

水中五氯酚钠对发光细菌毒性测定的影响因素

施玮, 牛军峰, 余刚*

(清华大学环境科学与工程系 持久性有机污染物研究中心, 北京 100084)

摘要:应用发光细菌检测法, 考察了不同的影响因素对水体中典型的有机污染物五氯酚钠的生物毒性测定结果的影响。结果表明, 五氯酚钠对发光细菌的 EC_{50} 值随着 pH 值和硬度的增加而增加; 五氯酚钠的 15 min EC_{50} 和 20 min EC_{50} 基本相符; 与水体中相同浓度的常规有机污染物相比, 五氯酚钠表现出更强的毒性, 实验中常规有机污染物的存在对五氯酚钠毒性测定的结果影响较小。原水毒性检测实验显示一定毒性(相对发光率降低 14%), 原水水质对测定结果影响程度与去离子水相似。

关键词:发光细菌; 生物毒性; 五氯酚钠; 生物测定

中图分类号: X52 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2004)03-0044-04

Influential Factors on the Toxicity of Pentachlorophenol Sodium with MICROTOX System in Water

SHI Wei, NIU Jun-feng, YU Gang

(Research Centre for Persistent Organic Pollutants, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: The biological toxicity of pentachlorophenol sodium (Na-PCP), a typical kind of aquatic organic pollutants, was tested with the MICROTOX system using luminescent bacteria with the influence of several factors taken into consideration. The EC_{50} of Na-PCP increases with the increasing of the pH and hardness of the sample. The EC_{50} (15 min) of Na-PCP is approximately equal to its EC_{50} (20 min). Compared with some common organic pollutants, which exhibit little influence on the toxicity of Na-PCP when mixed, Na-PCP is more toxic. A reduction of 14% in relative luminescent rate was observed in the experiment with a natural sample. The natural sample exhibits similar influence on the toxicity of Na-PCP similarly compared with unionized water.

Key words: luminescent bacteria; toxicity; pentachlorophenol sodium; bioassay

五氯酚钠是一种在环境中广泛存在的有机污染物^[1]。水质检测发现^[2], 五氯酚钠在天然水体中的浓度为 5~1000 ng/L, 某些自来水中的浓度也达到 5~100 ng/L, 受五氯酚钠污染的水体对人体健康构成严重威胁。

近年来, 对有机污染物生物毒性的测定开展了广泛的研究^[3~8]。在污染物生物毒性的检测方法中, 发光细菌法由于灵敏度高、快速方便, 并能综合评价生物毒性而被广泛采用^[3~8]。研究人员曾利用发光细菌法检测了土壤中 2, 4, 6-三硝基甲苯的生物毒性和诱变性^[4, 5], 也对天然水体中有毒的金属和非金属物质进行了检测^[6], 取得了令人满意的效果。利用发光细菌法测定包括五氯酚钠在内的多种物质的生物毒性也已有报道^[7]。研究表明, 有机污染物在水体中的生物毒性和发光细菌本身的生理特性都会受到多个因素的影响^[3, 9], 从而影响毒性测定的结果。目前, 对于影响水体中五氯酚钠对发光细菌生物毒性的因素研究甚少, 本文主要利用发光细菌法, 考察了 pH、硬度等水质指标和水中其他污染物等条件对五氯酚钠毒性测定的影响, 为水体中五

氯酚钠生物毒性测定中条件的选择提供理论数据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

生物毒性测试仪(DXY-2型, 中国科学院南京土壤研究所), 全温振荡器(HZQ-F型); 所用菌种为明亮发光杆菌(*P. phosphoreum*) (中科院南京土壤研究所)。细菌培养基成分为: 每 100 mL 含酵母浸膏 0.5 g、牛肉蛋白胨 0.5 g、NaCl 3 g、 Na_2HPO_4 0.5 g、 KH_2PO_4 0.1 g、甘油 0.3 g。所用其他试剂均为分析纯, 试样用 3% 的 NaCl 溶液配制。实验原水取自清华大学近春园北侧池塘(2003-06-07 T15:00)。

1.2 菌种的培养

将发光细菌冻干粉用 1 mL 2% NaCl 溶液复苏, 转入 50 mL 培养基, 20℃培养 12 h, 每隔 12 h, 从原培养基中移取约 0.5 mL 转接入新的培养基中。

收稿日期: 2003-09-05; 修订日期: 2003-11-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(50238020)

作者简介: 施玮(1981~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为有机污染物的环境行为及其治理技术。

* 联系人

进行培养。

1.3 毒性的测定

将待测化合物配成 7 个左右浓度等级,各取 1.8 mL 加入具塞磨口比色管,以 1.8 mL 3 % NaCl 作空白对照,每次实验重复测定 3 次。将接种后 12 h 的菌液 1 ~ 2 mL 用 20 ~ 30 mL 3 % NaCl 溶液稀释混合,磁力搅拌 10 min 后,取 0.2 mL 加入比色管中,上下振荡 5 次,去塞,静置 15 min 后用生物毒性测试仪测定发光强度。

1.4 计算方法

计算样品的相对发光率,并计算 3 个平行样的平均值,相对发光率的计算如方程(1)所示。

$$\text{相对发光率(RL)} = \frac{\text{测试管发光量(mV)}}{\text{对照管发光量(mV)}} \times 100 \% \quad (1)$$

利用线性回归分析建立并检验五氯酚钠浓度(C)与其平均相对发光率(T)%之间的相关方程,计算对应相对发光率减小 50 %的物质浓度(EC₅₀)及相对于 95 %置信度的置信区间。

2 结果与讨论

2.1 pH 值的影响

由于发光细菌适宜生存的 pH 值为 6.0 ~ 9.0,本文对 pH 值设计了 4 个水平,分别是 6.0,7.0,8.0,9.0。采用 NaOH、HCl 和 Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲体系来调节实验溶液的 pH 值。不同 pH 值下相对发光率与五氯酚钠浓度的相关方程、五氯酚钠的 EC₅₀ 值及其 95 %置信区间如表 1 所示。

表 1 不同 pH 值下五氯酚钠毒性测定结果/ mg·L⁻¹

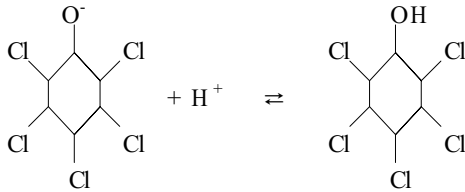
Table 1 Toxicity of pentachlorophenol sodium at different pH

pH	相关方程	r	EC ₅₀ 值	置信区间 ¹⁾
6.0	T = 214.68 - 94.92 C	0.992	1.74	(1.13, 2.69)
7.0	T = 238.54 - 78.24 c	0.997	2.41	(1.81, 3.20)
8.0	T = 189.19 - 14.82 c	0.994	9.39	(6.33, 13.97)
9.0	T = 119.62 - 4.37 c	0.976	15.94	(8.89, 27.91)

1) 对应 95 %的置信度

表 1 表明,测试样品的 pH 值对五氯酚钠的发光细菌毒性测试影响显著。所得到的 EC₅₀ 值随着 pH 的提高而增大,当 pH 值由 6.0 上升到 10.0 时,五氯酚钠 EC₅₀ 的最大值是最小值的 9.2 倍。即随着 pH 值的上升,五氯酚钠对发光细菌的毒性有所降低。

由于五氯酚钠是五氯苯酚的钠盐,在水中存在着五氯苯酚阴离子和五氯苯酚分子的平衡:



反应平衡常数为 $K = 1 / K_a$, K_a 为五氯苯酚的电离常数。实验温度(25 ℃)下, $K_a = 6.92 \times 10^{-6}$,则可以计算得到 pH 为 6.0,7.0,8.0,9.0 时,溶液中分子态五氯苯酚和离子态五氯苯酚占总的五氯苯酚的比例分别为 12.6 %,1.4 %,0.14 %,0.014 %。可以看到,pH 每升高 1 个单位,分子态五氯苯酚所占的比例就下降一个数量级。五氯苯酚与离子态的五氯酚钠相比,五氯苯酚的极性小得多,更容易通过生物膜而与细菌细胞相接触,所以其毒性强于五氯苯酚阴离子。故随着 pH 减小,分子态五氯苯酚浓度增加,造成溶液体系毒性的增强。反之,pH 升高则会导致毒性的减小。

另外,从实验得到的相对发光率与浓度的相关方程可以看到,随着 pH 值的升高,直线的斜率呈现减小趋势,也就是说,pH 值升高会导致毒性对浓度敏感性的下降。

2.2 硬度的影响

在考察硬度对毒性测定的影响时,根据实际水体的情况,将水体分为很软、软、硬和很硬四个等级,稀释用水配方如表 2 所示。

表 2 稀释用水的配方/ mg·L⁻¹

Table 2 Ingredients of water used for dilution

硬度级别	NaHCO ₃	CaCl ₂	MgSO ₄ ·7H ₂ O	KCl	硬度 (德国度)	pH
I (很软)	51.6	20.4	60.0	3.4	2.4	7.8
II (软)	94.0	40.0	122.8	4.0	4.8	7.7
III (硬)	191.6	80.4	245.0	8.8	9.6	7.7
IV (很硬)	383.4	159.2	492.0	17.0	19.2	7.9

不同硬度下五氯酚钠的 EC₅₀ 值及其 95 %置信区间如表 3 所示。由表 3 可以看出,水质硬度对于五氯酚钠毒性检测的影响也是比较显著的。随着水质硬度的增加,五氯酚钠的 EC₅₀ 值呈现上升趋势,相应的毒性呈减小趋势。当硬度从 2.4 度(德国度)上升到 19.2 度时,五氯酚钠的 EC₅₀ 值上升为原来的 5 倍。

由于本实验所用的发光细菌为海水细菌,海水中含有大量的钙镁离子,钙镁离子可能为发光细菌提供更适宜的生存环境^[3]。所以推测适当的硬度更适合发光细菌的生长,增强其抵抗毒性的能力。

表 3 不同硬度下五氯酚钠毒性测定结果/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

Table 3 Toxicity of pentachlorophenol sodium at different hardness				
硬度级别	相关方程	r	EC_{50} 值	置信区间 ¹⁾
I	$T = 119.65 - 12.28c$	0.999	5.67	(4.76, 6.75)
II	$T = 114.44 - 7.42c$	0.995	8.68	(4.38, 16.95)
III	$T = 134.68 - 9.11c$	0.994	9.29	(6.37, 13.63)
IV	$T = 157.55 - 10.34c$	0.984	10.40	(3.36, 35.19)

1) 对应 95 % 的置信度

2.3 接触时间的影响

在生物毒性测定中,研究一般采用的接触时间为 15 min 或 20 min.为了考察不同接触时间对测定结果的影响,本文考察了发光细菌与受试物接触后发光强度随时间的变化情况,并对 15 min 和 20 min 的 EC_{50} 进行了比较.以 2 mg/L 的五氯酚钠溶液为受测对象,发光强度随接触时间的变化情况如图 1 所示.

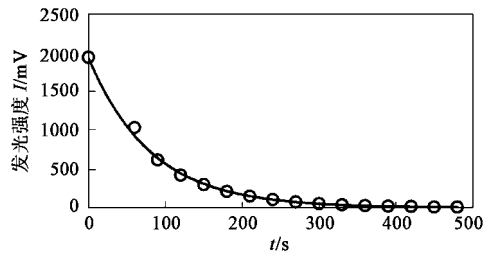


图 1 发光强度随时间变化关系

Fig.1 Luminescence intensity (I) versus contact time (t)

结果显示,上述反应情况符合一级反应的特征,用对数方程拟合,得到 I (发光强度)与 t (时间)的数学关系如方程(2)所示:

$$I = 1928.8e^{-0.0122t} \quad (r^2 = 0.999) \quad (2)$$

对上式处理得到方程(3):

$$\frac{dI}{dt} = -0.0122I \quad (3)$$

根据方程(3),从上述结果可以看到 300 s 时,反应完成 98 % 左右,500 s 以后,反应基本完成 100 %.因此,采用 15 min EC_{50} 来反应测试结果是有效的.本实验测定结果表明,五氯酚钠 15 min EC_{50} 和 20 min EC_{50} 分别为 1.19 mg/L 和 1.36 mg/L ,两者的结果基本相符.

2.4 水中其他有机污染物的影响

由于在天然水体中,一般存在着多种有机污染物,在毒性测定时,水中的其他常见污染物也会对发光细菌毒性测定的结果产生影响.本文选取了水中几种常见的有机污染物作为代表性物质,研究它们存在时对五氯酚钠毒性测定结果的影响.对一般水

体中有机污染物的定量定性分析表明^[10,11],一般水体中主要含有酯类、多环芳烃、取代芳烃、烷烃等有机污染物,经过水厂的处理后,则会生成大量的消毒副产物,如三氯甲烷、四氯甲烷等.因此,本文选取邻二氯苯、萘、邻苯二甲酸正丁酯(DBP)和三氯甲烷作为水中常见污染物的代表性物质,研究这些物质对毒性测定结果的影响.为了估计这几种有机污染物对五氯酚钠毒性测定的影响程度,首先对这几种物质单独存在于水中时的毒性进行了测定,结果如表 4 所示(结果均以 EC_{50} 表示).实验结果表明,在所有被测的有机物中,生物毒性的强弱顺序为:五氯酚钠 > 萘 > DBP > 邻二氯苯 > 三氯甲烷.萘与五氯酚钠毒性相近,推测萘在所选的几种物质中可能对五氯酚钠毒性测定结果具有相对较大的影响作用.

表 4 污染物毒性测定结果/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

Table 4 Toxicity of contaminants studied		
被测物质	毒性(15 min EC_{50} 值)	置信区间 ¹⁾
五氯酚钠	1.19	(0.67, 2.23)
DBP	7.56	(6.15, 9.37)
邻二氯苯	10.14	(6.55, 15.84)
三氯甲烷	237.24	(160.34, 350.63)
萘	2.20	(1.83, 2.65)

1) 对应 95 % 的置信度

根据对一般水质中各种污染物定量检测的结果,确定所选物质的浓度之比为邻二氯苯:萘:三氯甲烷:DBP = 1:1:0.5:5.五氯酚钠浓度采用接近 EC_{50} 值的 1 mg/L ,混合溶液浓度(按萘浓度计算)设计 0.3,0.6,0.9,1.2,1.5,1.8 mg/L 6 个浓度.同时测定不含五氯酚钠的相同浓度的混合溶液作为对照样品,实验均以 3 % 氯化钠溶液作为空白对照.结果如图 2 所示.

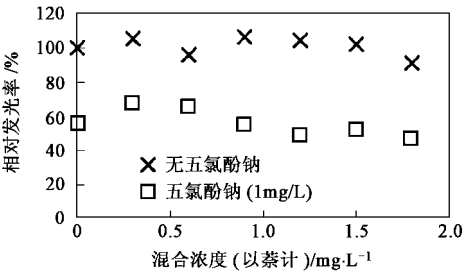


图 2 不同混合浓度下的相对发光率

Fig.2 Relative luminescence rate versus concentrations of mixtures

图 2 显示,在 1 mg/L 的五氯酚钠的水溶液中,加入不同量的混合污染物对发光细菌的相对发光率几乎没有影响,相对发光率在 50 % ~ 70 % 范围内波

动,说明混合物浓度的变化对发光细菌毒性影响不大.而对不含五氯酚钠的样品测定发现,实验浓度范围内的混合物对发光细菌几乎没有毒性.可以认为,在五氯酚钠与其他有机物的混合样中,五氯酚钠是主要的毒性贡献者.如果在水体中只含有实验涉及到的有机污染物,浓度也在实验范围以内,则认为可以利用发光细菌法对混合污染物水样中的五氯酚钠进行测定,检测限小于 1 mg/L.

2.5 原水水质对毒性测定的影响

本实验所使用的原水于 2003 年 6 月 7 日下午 15:00 取于清华大学近春园北侧池塘.对水质进行分析测定,得到主要水质指标如表 5 所示.

表 5 原水水样水质指标/ mg·L⁻¹

Table 5 The characteristics of natural water sample					
水质指标	水温/℃	pH 值	硬度(德国度)	COD _{Mn}	TOC
水样	25.3	8.2~8.3	17.3	3.2	7.34

实验测定发现,原水水样的相对发光率为 86.2%,说明原水对发光细菌略显毒性.将原水配制为浓度为 3% NaCl 溶液作为空白对照,测定五氯酚钠的 EC₅₀ 值为 14.37 mg/L.在以去离子水为空白实验时发现,当 pH 为 7.8,硬度为 IV 级时,五氯酚钠的 EC₅₀ 值为 10.40 mg/L;当 pH 为 9.0,硬度为 0 时,五氯酚钠的 EC₅₀ 值为 15.94 mg/L.本实验水样 pH 为 8.2,硬度为 IV 级,以该水为空白对照样对五氯酚钠毒性的测定结果与以去离子水(相当 pH 值和硬度)为空白对照样的测定结果相比,两者相差不大.

3 结论

(1) pH 值和硬度明显影响五氯酚钠对发光细菌的毒性检测,pH 上升导致毒性减小,硬度升高也会减小五氯酚钠水样的毒性.

(2) 五氯酚钠与发光细菌的反应呈现一级反应特征,五氯酚钠的 15 min EC₅₀ 和 20 min EC₅₀ 基本

相符,可以使用 15 min EC₅₀ 表示毒性测定的结果.实验范围内 EC₅₀ 值较大的其他有机污染物对五氯酚钠毒性测定的影响很小.

(3) 原水毒性检测实验显示一定毒性(相对发光率约为 86%),以原水为空白对照样对五氯酚钠毒性的测定结果与以去离子水(相当 pH 值和硬度)为空白对照样的测定结果相差不大.

参考文献:

[1] Florence M, Carissan M, Hutchinson T H, Beaumont A R, Pipe R K. Investigation on the effects of sodium pentachlorophenol on the immune system of marine mussels[J]. Developmental and Comparative Immunology, 1997, 21(2) : 125 .

[2] 江夕夫, 李延平, 王术恩, 张文生, 王晓红, 汪小丰, 樊文中, 杨润. 人群五氯酚环境暴露, 体负荷和健康效应的研究[J]. 中国公共卫生, 1994, 10(10) : 436 ~ 439 .

[3] 黄正, 王家玲. 发光细菌的生理特性及其在环境监测中的应用[J]. 环境科学, 1995, 16(3) : 87 ~ 90 .

[4] Frische T. Screening for Soil Toxicity and Mutagenicity Using Luminescent Bacteria —— A Case Study of the Explosive 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2002, 51(2) : 133 ~ 144 .

[5] Frische T, Höper H. Soil microbial parameters and luminescent bacteria assays as indicators for in situ bioremediation of TNT-contaminated soils[J]. Chemosphere, 2003, 50(3) : 415 ~ 427 .

[6] Tauriainen S M, Virta M P J, Karp M T. Detecting bioavailable toxic metals and metalloids from natural water samples using luminescent sensor bacteria[J]. Water Research, 2000, 34(10) : 2661 ~ 2666 .

[7] Kahru A, Tomson T, Pall T, Kulm I. Study of toxicity of pesticides using luminescent bacteria photobacterium phosphoreum [J]. Water Science and Technology, 1996, 33 : 147 ~ 154 .

[8] 林志芬, 于红霞, 许士奋, 王连生. 发光菌生物毒性测试方法的改进[J]. 环境科学, 2001, 22(2) : 114 ~ 117 .

[9] 王连生, 韩朔睽. 有机污染化学进展[M]. 北京: 化学工业出版社, 1998. 105 ~ 108 .

[10] 田怀军, 吴德生, 黎源倩, 李荣江, 杜慧兰, 陶锐, 汪良吉. 某市饮用水源水、出厂水中有机污染物 GC/MS 定性分析[J]. 现代预防科学, 1999, 26(2) : 133 ~ 136 .

[11] 金子, 李善日, 安胜姬. GC/MS 法分析不同采样期松花江水中有机污染物[J]. 质谱学报, 1996, 20(3,4) : 155 ~ 156 .