

中华人民共和国国家标准

水质 急性毒性的测定 发光细菌法

GB/T 15441—1995

Water quality—Determination of the acute toxicity
—Luminescent bacteria test

1 主题内容与适用范围

1.1 主题内容

本标准规定了测定水环境急性毒性的发光细菌法。

1.2 适用范围

本标准适用于工业废水、纳污水体及实验室条件下可溶性化学物质水质急性毒性监测。

2 方法提要

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,以此表示其急性毒性水平。

水质急性毒性水平按 8 所述条件选用相当的参比毒物氯化汞浓度(以 mg/L 为单位)来表征,或选用 EC_{50} 值(半数有效浓度——以样品液百分浓度为单位)来表征。

3 试剂和材料

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

3.1 氯化汞 $HgCl_2$ 。

3.2 氯化钠 $NaCl$, 化学纯。

3.3 明亮发光杆菌 T_3 小种(*Photobacterium phosphoreum* T_3 spp.)冻干粉,安瓿瓶包装,每瓶 0.5 g,在 2~5℃ 冰箱内有效保存期为 6 个月。新制备的发光细菌休眠细胞(冻干粉)密度不低于每克 800 万个细胞;当按 6.2.4 步骤将冻干粉复苏 2 min 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(5 ml 测试管)或 2 万个细胞(2 ml 测试管)(均为稀释平板法测定)。在毒性测试仪上测出的初始发光量应在 600~1 900 mV 之间,低于 600 mV 允许将倍率调至“X2”档,高于 1900 mV 允许将倍率调至“X0.5”档。仍达不到标准者,更换冻干粉。

3.4 氯化钠溶液, 3 g/100 ml。

氯化钠 3 g 于玻璃容器内,用量筒加蒸馏水 100 ml。

3.5 氯化钠溶液, 2 g/100 ml。

氯化钠 2 g,加蒸馏水 100 ml,于试剂瓶内,2~5℃ 保存。

3.6 参比毒物氯化汞标准溶液。

0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.12, 0.14, 0.16, 0.18, 0.20, 0.22, 0.24 mg/L。

3.7 氯化汞母液, $\rho = 2\,000$ mg/L。

万分之一分析天平精确密封保存良好的无结晶水氯化汞 0.100 0 g 入 50 ml 容量瓶,用 3g/100 ml 氯化钠溶液稀释至刻度,置 2~5℃ 冰箱备用,保存期 6 个月。

国家环境保护局 1995-03-25 批准

1995-08-01 实施

3.8 氯化汞工作液, $\rho=2\text{ mg/L}$ 。

用移液管吸取氯化汞 2 000 mg/L 母液 10 ml 入 1 000 ml 容量瓶,用 3 g/100 ml 氯化钠溶液定容。再用移液管吸取氯化汞 20 mg/L 液 25 ml 入 250 ml 容量瓶,用 3 g/100 ml 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 3 g/100 ml 氯化钠溶液将氯化汞 2 mg/L 溶液按表 1 稀释成系列浓度(一律采用 50 ml 容量瓶)。这些氯化汞稀释液保存期不超过 24 h,超过者务必重配。

表 1 氯化汞工作溶液稀释配制系列(在 50 ml 容量瓶中)

加氯化汞(2 mg/L)数,ml	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0
稀释定容后氯化汞浓度,mg/L	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10	0.12	0.14	0.16	0.18	0.20	0.22	0.24

4 仪器

4.1 生物发光光度计。

配置 2 或 5 ml 测试管。

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

4.2 2 ml 或 5 ml 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。

4.3 微量注射器:10 μl 。

4.4 注射器:1 ml。

4.5 定量加液瓶:5 ml。

4.6 吸管:2、10、25 ml。

4.7 试剂瓶:100 ml。

4.8 量筒:100、500 ml。

4.9 棕色容量瓶:50、250、1 000 ml。

4.10 半微量滴定管(配磨口试液瓶,全套仪器均为棕色):10 ml。

5 样品

5.1 样品的采集和保存

a. 采样瓶使用带有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。

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

c. 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。

5.2 样品液的稀释

5.2.1 样品液测定前稀释的条件

5.2.1.1 样品液预试验 取事先加氯化钠至 3 g/100 ml 浓度的样品母液 2 ml 装入样品管,并设一支 CK 管(氯化钠 3 g/100 ml 溶液),按 6 所述测定相对发光度。

5.2.1.2 按 5.2.1.1 测得的样品,相对发光度低于 50%乃至零,欲以 EC_{50} 表达结果,则须稀释。

5.2.1.3 按 5.2.1.1 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,则不须稀释。

5.2.2 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 3 g/100 ml 浓度添加氯化钠或浓溶液(母液只能加固体)。

5.2.3 样品液稀释浓度的选择

5.2.3.1 探测试验

按对数系列将样品液稀释成 5 个浓度:100%、10%、1%、0.1%、0.01%(它们的对数依次为 0, -1, -2, -3, -4),按 6 所述粗测一遍视 1%~100% 相对发光度落在哪一浓度范围。

5.2.3.2 试验

在 1%~100% 相对发光度所落在的浓度范围内再增配 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 6 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%,它们的对数相应为 1.00、0.80、0.60、0.40、0.20、0.00,对数间距均为 0.2)。

6 测定

6.1 测定条件

6.1.1 室温

室温 20~25℃。

同一批样品在测定过程中要求温度波动不超过±1℃。且所有测试器皿及试剂、溶液测前 1 h 均置于控温的测试室内。

6.1.2 pH

若须测定包括 pH 影响在内的急性毒性,不应调节水样 pH。

若须测定排除 pH 影响在内的急性毒性,须将水样和 CK(氯化钠 3 g/100 ml)pH 测前调至下值:主要含 Cu 水样为 4.5,主要含其他金属水样为 5.4,主要含有机化合物水样为 7.0。

6.1.3 溶解氧

本法只能测定包括溶解氧影响在内的急性毒性。

6.2 测定步骤

6.2.1 试管的排列

于塑料或铁制试管架上按以下二种情况排列测试管。

6.2.1.1 按 5.2.1.3 所述,样品母液相对发光度为 1% 以上者,如下排列:

左侧放参比毒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 3 g/100 ml 蒸馏水溶液)。设 3 次重复。每测一批样品,均须同时配置测定系列浓度氯化汞标准溶液。

表 2 试管在试管架上的排列

后二排	CK _{预试1} CK _{预试2}															
后一排	CK	CK	CK	CK	CK	CK	...	CK	CK	CK	CK	CK	CK	...	CK	
前 排	0.02	0.02	0.02	0.04	0.04	0.04	...	0.24	样 1	样 1	样 1	样 2	样 2	样 2	...	样 <i>n</i>
管 群	氯化汞(mg/L)								样 品							

6.2.1.2 按 5.2.1.2 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 0.10 mg/L 溶液管(作为检验发光细菌活性是否正常的参考毒物浓度,它反应 15 min 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

6.2.1.1。每测一批样品,均须同时配测氯化汞 0.10 mg/L 溶液。

6.2.2 加 3 g/100 ml 氯化钠溶液

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

6.2.3 加样品液

用 2 或 5 ml 吸管给每支样品管加 2 或 5 ml 样品液(据 6.2.2 而定)。每个样品号换一支吸管。

6.2.4 发光细菌冻干菌剂复苏

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

6.2.5 仪器的预热和调零

打开生物发光光度计电源,预热 15 min,调零,备用。

6.2.6 仪器检验复苏发光细菌冻干粉质量

另取一空 2 或 5 ml 测试管,加 2 或 5 ml 氯化钠 3 g/100 ml(据 6.2.2 而定),加 10 μ l 复苏发光菌液,盖上瓶塞,用手颠倒 5 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 5~10 min 上升到)600 mV 以上,此瓶冻干粉可用于测试,低于者按 3.1.4 处理。菌液发光量先缓慢上升,约持续 5~15 min,后缓慢下降,约持续 4 h。满 4 h 的 CK 发光量应不低于 400 mV,低于者更换冻干粉。

6.2.7 给各测试管加复苏菌液

在发光菌液复苏稳定(约半小时)后,按 6.2 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 5 次,拔去瓶塞,放回原位(每管加菌液间隔时间勿短于 30 s。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 15 min,记作各管反应终止(也即应该读发光量)的时间。

6.2.8 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 mV 数表示)。

6.2.9 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. 取一 2 ml 测试管(直径 12 mm),加氯化钠 3 g/100 ml 溶液 2 ml,将该管放进一装有少量氯化钠 3 g/100 ml 溶液的 5 ml 管(直径 20 mm)内,要使外管与内管的氯化钠 3 g/100 ml 液面平齐。此作 CK 管;

c. 另取一 2 ml 测试管,加氯化钠 3 g/100 ml 溶液 2 ml,放入另一装有少量有色待测样品液的 5 ml 管内,要使外管与内管的氯化钠 3 g/100 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 15 min,迅即放入仪器测试舱,测定二只带有内管的 5 ml 测试管的发光量。分别记下发光量 L_1 (CK 管)和 L_2 (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 6.2.7 和 6.2.8 所述常规步骤测试带色样品管及其 CK 管(氯化钠 3 g/100 ml 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)。

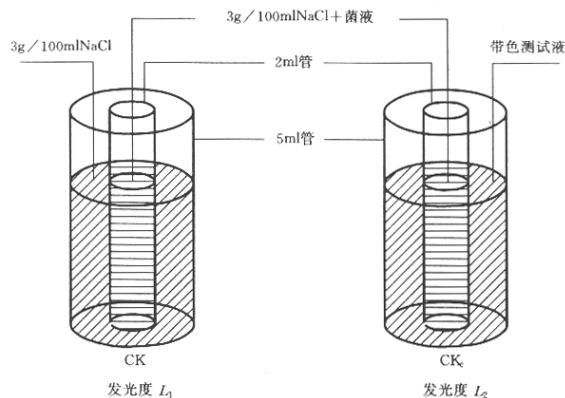


图1 有色样品溶液测定干扰的校正

7 测试结果的表达

7.1 计算样品相对发光度(%),并算出平均值。

$$\text{相对发光度}(\%) = \frac{\text{氯化汞管或样品管发光量(mV)}}{\text{CK管发光量(mV)}} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

$$\text{相对发光度}(\%) \text{ 平均值} = \frac{(\text{重复1})(\%) + (\text{重复2})(\%) + (\text{重复3})(\%)}{3} \dots\dots\dots (2)$$

7.2 符合5.2.1.3条件者,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。

a. 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:

$$T = a + bC_{\text{氯化汞}} \dots\dots\dots (3)$$

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 $EC_{50\text{氯化汞}} = 0.10 \pm 0.02 \text{ mg/L}$,则所求相关方程成立;反之,不能成立,须重测系列氯化汞浓度的发光量。氯化汞溶液配制过夜者,须重配后再测定。

b. 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。

7.3 符合5.2.1.2条件者,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7.2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,须重测样品稀释系列浓度的发光量。

8 根据测试结果表达样品急性毒性

8.1 用氯化汞浓度表达样品毒性

8.1.1 适用的条件

符合5.2.1.3条件(样品母液相对发光度大于1%)并按7.2建立了合格($P \leq 0.01$ 、 $EC_{50\text{氯化汞}} = 0.10 \pm 0.02 \text{ mg/L}$)的氯化汞浓度与其相对发光度相关方程者。

8.1.2 表达方法

a. 将测得的样品相对发光度,代入 7.2 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);

b. 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。

8.1.3 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。

8.2 用 EC_{50} 值表达样品毒性

8.2.1 适用的条件

符合 5.2.1.2 条件(样品母液相对发光度低于 50%乃至零)并按 7.1 建立了合格($P \leq 0.05$)的样品稀释液浓度与其相对发光度相关方程者。

8.2.2 表达方法

a. 将 $T=50$ 代入 7.3 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;

b. 测试结果报告列举样品的 EC_{50} 值。

8.2.3 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。

8.3 测定记录格式(见表 3)

表 3 样品急性毒性 发光细菌测定法实验记录

测定日期

測定人

提取方式

[illegible]
$$L = a + bC,$$
$$a =$$
$$b =$$

回归方程

 $r =$ $p <$

8.4 测定结果报告内容

- a. 实验室室温；
- b. 采样地点、日期、时间；
- c. 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：

$$T = a + bC$$

$$r = \quad P \leq \quad \text{EC}_{50\text{氯化汞}} = \quad \text{mg/L}$$

- d. 样品 EC_{50} 值(稀释百分浓度)或相对发光度(%)及其相当的氯化汞浓度(mg/L)；
- e. 测定人及所在单位。

9 方法的精密度

样品 3 次重复测定结果的相对偏差应不大于 15%。

附加说明：

本标准由国家环境保护局科技标准司提出。

本标准由中国科学院南京土壤研究所负责起草。

本标准起草人顾宗濂、谢思琴、周德智、乔鸿泽。

本标准委托中国环境监测总站负责解释。