

重组发光菌评价废水生物毒性影响因素

黄升¹ 董剑峰² 潘浙钗³ 崔海松⁴ 阿志明⁵
杭州绿洁环境科技股份有限公司 浙江杭州 310015

摘要: 通过一系列实验对一株重组发光菌评价水中污染物毒性影响因素及前处理方法进行了研究。以重组发光菌为受试生物, 利用公司所研发的便携式综合毒性检测仪进行水中污染物毒性评价, 为水质环境毒性检测提供一种简单、快速、应用范围广的方法。对重组发光菌测试可能存在的干扰因素pH、浊度、色度、余氯等进行了研究, 分析实验结果发现以上各因素会对测试造成影响。针对以上干扰因素, 采用了一系列前处理方法, 分析实验结果发现双管校正法可以消除色度干扰, 过滤离心可以消除浊度干扰, 硫代硫酸钠去余氯可以消除余氯干扰, 且可以根据测试需求确定是否需要调整pH后进行测试。

关键词: 重组发光菌; 废水生物毒性; 前处理

Evaluation of biotoxicity factors of wastewater by recombinant luminescent bacteria

Sheng Huang¹, Jianfeng Dong², Zhechai Pan³, Haisong Cui⁴, Zhiming A⁵
Hangzhou Lvjie Environmental Technology Co., LTD., Hangzhou 310015, China

Abstract: A series of experiments were carried out to study the pretreatment method of recombinant luminescent bacteria to evaluate the toxicity of pollutants in water. Taking the recombinant luminescent bacteria as the test organism, the portable comprehensive toxicity detector developed by the company is used to evaluate the toxicity of pollutants in water, providing a simple, rapid, and widely used method for environmental toxicity detection of water quality. The interference factors, such as pH, turbidity, chroma, and residual chlorine, which may exist in the detection of recombinant luminescent bacteria were studied. In view of the above interference factors, a series of pre-processing methods are adopted. The experimental results show that the double tube correction method can eliminate the chromaticity interference, the filtering centrifugal method can eliminate the turbidity interference, the sodium thiosulfate can eliminate the residual chlorine interference, and the pH can be adjusted according to the test requirements.

Keywords: Recombinant luminescent bacteria; Comprehensive biological toxicity of Wastewater; Pretreatment method

重组发光菌测试过程中对盐浓度要求低, 因此可以用于较清洁水样、废水等各种水体测试。但是部分水体成分复杂且其他水质参数超出范围可能会对测试结果产生影响, 其中水样pH^[1-2]、水中余氯^[3]可能会对重组发光菌的活性造成影响, 水样浊度^[4-5]、色度^[6]可能会对荧光测试造成影响, 导致测试结果不可信。

本文参考国际、国内相关发光细菌急性毒性检测标准, 采用重组发光菌测试, 研究pH、浊度、色度、余氯

对测试结果影响及其预处理方法。

1. 材料与方法

1.1 仪器设备

便携式综合毒性检测仪 (GR8500A, 杭州绿洁)。

1.2 试剂

重组发光菌E.coli HB101 pUCD607 (由华南师范大学环境研究院提供)。

1.3 方法

1.3.1 重组发光菌的培养

LB培养液121℃高压灭菌20 min, 待培养液温度降到55℃时加入10 μL卡那霉素 (0.3 g/L)。

基金项目: 广东省应用型科技研发专项资金项目 (2015B020235012)

将重组发光菌接种于LB培养液后30℃, 150rpm振荡培养24小时左右。培养结束后9000rpm离心5分钟弃上清液, 将菌体重新悬浮于0.745% KCl溶液中, 通过调节KCl溶液量将最终菌液发光强度调整至200万左右。

1.3.2 pH对水样抑制率的影响

测试温度25℃, 按下述测试方法, 研究pH对样品抑制率影响。

a. 取4ml试管加入1000μL 0.745%KCl溶液, 此作A1管;

b. 配制pH4.5 Cu²⁺水样溶液, 再以10: 1比例加入8.2%KCl溶液, 浓度为8mg/L、12mg/L、16mg/L、20mg/L、24mg/L、28mg/L、32mg/L、36mg/L。

c. 对应取B1-B9九支4ml测试管, 分别加入500μL复苏后菌液。

d. 立即从A1管中取500μL水样加入对应B1管, B2-B9管中分别依次加入所配制的Cu²⁺水样溶液, 移液枪混匀并计时, 在15min时刻测定各支试管发光量I_{ct}、I_t。

e. 利用公式计算测试样品的抑制率H_t:

$$H_t = \frac{I_{ct} - I_t}{I_{ct}} \times 100\% \quad (1)$$

其中: I_{ct}空白的终止发光强度 (t=15min);

I_t样品的终止发光强度。

f. 将上述Cu²⁺水样pH调节至与空白一致, 并按照上述方法测试其抑制率。

1.3.3 浊度对水样抑制率的影响

按照1.3.2中方法分别测试透明水样、入高岭土浑浊水样、处理后水样的抑制率。

1.3.4 有颜色水样抑制率测试

采用双管校正法^[7]对带有色度水样抑制率进行校正测定。

①色度校正值K的确定

a. 取一650μL测试管(直径6mm), 将该管放进一装有640μL稀释液的4ml管(直径10mm)内。此作空白组;

b. 另取一650μL测试管, 放入另一装有640μL有色待测样品液的4ml管内。此作样品组;

c. 于空白组和样品组小试管中同时加入160μL复苏菌液, 分别测定空白组发光强度I₁、样品组发光强度I₂。

d. 计算发光强度色度校正值K=L₂/L₁;

②色度溶液抑制率测定

按照1.3.2中方法分别测试无色水样、加入色素水样抑制率。利用校正值K对加入色素水样各组的I_t进行校正, 然后根据公式1.3.2中公式(1)计算各组的抑制率。

1.3.5 余氯对水样抑制率测定的影响

测试方法如下:

a. 取一4ml空试管加入0.745% KCl溶液, 此作A1管;

b. 另取六支4ml测试管, 分别加入1000μL 0.005%、0.01%、0.02%NaClO溶液及其除氯后样品。采用硫代硫酸钠除氯, 添加量为100份样本加1份1%浓度的硫代硫酸钠溶液。再各加入100μL 8.2% KCl溶液, 记作A2-A7管;

c. 取B1-B7七支4ml测试管, 加入500μL复苏后菌液;

d. 从A管中取500μL液体加入对应B管, 加完后移液枪混匀, 开始计时, 在15min时刻测定各支试管当前发光量I_{ct}、I_t。

e. 根据公式(1)计算各组样品的抑制率。

2. 结果与讨论

2.1 pH对水样抑制率的影响

水样pH调节前后, 重组发光菌测试Cu²⁺浓度-抑制率结果如表1所示。

表1 Cu²⁺浓度-抑制率

Cu ²⁺ 终浓度 (mg/L)	不调节水样pH								调节水样pH							
	4	6	8	10	12	14	16	18	4	6	8	10	12	14	16	18
15min	40%	43%	47%	53%	91%	94%	96%	98%	10%	19%	26%	54%	68%	80%	87%	94%

水样pH调整后, 抑制率发生变化。若需测定包括pH影响在内的急性毒性, 不应调节水样pH; 若测定排除pH影响的急性毒性, 须将水样和空白对照组调至同一pH值。水样若pH不在6.0-8.0范围内, 如果样本的pH值低于6.0, 用NaOH溶液将其pH值调整到6.0。如果样本的pH值高于8.0, 用HCl溶液将其pH值调整到8.0^[7]。

2.2 浊度对水样抑制率的影响

检测结果如表2所示, 含毒性物质透明水样和处理后水样抑制率一致, 说明水样预处理过程不会造成溶解性有毒物质的损失, 浊度干扰会导致水样抑制率变大。

表2 浊度对有污染物水样抑制率检测影响

时间	透明水样1	浑浊水样1	处理后水样1	透明水样2	浑浊水样2	处理后水样2
15min	48%	60%	50%	53%	69%	49%

表3 色度对水样抑制率检测影响

时间	无色水样				有色水样				双管校正法测试有色水样			
	1	2	3	平均值	1	2	3	平均值	1	2	3	平均值
15min	58%	59%	60%	59%	64%	65%	64%	64.3%	58%	59%	62%	59.7%

高浑浊或者含有不沉淀颗粒物的样本会产生光吸收或光散射现象，须将样本静置1h或离心、或过滤液进行测试^[8]。

2.3 有颜色水样抑制率测试

分别用常用测试、双管校正法测试无色水样、有色水样，结果如表3中所示，色度会造成光损失，导致水样抑制率变高，而双管校正法可以修正由色度造成的光损失。

2.4 余氯对水样抑制率测定的影响

除氯前后水样抑制率测试结果如表4所示，余氯具有杀菌作用，会导致水样的抑制率变大，除氯后影响基本消失。若需测定包括氯在内的急性毒性，不应除氯，直接进行检测。若需测定余氯以外的急性毒性，需提前用硫代硫酸钠溶液去氯。

表4 不同含氯水样除氯前后抑制率变化

时间	0.005%	0.01%	0.02%	除氯水样1	除氯水样2	除氯水样3
15min	34%	54%	72%	1%	2%	1%

3. 结束语

pH、浊度、色度、余氯等都会对水样抑制率的测定产生干扰，但是通过pH调整、离心过滤、双管校正法、硫代硫酸钠去余氯等前处理方法可以基本消除上述各种因素的干扰。因此，为废水生物毒性测试提供了一种检测与预处理方法。

参考文献：

[1]Grzegorz Nałecz-Jawecki, Jozef Sawicki. Influence of pH on the toxicity of nitrophenols to Microtox and Spirotox tests, *Chemosphere* 52(2003)249 - 252.

[2]周伟杰, 韩威妹, 彭良琼, 等. pH对发光菌法测试Cr(Ⅲ)和Cr(Ⅵ)毒性的影响[J]. *皮革科学与工程*, 2017, 27(6): 5-9.

[3]宋莹. 余氯对发光菌法检测再生水生物急性毒性的影响及消除[J]. *城镇给排水*, 2015, (3): 132-135.

[4]赵洋甬, 胡建林, 邵立军. 发光菌毒性测试的影响因子研究[J]. *现代科学仪器* 2010, 6(3): 75-78.

[5]John Ashworth, Erik Nijenhuis, Bozena Glowacka, etc. Turbidity and Color Correction in the Microtox Bioassay, *The Open Environmental Pollution & Toxicology Journal*, 2010, 2, 1-7.

[6]瞿璟琰, 卢湘岳, 刘赞. 双层管用于发光细菌检测水样毒性时的色度修正[J]. *环境监测管理与技术*, 2006, 18(6): 18-20.

[7]ISO11348-3:2007, Water quality—Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test)—Part 3: Method using freeze-dried bacteria.

[8]GB15441-1995, 《水质急性毒性的测定发光细菌法》.