

文章编号:1673-1212(2008)11-0128-03

水质毒性检测方法的对比研究

何芬,李子龙,晏恒,赵玮,黄永炳

(武汉理工大学资源与环境工程学院,湖北武汉430070)

摘要:随着环境污染加剧,需要在水环境污染监测方面有一种快速、灵敏、低廉的监测方法,以确保水资源的环境安全。本文选取国内比较常用的五种方法——发光细菌毒性实验法、斑马鱼毒性实验法、大型蚤类毒性实验法、藻类急性毒性实验法、蚕豆根尖微核法,以重铬酸钾($K_2Cr_2O_7$)配制成待测溶液测定水质毒性,通过实验比较了各种方法的灵敏性、准确性、可靠性。分析比较了这几种方法的优缺点和研究概况,并对存在的问题给出了建议,为加速国内水质检测应用提供了思路。

关键词:水质毒性;检测方法;对比

中图分类号:X832

文献标识码:A

Research and Application of Method in Water Quality Toxicity Examination

He Fen, Li Zilong, Yan Heng, Zhao Wei, Huang Yongbing

(School of Resource and Environmental Engineering, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China)

Abstract: With the aggravation of environmental pollution, a quickly, sensitive, inexpensive monitoring means should be developed to protect water resources. There are five domestic commonly used methods—photobacteria testing method, brachydanio rerio testing method, large daphnia testing method, algae testing method, point of horsebean roots micronucleus testing method. In these methods water quality toxicity was tested by the solution of potassium bichromate ($K_2Cr_2O_7$), through which sensitivity, accuracy, reliability of each method were compared. At the same time, the advantages and disadvantages and the general situation of these methods were summarized, and analysis and suggestions to existing problems were given. It provides ideas to accelerating the application of domestic water quality examination.

Key words: water quality toxicity; methods comparison; contrast

在过去几十年,大量的有毒化合物给水质监测带来了严重的挑战。尽管分析方法的灵敏度已经大为改善,但化合物的毒性效应是所有组成物质拮抗作用或抑制作用的综合结果,所以单纯的化学物质的限定不能为水体的安全提供充分的保障^[1]。在此情况下,人们开始利用生物学的方法对污染物的毒性进行测定,从而最终判定环境样品的综合毒性效应。生物毒性检测能直观地反映污染水体对生物种群的综合毒性,是预测和控制化学物质污染的一种不可缺少的辅助手段,因而得到了广泛应用和迅速发展。

1 研究概况

传统的鱼类,蚤类和藻类毒性实验测试时间长、操作复杂,现在正向缩短实验时间和简化操作过程方向研究:在鱼类毒性实验中,应用生物标志物评价污染物毒性可弥补这些不足^[2],因而成为当前的研究热点。在蚤类实验中,一些学者发现采用生物生理或行为上的变化(如捕食行为、趋光行为及代谢过程等)作为毒性测试指标可以缩短实验时间,提高灵敏度,达到早期水质毒性预报的目的^[3]。且经研究证实,以大型蚤捕食行为改变为指标比以死亡率为指标更为灵敏。在藻类实验中,以氧电极法的光合率作为藻类毒性测试指标,过程简便、快速,能够随时测定受试毒物对藻类光合作用的影响,与藻类生长抑制作用的急性毒性实验比较,测定时间由96 h缩短到24 h,且灵敏度提高了约1倍^[4]。因部分藻类在海水样品处理过程中受到影响较小,可以

收稿日期:2008-07-17

基金项目:武汉理工大学大学生创新培养计划(CJT2007-20)

作者简介:何芬(1987-),女,湖北武汉人,武汉理工大学本科生。

通讯联系人:何芬

用于海水毒性检测。

一般用于实验的发光细菌为明亮发光杆菌或其变种,在毒性测试时需要向样品中加入一定量的盐以维持细菌的正常生长,这样就会导致样品中一些有毒物质毒性的大小发生变化。淡水发光菌毒性检测技术弥补这一不足,大量论文针对污染物与淡水发光菌的单独或联合毒性机制做研究,建立其剂量效应关系。将发光菌与传感器结合,研发适于野外操作的发光细菌光纤传感器也是现在的研究热点。

蚕豆根尖微核试验在地表水毒性测试应用已相当成熟。但其质量保证体系不够完善,改进实验方法控制毒性监测数据的可信程度是当前研究的方向。到目前为止尚未见有该技术用于监测化工废水遗传毒性的报道。

2 材料与方法

2.1 发光细菌毒性实验

发光细菌毒性实验方法基本参照标准方法^[5]。主要实验材料包括:SHG-D型生物化学发光测量仪,用低温冰箱保存法保存的发光杆菌菌种(本实验室从乌贼体内提纯保存)、3% NaCl、培养基。取冷藏菌种复苏培养一天后,用于检测。预试验用100 mg/L、10 mg/L、1 mg/L和0.1 mg/L浓度的 $K_2Cr_2O_7$ 溶液,找出1%~100%相对发光度落在的浓度范围。以几何级数做间距选择6个浓度为正式试验,浓度分别为0 mg/L、0.375 mg/L、0.75 mg/L、1.5 mg/L、3 mg/L、6 mg/L,加2 ml测试液及菌液0.2 ml,每个浓度设两个平行样,将比色管放入SHG-D型生物化学发光测量仪的样品室,采用R方式测量发光强度。

2.2 斑马鱼毒性实验

斑马鱼毒性实验法基本参照标准方法^[6]。主要实验材料包括直径玻璃缸,斑马鱼(*Brachydanio rerio*)。预试验用1 000 mg/L、100 mg/L、10 mg/L和1 mg/L浓度 $K_2Cr_2O_7$ 溶液,鱼缸放鱼10尾、试验时间24 h。根据预试验中杀死全部鱼的最低浓度与未毒死鱼的最高浓度之间,以几何级数做间距选择6个浓度为正式试验浓度,即650 mg/L、420 mg/L、280 mg/L、180 mg/L、115 mg/L和0 mg/L $K_2Cr_2O_7$,每个浓度设2个平行样,并设对照。试验开始后3 h~6 h内要特别注意观察,每隔两小时记录每个容器中的死鱼数目。

2.3 大型蚤类毒性实验

大型蚤类毒性实验法基本参照标准方法^[7]。主

要仪器包括溶解氧测定仪、pH计、温度计、电导仪、重铬酸钾($K_2Cr_2O_7$)、大型蚤(*Daphnia magna*)。预实验以100 mg/L、10 mg/L、1 mg/L和0.1 mg/L浓度 $K_2Cr_2O_7$ 溶液,100 mL烧杯中放蚤10个,试验时间24 h,根据预试验找出被测物使100%大型蚤运动受抑制的浓度和最大耐受浓度的范围。以几何级数做间距选择6个浓度为正式试验浓度,即4.01 mg/L、2.30 mg/L、1.44 mg/L、0.90 mg/L、0.56 mg/L和0 mg/L $K_2Cr_2O_7$ 溶液,每个浓度设2个平行样,并设对照。试验开始后应于1、2、4、8、16及24 h定期进行观察,记录每个容器中仍能活动的水蚤数。

2.4 藻类急性毒性实验

藻类急性毒性实验基本参照《现代环境生物学实验技术与方法》^[8]。主要仪器包括控温仪、充气器、显微镜、分光光度计、计数器、重铬酸钾($K_2Cr_2O_7$)、斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)、培养基。小球藻经过预培养后,预实验以100 mg/L、10 mg/L、1 mg/L和0.1 mg/L浓度 $K_2Cr_2O_7$ 溶液,加入藻类培养液(细胞浓度为 3×10^5),实验时间为96小时。正式实验浓度为9.60 mg/L、6.40 mg/L、4.30 mg/L、2.86 mg/L和0 mg/L $K_2Cr_2O_7$,每个浓度设2个平行样,并设对照。实验开始后定时测量,以光密度为指标测定 EC_{50} 值。

2.5 蚕豆根尖微核实验

蚕豆根尖微核实验基本参照《现代环境生物学实验技术与方法》。主要仪器有显微镜,松滋青皮蚕豆,重铬酸钾($K_2Cr_2O_7$)。将蚕豆种子浸泡、催芽,待初生根长至2 cm~3 cm。预实验后,用32.55 mg/L、21.70 mg/L、14.50 mg/L、9.67 mg/L和6.44 mg/L重铬酸钾溶液处理根尖,并用蒸馏水作对照处理。然后使根尖细胞修复培养过夜,最后固定观察根尖细胞。以微核率测定 EC_{50} 值。

3 结果与分析

3.1 EC_{50} ($K_2Cr_2O_7$ 参比)比较

采用五种方法测定相同的水质样品 EC_{50} ,其大小见表1,排序为:发光细菌法<大型蚤类毒性实验法<藻类急性毒性实验<蚕豆根尖微核法<鱼类急性毒性实验,说明在五种方法中,发光细菌法最为敏感。

3.2 平行实验重现性比较

每种方法均做了两组平行实验,通过平行实验数据的集中度,大致可以看出鱼大型藻类毒性实验、藻类毒性实验最好,鱼类毒性实验、蚕豆根尖微核次之,发光细菌毒性实验重现性最差。

EC₅₀(K₂Cr₂O₇ 参比)比较和平行实验重现性比较结果,均与国外报道相符^[9]。下面就各方法在应用中的优点和缺点、成本、研发方向给予分析比较,见表1。

表1 五种毒性检测实验的综合比较

比较方法	鱼类急性毒性实验	大型蚤类毒性实验法	藻类急性毒性实验	发光细菌法	蚕豆根尖微核法
准确度	较好	较好	好	好	好
EC ₅₀ K ₂ Cr ₂ O ₇ 参比	198 mg·L ⁻¹	1.10 mg·L ⁻¹	5.328 mg·L ⁻¹	1.073 mg·L ⁻¹	18.05 mg·L ⁻¹
灵敏度	低	一般	较高	高	较高
重现性	较好	好	好	不高	较好
操作时间	常规24 h, 48 h, 96 h	常规24 h, 48 h; 趋光行为抑制试验: 3 h	常规96 h	20 min	数天
检测范围	适合单一化学物质的毒性测定	可溶的化学物质, 工业废水, 生活污水, 地表水、地下水	可溶的化学物质, 工业废水	可溶的化学物质, 工业废水, 生活污水, 纳污水体	生活污水, 地表水、地下水
应用程度	广泛	广泛	不广泛	不广泛	广泛
研发方向	缩短实验时间, 简化实验操作过程	缩短实验时间, 简化实验操作过程	缩短实验时间, 简化实验操作过程, 海水毒性监测	淡水发光菌毒性检测技术, 发光细菌光纤传感器	化工废水遗传毒性
操作简便程度	鱼类驯养时间长, 操作复杂	蚤类易培养, 操作较简便	藻类培养时间长, 操作复杂	发光菌复苏培养简便, 操作简便	蚕豆易培养, 操作较简便
经济成本	不需要昂贵的仪器设备及特殊试剂, 斑马鱼便宜, 成本较低	蚤类容易培养且成本低, 不需要昂贵的仪器设备及特殊试剂, 成本低	不需要昂贵的仪器设备及特殊试剂, 水蚤便宜, 成本较低	发光菌种不易培养需购买, 需要昂贵的仪器设备, 故成本高	蚕豆易培养成本低, 不需要昂贵的实验仪器设备及特殊试剂, 成本低

4 结论

(1) 与传统的鱼、蚤和其它生物毒性检测方法相比, 发光细菌法简便、快速、灵敏、适应性强、精度高、用途广, 一次试验能够定性或定量鉴别被测水样中全部有毒物质, 不需生物专业人员。具有广泛的应用前景。

(2) 在未来, 建立一种快速、灵敏、简便的测定水污染物急性毒性的方法和便于现场使用的装备是非常必要的, 发光菌法在线式自动监测和发光菌生物传感器将很好满足这一要求, 将有待于进一步的研究。

(3) 目前对海水水质毒性的检测已显得越来越重要, 但这方面的研究显然不多。在海洋环境监测中, 鱼类、大型蚤类急性毒性实验、蚕豆根尖微核实验和发光细菌检测法能否成功用于海洋环境监测还需要进一步的探索, 譬如, 在样品处理过程中, 就可能受到盐度、酸碱度等因子的影响。许多环境化学物的毒性数据是从淡水环境监测中得到的, 这些数据能否用于推断海水的毒性仍不十分清楚。因此, 海洋化学监测数据与遗传毒性数据的关系、海水质量的遗传毒性判断标准都有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Shijin, Paul O Frymier. Continuous toxicity of biological wastewater treatment system influent using a bioluminescent reporter bacterium, water environment federation [C]. 74th Annual Conference & Exposition, Atlanta, Georgia, U. S. A., 2001.
- [2] 黎雯, 徐盈, 吴文忠, 等. 鱼肝 EROD 酶活力诱导作为二噁英的水生态毒理学指标[J]. 水生生物学报, 2000, 24(3): 201-207.
- [3] 吴永贵, 黄建国, 袁玲. 利用隆线蚤趋光行为评价铬的生物毒性[J]. 应用生态学报, 2005, 16(1): 171-174.
- [4] 陈德辉, 王罡, 章宗涉, 等. 光合率作为藻类毒理测试指标[J]. 水生生物学报, 1999, 23(5): 449-454.
- [5] G/T 15441-1995 水质急性毒性的测定发光细菌法[S].
- [6] GB/T 13267-91 物质对淡水鱼(斑马鱼)急性毒性静态测定方法[S].
- [7] GB/T 13266-91 物质对蚤类(大型蚤)急性毒性测定方法[S].
- [8] 孔志明主编. 现代环境生物学实验技术与方法[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2005, 1.
- [9] Ricca DM, Cooney JJ. Coliphages and indicator bacteria in boston-harbor[J]. Massachusetts Environmental Toxicology, 1999, 14(4): 404-408.