PS344	93.6
直接染浴	菌株 GS333	88.4
直接染浴	活性污泥	21.8
活性染浴	菌株 PS344	100.6
活性染浴	菌株 GS333	101.2
活性染浴	活性污泥	102.8

表4 染料样品结果

名 称	CAS-号	浓度/mg · L <sup>-1</sup>	光密度	pH	电导率/μS · cm <sup>-1</sup>	抑制, %
分散染料						
分散红 1	2872-52-8	有限溶解度	23	5.4	3.6	61.3
饱和溶液						
分散蓝 1	2475-45-8	145	1 867	7.4	540	66.1
分散黄 3	2832-40-8	260	1 800	6.6	364	48.2
活性染料						
活性蓝 19	2580-78-1	1 002	1 865	5.7	860	32.1
活性黑 5	17059-24-8	170	1 862	4.8	1 513	9.2
活性红 4	17681-50-4	252	1 526	7.2	818	25.9
活性黄 81	59112-78-6	801	1 794	4.4	1 986	24.5
直接染料						
直接红 R	573-58-0	40	1 794	9.3	259	3.4
直接蓝 1	2610-05-1	1 106	1 626	7.0	624	31.4
直接黑 38	1937-37-7	160	1 594	8.4	1 774	20.6
酸性染料						
酸性蓝 62	4368-56-3	680	1 895	5.6	540	57.5
酸性红 299	57741-47-6	504	902	6.8	288	50.2

络合染料。首次筛选时,将染料溶解于去离子水中,并将光密度调至约1.8。对所选染料测定其EC50值。

## 2 结果

### 2.1 方法的有效性

就有效性方面,测定不同浓度的重铬酸钾,相同的浓度采用

25 mg/L的直接红R进行强化。使用重铬酸钾的两个示范性研究的结果和一个使用重铬酸钾和直接红R的研究如图1所示。在这两种情况下,EC50应都处于1~10 mg/L范围内。

### 2.2 废水

用微生物和酶处理4个选定的废水样品。在发光细菌测试中,废水处理前、后分别进行测试。可

表5 新开发染料结果

名称	最大可测浓度 /mg · L <sup>-2</sup>	光密度	EC50 /mg · L <sup>-2</sup>
SR1	1 000	1 800	642.7
S025	230	1 680	没有毒性
SG26	850	1 800	10.3

清楚看到,在发光细菌测试中毒性处理方法不同效果也不同(表3)。如废水样品“酸性染料”用 P0332 EM 的处理,可获得几乎完全脱毒(与对照样相比残余毒性为 1.1%)。对于其他样品,如活性染料,相反却没有脱毒性(102.8%)。

### 2.3 染料

在发光细菌测试中,共研究了 12 种商 9 用染料和 3 种新开发的染料。在筛选中初步测试了光密度约为 1.8 时的最大可测试浓度及抑制值(%)。浓度高于 1 g/L 的情况未加测试。一些染料在测试条件下水溶性差,这时使用饱和溶液,通过离心过滤除去未溶解的物质。

对于水溶性差的染料,在最大可测量光密度范围内并不总是可行的,因为不是总能达到此值。在发光细菌测试中染料抑制的测量处于 9.2% ~ 61.3% 之间(表4)。表5中,可找到新开发染料的 EC50。

对于选定的染料,研究了几个合适的测试浓度生成剂量 - 效应曲线,并利用统计程序 ToxRat 计算 EC50。结果见表6。

### 3 讨论

作为快速、经济的筛选测试方法,发光细菌测试极为适合。当仪器进行颜色校正后,除了光度测量

表6 剂量响应曲线

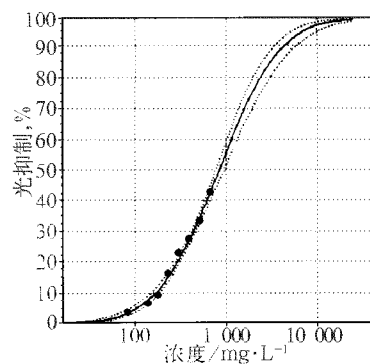
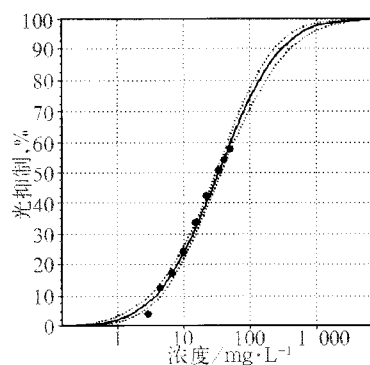
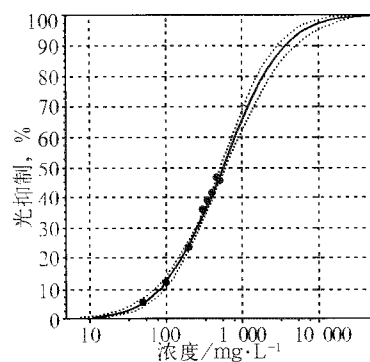
酸性红 299(NY1)  
CAS-号:57741-47-6  
原液:1 006 mg/L  
最高可测浓度:504 mg/L  
EC10: 83.2 mg/L(69.2 ~ 96.5 mg/L 95% CI)  
EC20: 159.2 mg/L(142.9 ~ 174.1 mg/L 95% CI)  
EC50: 547.6 mg/L(511.7 ~ 593.2 mg/L 95% CI)  
(利用线性最大似然回归进行概率分析)  
曲线斜率: 1.562  
Chi<sup>2</sup>: 0.006  
自由度: 6  
r<sup>2</sup>: 0.988

分散蓝 1  
CAS-号:2475-45-8  
原液:2 212 mg/L  
最高可测浓度:1 106 mg/L  
EC10: 3.7 mg/L(3.0 ~ 4.4 mg/L 95% CI)  
EC20: 7.9 mg/L(6.9 ~ 8.91 mg/L 95% CI)  
EC50: 33.1 mg/L(30.4 ~ 36.4 mg/L 95% CI)  
(利用线性最大似然回归进行概率分析)  
曲线斜率: 1.349  
Chi<sup>2</sup>: 0.016  
自由度: 7  
r<sup>2</sup>: 0.987

酸性蓝 62  
CAS-号:4368-56-3  
原液:1 336 mg/L  
最高可测浓度:666 mg/L  
EC10: 169.7 mg/L(150.1 ~ 187.7 mg/L 95% CI)  
EC20: 294.1 mg/L(274.9 ~ 312.1 mg/L 95% CI)  
EC50: 837.1 mg/L(765.3 ~ 933.3 mg/L 95% CI)  
(利用线性最大似然回归进行概率分析)  
曲线斜率: 1.847  
Chi<sup>2</sup>: 0.007  
自由度: 6  
r<sup>2</sup>: 0.987

方法,它还适用于有色环境样品和物质的研究。此外,废水样品在生物处理前后的对照是可行的。进行颜色校正的研究可以在光密度高达 1.8 时实施。因此,可测试浓度的范围有一上限值。随着有色样品逐渐变深,毒性很可能不能确定,因为当光密度大于 1.8 时各浓度的样品就不能被测量了。

在最高可测浓度下,3种测试



染料显示出没有毒性。在这些情况下,应进行另一种筛选测试。可选择 Daphnia 测试,但样品的颜色不能发挥任何作用,且 Daphnia 测试需要相当丰富的经验,首先要培养和治理,因此不能像发光测试那样简单。

对于废水样品成功处理的评价,应以%相对于对照样(处理前的废水)的减少来报道。即使在发