

利用发光菌评价 17 种染料的毒性效应^{*}

党亚爱^{1,2}, 王国栋¹, 辛宝平², 杨 敏², 李秀珍³, 李斌莲³

(1 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨陵 712100; 2 中国科学院 生态环境研究中心, 北京 100085;

3 中国石油天然气集团公司 环境检测总站, 河北 廊坊 065000)

[摘 要] 根据 1995 年国家标准规定的发光细菌法测定化合物的急性毒性标准, 测定了 17 种染料抑制发光细菌相对发光强度的 EC_{50} 值。结果表明, 碱性染料的毒性最大, 还原性染料的毒性次之, 酸性染料的毒性较小, 活性染料和直接染料的毒性最小。

[关键词] 染料; 发光细菌; 急性毒性; 水污染

[中图分类号] X171.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)03-0183-04

控制排污或确定水处理工艺时, 通常采用化学分析方法测定其中有毒有害化学物质的物理化学参数, 如色度、化学需氧量(COD)、总需氧量(TOC)及生化需氧量(BOD)等。但化学分析数据不能全面反映排水的生物毒性^[1]。美国清洁水法(CWA)中明确规定: 禁止排放毒性剂量的有毒污染物。考虑到以化学分析为主要手段的控制方法有很大的局限性, 美国环保局于 1984 年推荐了一个综合方案, 即通过化学定义的标准和全水样毒性限来控制排水质量, 后者包括若干个生物的急性和慢性毒性测试^[2,3]。

在众多生物毒性测试中, 发光细菌毒性检测作为一种快速、简便、经济的方法, 已被广泛应用^[4~6]。我国国家环保局 1995 年发布了急性毒性的测定方法——发光细菌法, 基于发光细菌相对发光强度与水样毒性组分浓度呈显著负相关(置信水平 $P \geq 0.95$), 因而可通过生物发光光度计测定水样的相对发光度, 以此表示其急性毒性水平^[7]。

本研究利用中国科学院南京土壤研究所提供的发光菌(*Photobacterium phosphoreum* sp. T₃), 对天津染料进出口公司提供的 17 种常用染料的急性毒性进行测定, 以期为我国污水排放标准的制定提供可靠的理论基础。

1 材料和方法

1.1 试验菌株

发光菌冻干粉, 购自中国科学院南京土壤研究所。

1.2 样品来源

碱性紫 5BN 等染料由天津染料进出口公司提供, 其基本性质见表 1^[8], 用 3 g/mL NaCl 溶液配制不同的浓度水平。所用 NaCl 为分析纯。

1.3 仪器

DXY-2 型生物毒性测试仪(中国科学院南京土壤研究所制造)。

1.4 试验方法

1.4.1 发光菌的激活 取一支装有冻干菌粉的安瓿瓶, 割开瓶口, 加入 2.5 g/mL 的 NaCl 溶液 0.5 mL, 使发光菌激活, 在毒性测试仪上测出的初始发光单位为 600~1900 mV, 然后将安瓿瓶放入 0℃ 冰水浴中待用。

1.4.2 样品的测试 (1) 染料毒性测定。根据初步试验的结果, 以用直线内插法确定的染料抑制发光菌相对发光强度的 EC_{50} 为中点, 各向两边延伸 3 个浓度, 共 7 个样品浓度(CKc), 每组均有空白对照(CK 管)且平行 3 个重复样进行试验, 向 2 mL CK 管及 2 mL CKc 管中同时加复苏发光菌液 10 μ L (本批样品测试用同一瓶复苏液), 立即记时到秒, 等反应 15 min 后迅速放入仪器测试舱内, 分别测定 2 mL 测试管的发光量。(2) 染料颜色的校正。取一个 2 mL 测试管(直径 12 mm), 加 3 g/mL NaCl 溶液 2 mL, 将该管放进一装有少量 3 g/mL NaCl 溶液的 5 mL 管(直径 20 mm)中, 使内外管的 NaCl 溶液液面平齐, 以此作为空白对照(CK)。另取 1 支 2 mL 测试管, 加 3 g/mL NaCl 溶液 2 mL, 放入另一装有少

* [收稿日期] 2002-12-13

[基金项目] 陕西省科技攻关项目(2002K03-G3-3)

[作者简介] 党亚爱(1975-), 女, 陕西蒲城人, 助教, 硕士, 主要从事环境工程研究。

量待测染料样品液的 5 mL 管内,使内外管的NaCl溶液液面平齐,以此作为测试管(CKc)。每种待测液及空白液各取 3 份平行样,于CK 及CKc 管的内管中同时加复苏发光菌液 10 μ L (本批样品测试用同一瓶复苏液),立即记时到秒,等反应 15 m in 后迅速放入仪器测试舱内,测定 2 只带有内管的 5 mL 测试管的发光量,分别计下 L_1 (CK)和 L_2 (CKc)。(3)试验结果较正。按(1)所述方法测试带色样品管(CKc 管)及其对照样(CK 管)的发光量,所有CK管测得之发光量均须减去较正值 $\Delta L = L_1 - L_2$ 后才能作为CK 发光量。

1 5 数据处理

因各个安瓿瓶中冻干粉发光菌的总数和活性不尽相同,不同的安瓿瓶 10 μ L 发光菌液加入同一浓度染料后所产生的发光读数有一定差别,为了更好地比较发光强度受染料影响的程度,本研究对数据进行了处理,采用了相对发光强度^[9]:

相对发光强度= 试样发光强度/对照样发光强度。

1 6 染料毒性的表示

染料毒性的大小表示为 EC₅₀,是引起发光菌 50% 相对发光强度的样品浓度。

表 1 供试染料及其性质

Table 1 Tested dyestuff and their character

染料名称 Dye's designation	化合物结构类型 Structure type of chemical compound	不溶于水的杂质含量/ (mg · g ⁻¹) The content of dissolved impurity to water
碱性紫 5BN A lkaline purple 5BN	三苯甲烷类 Three benzene methane	≤ 1.5
碱性艳蓝BO A lkaline gaudy blue BO	三苯甲烷类 Three benzene methane	≤ 1.5
还原艳紫 RK Reduce gaudy purple RK	酰胺蒽醌类 Am ine anthracene lngs of acyl	≤ 1.5
还原蓝 ER Reduce blue ER	蒽醌类 Anthracene lngs	≤ 1.5
还原红 F3B Reduce red F3B	蒽醌类 Anthracene lngs	≤ 1.5
活性紫 K3R Purple K3R of activation	单偶氮铜络合物 Single even nitrogen copper complex compound	≤ 1
活性黑 KBR Black KBR of activation	单偶氮铬、钴络合物 Single even nitrogen chromium, cobalt complex compound	≤ 1
活性艳红 X-3B Gaudy red X-3B of activation	单偶氮类 Single even nitrogen	≤ 1
活性艳蓝 KN-R Gaudy blue KN-R of activation	蒽醌类 Anthracene lngs	≤ 1
直接耐晒黑 G Able to bear tanned G directly	多偶氮类 Even nitrogen much	≤ 1.5
直接湖蓝 5B Direct lake blue 5B	双偶氮类 Pair of even nitrogen	≤ 1.5
直接黄棕 3G Yellow ish-brown 3G directly	三偶氮类 Three even nitrogen	≤ 1.5
弱酸性红 2B Weak acid red 2B	单偶氮类 Single even nitrogen	≤ 1.5
酸性湖蓝 A A cid lake blue A	三苯甲烷类 Three benzene methane	≤ 1.5
酸性媒介青 RRN A cid media blue and green RRN	单偶氮类 Single even nitrogen	≤ 1.5
溴胺酸 Brom ine am ine sour	蒽醌类 Anthracene lngs	≤ 0.5
墨绿 Blackish green	合成 Synthetic	≤ 1

2 结果与分析

2 1 发光菌的发光强度随时间的变化趋势

发光菌被激活之后,其发光强度会随时间的延长而改变,实际分析时,必须选择发光变化率较小的时刻来测试。图 1 为空白样加菌后发光强度随时间的变化情况。如图 1 所示,发光菌被激活 15 m in 左右,发光强度变化趋与平缓,因此,应选 15 m in 为试样加菌到测量发光强度的时间间隔,这与中国科学院南京土壤研究所提供的参数一致^[6]。

2 2 染料浓度和发光菌发光光强的相关性

绘制酸性湖蓝 A 染料浓度与发光菌相对发光强度的曲线,如图 2 所示。随着试样浓度的增加,发光菌发光强度降低,表明发光强度与浓度呈负相关

关系($y = - 0.7703x + 96.895$, 相关性系数 $r = - 0.9892$),且置信水平 $P > 0.99$ 。其余染料类同,并由此计算出染料抑制发光菌相对发光强度的 EC₅₀,见表 2。

由表 2 可以看出,碱性染料的毒性最大,还原性染料的毒性次之,酸性染料的毒性较小,活性染料和直接染料的毒性最小。从染料分子的化学结构来分析,碱性染料基本上是苯的各种衍生物,还原染料主要是蒽醌染料,酸性染料大多是苯磺酸的衍生物及酸性偶氮化合物,而活性染料和直接染料大部分是磺酸基的偶氮化合物及其金属络合物,其毒性最小。急性毒性较大的染料均具有如下特征:分子结构相对简单,易溶于乙醇,均含有氨基或取代氨基等强给电子取代基,均为含氯水溶性化合物。由此可以看

出, 染料的毒性与其分子大小、官能团性质有着一定的联系。对比 HgCl_2 溶液抑制发光菌相对发光强度

的 EC_{50} (0.1 g/mL) 可知, 大部分染料对发光菌的毒性为中等偏低。

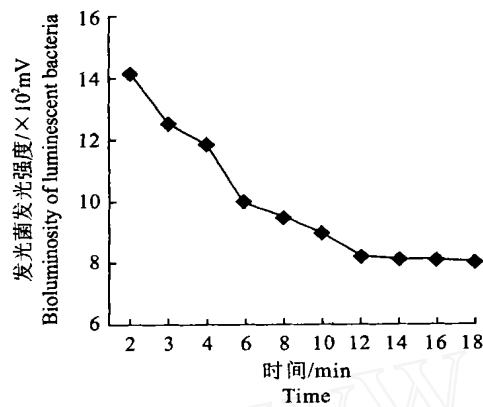


图 1 发光细菌发光强度随时间的变化

Fig 1 Relationship between bioluminescence of luminescent bacteria and time

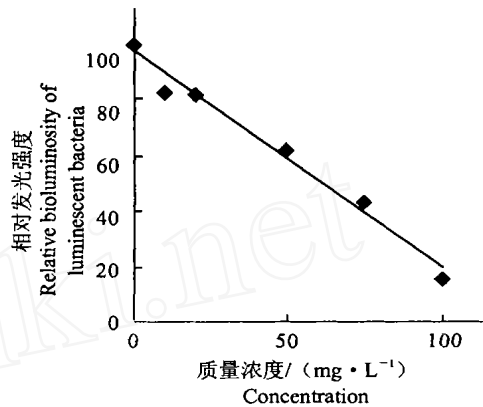


图 2 发光细菌相对发光强度随染料浓度的变化

Fig 2 Relationship between relative bioluminescence of luminescent bacteria and content of acid brilliant blue A

表 2 17 种常用染料分别抑制发光菌相对发光强度的 EC_{50}

Table 2 EC_{50} s of seventeen kinds of commonly used dyestuff restraining the relative Bioluminescence of luminescent bacteria

染料品种 Dye's designation	回归方程 Regression formulae	R^2	P	$\text{EC}_{50}/$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
碱性紫 5BN Alkaline purple 5BN	$y = - 8.2837x + 61.33$	0.6422	> 0.95	1.42
碱性艳蓝 BO Alkaline gaudy blue BO	$y = - 0.6784x + 71.457$	0.9498	> 0.99	3.16
还原艳紫 RK Reduced gaudy purple RK	$y = - 3.92x + 86.25$	0.9247	> 0.99	9.12
还原蓝 ER Reduced blue ER	$y = - 1.67x + 76.23$	0.9123	> 0.99	15.66
还原红 F3B Reduced red F3B	$y = - 2.16x + 79.79$	0.8896	> 0.99	13.79
活性紫 K3R Purple K3R of activation	$y = - 0.9135x + 97.127$	0.868	> 0.99	51.58
活性黑 KBR Black KBR of activation	$y = - 0.2192x + 91.009$	0.934	> 0.99	187.12
活性艳红 X-3B Gaudy red X- 3B of activation	$y = - 0.1772x + 85.23$	0.8624	> 0.99	198.81
活性艳蓝 KN-R Gaudy blue KN- R of activation	$y = - 0.2423x + 98.704$	0.9662	> 0.99	201.00
直接耐晒黑 G Able to bear tanned G directly	$y = - 0.249x + 88.272$	0.8441	> 0.99	153.71
直接湖蓝 5B Direct lake blue 5B	$y = - 0.2208x + 97.078$	0.9266	> 0.99	213.11
直接黄棕 3G Yellowish-brown 3G directly	$y = - 0.1079x + 96.933$	0.9351	> 0.99	434.15
弱酸性红 2B Weak acid red 2B	$y = - 0.6259x + 78.285$	0.7732	> 0.99	45.19
酸性湖蓝 A Acid lake blue A	$y = - 0.7703x + 96.895$	0.9786	> 0.99	60.88
酸性媒介青 RRN Acid media blue and green RRN	$y = - 0.5088x + 98.545$	0.9897	> 0.99	95.40
溴胺酸 Bromine amine sour	$y = - 0.1151x + 88.096$	0.8231	> 0.99	330.98
墨绿 Blackish green	$y = - 0.2865x + 98.226$	0.914	> 0.99	168.33

由表 2 还可以看出, 相对而言, 紫色染料在同种类型的染料中毒性较大。虽然本次试验对颜色的影响已经进行了一定的校正, 但并不完全排除颜色对发光菌发光量的影响。

3 讨 论

与传统生物毒性测定方法——鱼毒试验法相比, 本方法检测水质急性毒性的优点在于: 发光细菌对环境敏感, 容易培养, 测试时只需微量样品; 且试验过程中不需要严格的无菌操作, 测试简便、快速、适用性强、重复性好、灵敏度高而费用极为低廉。

研究表明, 常用的 17 种染料对发光细菌均有一定的急性毒性, 而且染料的毒性与染料类型、分子大小、官能团性质有着一定的联系。通过分析可知, 单就同种性质的偶氮染料来看, 多偶氮类染料比单偶氮和双偶氮类染料对发光细菌发光量的影响要大。染料中偶氮基是发色基团, 另外, 所选大部分染料都含有 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 等助色基团, 发色基团和助色基团的共同特点是都含有未共用电子团。由此可以看出, 虽然本次试验对颜色的影响已经做了一定的物理校正, 但并没有改变染料的化学结构, 其中共轭键和未共用电子对的多少对染料毒性的影响比较

大。另外,单偶氮的金属络合物比单偶氮类染料对发光细菌的急性毒性大,例如单偶氮的铜络合物对发光细菌的毒性较大,可能的原因是铜本身有一定的杀菌效果,和偶氮化合物络合后进一步促进了对发光细菌的急性毒性。为了更好地说明染料毒性产生

的原因,本研究的后续部分将用不同营养级生物作为测试对象,对比不同染料对不同生物测试对象的毒性大小,并从染料结构及颜色等方面进一步分析其毒性产生的原因。

[参考文献]

- [1] 马 梅,童中华,王子健,等. 新型淡水发光菌应用于环境样品毒性测试的初步研究[J]. 环境科学学报, 1997, (3): 127- 131.
- [2] 童中华,马 梅,王子健. 利用淡水发光菌评估电化学处理模拟印染废水的效果[J]. 环境化学, 1997, 16(2): 130- 133.
- [3] Chang J C, Taylor P B, Leach F R. Use of microtox assay system for environmental sample[J]. Bill Environ Contam Toxicol, 1981, 26: 150- 156.
- [4] Georg Gellert. Sensitivity and significance of luminescent bacteria in chronic toxicity testing based on growth and bioluminescence[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1999, (2): 207- 211.
- [5] 赵华清,殷浩文,陈晓倩,等. 发光细菌法检测环境污染中的基因毒性[J]. 应用与环境生物学报, 2000, 6(6): 577- 580.
- [6] 顾学瀛. 发光细菌检测水土环境毒性的进展和评价[J]. 土壤学进展, 1987, 15(3): 48- 52.
- [7] GB/T 15441- 1995 水质. 急性毒性的测定. 发光细菌法[S].
- [8] 化学工业出版社组织编写. 中国化工产品大全[M]. 中卷. 北京: 化学工业出版社, 1994. 735- 1136.
- [9] 袁东星,邓永智,林玉晖. 蔬菜中有机磷农药残留的发光菌快速检测[J]. 环境化学, 1997, 16(2): 77- 81.

Toxic effects of seventeen kinds of dyestuff using the method of luminescent bacteria

DANG Ya-ai^{1,2}, WANG Guo-dong¹, XIN Bao-ping², YANG Min², LI Xiu-zhen³, LI Bin-lan³

(1 College of Life Sciences, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Research Center for Ecoenvironment, Chinese Academy of Science, Beijing 100085, China;

3 Master station of Environment measuring of Chinese Petroleum Gas, Langfang, Hebei 065000, China)

Abstract: According to the Chinese criterion about the acute toxicity of compound, EC_{50} s of seventeen kinds of dyes restraining the relative bioluminescence of luminescent bacteria is obtained using the method of luminescent bacteria. The result shows: the toxicity of Alkaline dyestuffs is most acute one, reductive dyestuffs takes the second place, the acid dyes is relatively little, and the toxicity of reactive dyestuffs and direct dyestuffs is minimum.

Key words: dyestuff; luminescent bacteria; acute toxicity; water pollution