

# 发光菌的流动注射分析体系及其应用<sup>1)</sup>

袁东星 邓永智 樊 敏

(厦门大学环境科学研究中心, 厦门, 361005)

## 摘 要

本文以明亮发光杆菌 (*photobacterium phosphoreum*) 作为污染物毒性检测的指示生物, 探讨了有机磷农药、酸、碱、酚等污染物对发光细菌的毒性作用; 研究了 pH 值、温度对有机磷农药降解的影响; 测定了该体系对水体中的部分重金属离子、无机离子、阴离子洗涤剂 SDS 和大肠杆菌的检测灵敏度; 并对采自于厦门市区的若干水样进行监测分析。

**关键词:** 发光菌, 流动注射。

当发光菌 (*photobacterium phosphoreum*) 受到有毒物质毒害时, 菌体会受抑制从而使发光强度减弱, 减弱程度与物质的毒性和浓度呈某种线性相关关系。因此, 可以利用发光细菌为敏感的指示生物, 从发光强度的变化探知作用物质的毒性和含量<sup>[1-3]</sup>。本研究在前期工作<sup>[4]</sup>的基础上, 引入近年来发展十分迅速的流动注射分析体系<sup>[5]</sup>, 建立了一种稳定、快速、简便、重现性高的分析方法。并运用该体系研究了有机磷农药降解的环境因子, 探讨了部分环境污染物对发光菌的毒性作用, 并作了若干实际水样的监测分析。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

发光细菌冻干粉, 购自中科院南京土壤研究所; 敌敌畏 (80%乳剂); 甲胺磷 (50%乳剂); 苯酚,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaNO}_2$ ,  $\text{NaNO}_3$  均为分析纯; 大肠杆菌 ( $2300 \text{ 个 ml}^{-1}$ ); 阴离子洗涤剂 SDS (化学纯);  $\text{Cu}^{2+}$ :  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  (光谱纯);  $\text{Pb}^{2+}$ :  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  (光谱纯); HCl 溶液:  $3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $6 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  (分析纯); NaOH 溶液:  $0.3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  (分析纯)。

沈阳肇发自动分析研究所研制的 LZ-2000 型组合式流动注射仪, 中科院南京土壤研究所研制的 DXL-2 型生物毒性测试仪, 电热恒温水浴锅, 函数记录仪, pH 计。

### 1.2 样品的配制和采集

用二次去离子水配制 3% (W/V) NaCl。以 3%NaCl 溶液配制  $1.0 \text{ mol} \cdot \text{ml}^{-1}$  的敌敌畏和  $1.0 \text{ mol} \cdot \text{ml}^{-1}$  的甲胺磷作为储备液, 使用时用 3%NaCl 稀释到所需浓度。按实验要求配制不同浓度、pH 值、温度的待测液。实验用水均为二次去离子水, 稀释样品和载

1) 福建省自然科学基金资助项目。

液用 3%NaCl。水样采自厦门岛内或海滨。对所采集的水样,若为海水的可直接测定;若为淡水,则加固体 NaCl 至其浓度为 3%。

### 1.3 发光菌的激活

取一支装有冻干粉的安瓿瓶,割开瓶口,加入 2.5mL 3%NaCl 溶液,使发光菌激活,恢复其正常发光能力。将稀释后的细菌液保存于 5℃ 的冰水浴中,当日使用<sup>[6]</sup>。

### 1.4 流动注射分析

图 1 为流动注射分析的流程图,表 1 为对应的分析程序。设计时发光菌溶液 R 本可由泵 1 输送,然而在实际工作中,考虑到节约菌液,故以注射器手工推送菌液充满采样环 2,其它管道和整个分析程序不变。

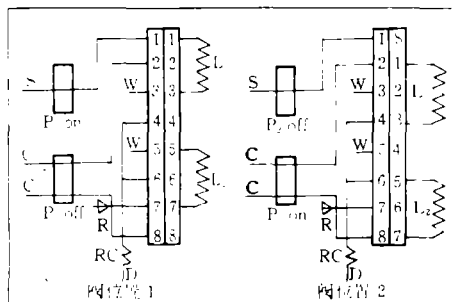


图 1 流动注射分析流程图

P: 泵, L: 采样环, L<sub>1</sub>: 100μl, L<sub>2</sub>: 10μl,  
RC: 反应管, D: 检测器, C: 载液 (3%NaCl),  
S: 试样溶液, R: 发光菌溶液, W: 废液。  
阀位置 1 为采样位置, 阀位置 2 为注射位置

Fig. 1 Manifold of the FIA system

表 1 流动流射分析程序

Table 1 FIA procedure program

步骤	阀位置	泵 1*	泵 2**	时间/s	说 明
1	1	停	转	15	L <sub>1</sub> 充满试样, L <sub>2</sub> 充满发光菌液
2	2	转	停	8	试样与发光菌混合
3	2	停	停	40	停留, 毒物与细菌反应
4	2	转	停	60	反应后的试液被送往检测器、清洗管道和流通池

\* 1.5ml · min<sup>-1</sup>; \*\* 1.2ml · min<sup>-1</sup>

### 1.5 生物毒性测试仪的改装

生物毒性测试仪原有的样品池为固定样品池,因而设计制作了流动体系的流通池。在方形硅橡胶片中凿一个直径为 1.6cm 的圆孔,两边各开一口,安上导管,上下各盖一片厚度为 2mm 的光学玻璃,各连接处用环氧树脂固定密封。将此流通池用染黑的泡沫材料固定在仪器原有样品池位置上。

### 1.6 试样的测试

按流程图安装好流动注射管道,泵入载液,检查管道接口是否有溶液漏出,调整生物毒性测试仪的参数。将待测样品依次送往流路中的“S”位置,运行流动注射程序。生物毒性测试仪显示发光强度值,记录仪记录发光强度变化的相应峰形,作为分析结果的数据。每个试样重复进样 3 次。

### 1.7 数据处理

生物毒性测试仪所记录的发光强度为无量纲, 因各个安瓿瓶中冻干粉发光菌的总数和活性不尽相同, 不同安瓿瓶的同体积发光菌加入同一试样后, 所产生的发光强度读数有一定的差别. 因此, 本研究对数据进行了处理, 采用了相对发光强度. 其中对照样为 3%NaCl.

$$\text{相对发光强度} = \text{试样发光强度} / \text{对照样发光强度}$$

## 2 结果与讨论

### 2.1 发光细菌的相对发光强度与停留时间的关系

在室温的测试过程中, 发光菌被激活之后, 它的发光强度会随时间的变化而改变, 实际分析时, 必须选择发光变化率较小的时刻来测试. 根据文献 [6] 的介绍与本课题组前期研究工作<sup>[4]</sup>的结果, 发光细菌被激活 15min 左右, 发光强度变化趋于平缓. 因此, 在常规测试时, 选择 15min 为试样加菌后至测量发光强度的时间间隔.

本研究借助流动注射分析体系, 可以在发光强度变化速率仍较大的情况下测发光值, 而不需象常规测试那样候至 15min 时测定. 毒物对发光菌的作用需一定时间, 这段时间在流动注射分析体系中表现为停留时间. 然而过长的时间则影响分析速度, 相对发光强度最小且所需时间最少者为佳. 以浓度为  $20\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  的敌敌畏为试液, 采用 3% 的 NaCl 为载液, 改变停留时间, 试验停留时间对发光菌相对发光强度的影响. 结果示于图 2. 从图 2 可以看出, 停留时间在 40s 以下时, 相对发光强度随停留时间的延长而降低; 在 40s 以上时相对发光强度变化则趋于平缓. 因此, 在程序设定中, 选择 40s 为最佳停留时间.

### 2.2 毒物浓度与发光菌相对发光强度的关系

#### 2.2.1 敌敌畏浓度与相对发光强度的相关曲线 (图 3)

配制浓度为  $5\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ,  $25\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ,  $50\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ,  $75\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ,  $100\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  的敌

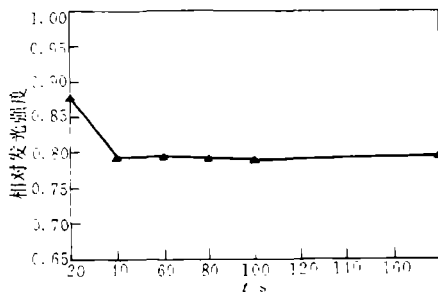


图 2 加毒物后发光菌的相对发光强度与停留时间的关系曲线

Fig. 2 Relationship between relative light intensity of *photobacterium phosphoreum* and reaction time after mixing with toxic material

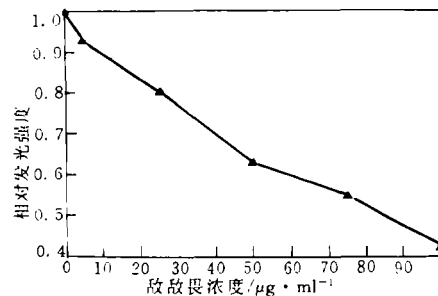


图 3 敌敌畏浓度与发光菌相对发光强度的相关曲线

Fig. 3 Relationship between relative light intensity of *photobacterium phosphoreum* and DDVP concentration

敌敌畏溶液,按实验方法所述,绘制各种浓度的敌敌畏与发光菌相对发光强度的相关曲线即工作曲线,示于图 3.由图 3 可见,随着敌敌畏浓度的增加,相对发光强度降低,表明发光菌的发光强度与毒性呈负相关关系.图 4 为该工作曲线的流动注射发光谱图.

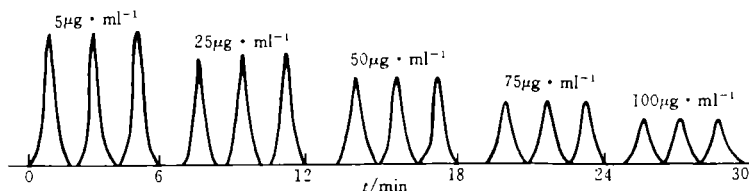


图 4 敌敌畏试液的发光菌流动注射发光谱图

Fig. 4 Recorder output for DDVP

### 2.2.2 酚的浓度与相对发光强度的相关曲线

配制浓度为  $0.5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $1.0\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $2.5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $5.0\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $7.5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $10\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $20\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  的苯酚溶液,分别测得各浓度下发光菌的相对发光强度,相对发光强度与苯酚浓度关系如图 5 所示.从图 5 可见,随着苯酚浓度的增加,相对发光强度降低.

### 2.3 酸碱度对发光菌发光强度的影响

在 3% 的 NaCl 中加入 HCl 溶液或 NaOH 溶液,用 pH 计准确测其 pH 值.配制 pH 值为 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 14.0 的溶液,测得不同 pH 值下发光菌的相对发光强度.其关系如图 6 所示.由图 6 可见,在  $\text{pH}<4$  或  $\text{pH}>8$  时,发光菌的相对发光强度显著降低; $\text{pH}\approx 7$  时,发光菌的发光强度最大.综上所述,发光菌适合在中性条件下生存,酸性或碱性条件对发光菌均有毒害作用,且酸碱性愈强,毒性愈大.因此,用发光菌进行毒性监测时,必须排除试样的酸碱度的影响.

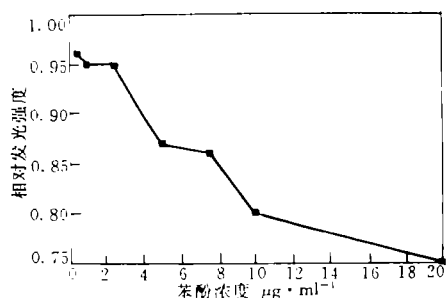


图 5 苯酚浓度与发光菌相对发光强度的相关曲线

Fig. 5 Relationship between relative light intensity and phenol concentration

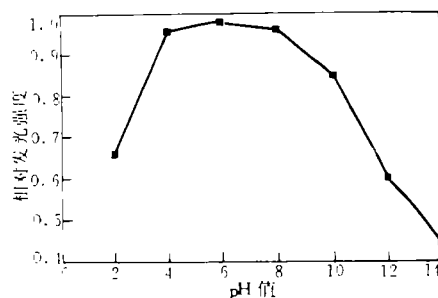


图 6 pH 值与发光菌相对发光强度的曲线

Fig. 6 Relationship between relative light intensity and pH

### 2.4 用发光菌的流动注射分析体系研究有机磷农药的降解

### 2.4.1 温度对有机磷农药降解的影响

将含  $60\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  敌敌畏的样品置于电热恒温水浴锅中, 调节温度至  $80^{\circ}\text{C}$ , 恒温 1.5h 后, 取出静置冷却至室温后进行测定. 室温 ( $16^{\circ}\text{C}$ ),  $40^{\circ}\text{C}$ ,  $60^{\circ}\text{C}$  温度下的实验操作同上. 根据发光菌激活的操作步骤, 测得敌敌畏在各温度下降解后发光菌的相对发光值, 其关系如图 7 所示. 由图 7 可知, 降解的温度愈高, 发光菌的相对发光值愈大, 换句话说, 随着温度的升高, 有机磷农药的降解程度加深.

### 2.4.2 pH 值对有机磷农药降解的影响

取  $60\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  的敌敌畏、甲胺磷分别置于 5 个小容量瓶中, 分别调各试样的 pH 值为 2.0, 4.0, 7.0, 10.0, 12.0, 室温下放置 5h, 测得不同 pH 值条件下, 降解后的敌敌畏、甲胺磷的发光菌相对发光值, 其关系如图 8 所示. 由图 8 可见, 在  $\text{pH}=7$  时, 相对发光值最小, 即农药的毒性最大. 由此可知, 有机磷农药在酸性或碱性条件下, 都有不同程度的降解, 酸碱度愈大, 降解程度愈深. 这与实际情况相符合.

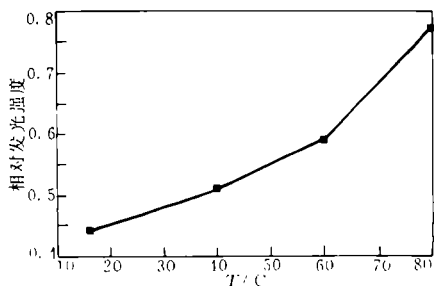


图 7 温度对敌敌畏降解的影响曲线

Fig. 7 Relationship between relative light intensity and decomposition temperature for DDVP

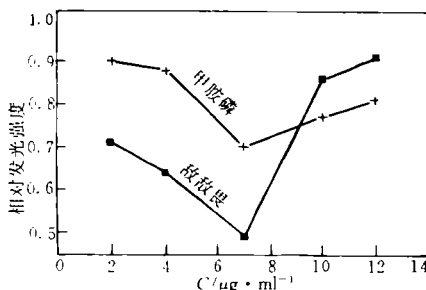


图 8 pH 值对敌敌畏和甲胺磷降解的影响曲线

Fig. 8 Relationship between relative light intensity and pH for DDVP and Methamidophos

### 2.5 其它污染物对发光菌发光强度的影响

本研究对水体中的其它污染物, 如  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ , 十二烷基硫酸钠 SDS、大肠杆菌对发光菌发光强度的影响也进行了试验. 实验表明无机污染物对发光菌的毒性较弱, 大肠杆菌对发光菌有较强的毒性. 表 2 列出了有关的实验数据, 其中检测灵敏度以发光菌的发光值降低 10—20% 为限.

表 2 其它污染物对发光强度的影响

Table 2 Effects of some pollutants on relative light intensity

污染物	$\text{NO}_2^-$	$\text{NO}_3^-$	$\text{PO}_4^{3-}$	$\text{Cu}^{2+} + \text{Pb}^{2+}$	SDS	大肠杆菌
浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	100	46	$1\times 10^4$	各 10	2000	$300\text{个}\cdot\text{ml}^{-1}$
相对发光强度	0.90	0.89	0.88	0.81	0.87	0.85

## 2.6 测定的重现性

已配好的发光菌液在未注入流动注射分析仪的管道前,存于浸在冰浴中的注射器,故其发光强度在数小时内变化不大.即使在操作数小时后菌液自身的发光强度有所降低,由于采用相对发光强度,实验中可经常测试菌液自身的发光强度,以校正误差,保证数据的可靠性.

本研究的前期工作<sup>[4]</sup>中,曾对同一样品的测定重现性进行过研究.3个样品各测10次的结果表明,测定的相对标准偏差在10%以内.发光菌液的活性高时,相对标准偏差仅为2—3%;发光菌液的活性很低时,相对标准偏差接近10%.本研究所建立的分析体系是建立在流动注射分析的基础上的,连续平行测定的精密度相当高,这在图4中可以看出.本研究体系方法测定的相对标准偏差,不会超出常规测定的相对标准偏差.

## 2.7 水样的测定

在上述流动注射分析体系的研究基础上,以3%的NaCl为参比,分析测试采自厦门地区的七个水样.淡水样品中,须加入NaCl使其浓度为3%.测定数据列于表3.水样分析与已知的水质监控分析结果趋势一致,海滨浴场的水质好,轮渡码头的水质差.受生活污水污染的水体,严重毒害发光菌.这些有毒物质,主要是有机污染物.

表 3 水样分析结果

Table 3 Analytic results of water samples

采样地点	水性质	采样点环境	相对发光值	相当于含酚 ( $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )
曾厝安	海水	近郊海滨浴场	0.967	—
厦大海滨	海水	市区海滨浴场	0.957	—
员当湖	咸水	涨潮,泻湖	0.953	—
化学楼边池	小池,淡水	半死水,受化学楼排污影响	0.905	4.0
芙蓉湖	大湖,淡水	半死水,受周围生活区排污影响,富营养化严重	0.842	8.3
轮渡码头	海水	油污染严重	0.814	9.4
半月潭	小池,淡水	半死水,生活污水直接排于此	0.547	>20

## 2.8 小结

本研究所建立的发光菌的流动注射分析体系,分析速度快(每两分钟出一个数据),操作简便,自动化程度高,避免了手工操作引起的误差,重现性好.由于采用流动注射分析,试样和发光菌的用量均很少,对环境的污染小,受交叉污染的可能性也很小.利用发光菌作用指示生物测定污染物毒性以及对有机磷农药的降解分析,均具有一定的实用价值.应用此体系对水质进行监测,无疑是一种经济、简便,快速的测定方法.

## 参 考 文 献

- [1] 顾学廉, 发光细菌检测水士环境毒性的进展和评价. 土壤学进展, 1987, 15 (3) : 48—51
- [2] Saito H H, Sudo Metal. , In Viro Cytotoxicity of Cholorophenols to GFS Cells and Quantitative Structure-Activity Relationships. *Environm. Toxicol. Chem.*, 1991, 10 : 235—241
- [3] Ribo J, Kaiser K. Effects. *Chemsphere*, 1983, 12 : 1421—1424
- [4] 袁东星, 邓水智, 蔬菜中有机磷农药残留的发光菌快速测定. 环境化学, 1997, 16 (1) : 77—81

- [5] 徐淑坤, 朱兆海, 流动注射分析, 北京大学出版社, 1991
- [6] “DXY-2 型生物毒性测试仪”说明书, 1993, 中国科学院南京土壤研究所

1996 年 5 月 12 日收到.

## PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM FLOW INJECTION ANALYSIS SYSTEM AND ITS APPLICATIONS

*Yuan Dongxing    Deng Yongzhi    Fan Min*

(Environmental Sciences Research Center, Xiamen University, Xiamen, 361005)

### ABSTRACT

With *photobacterium phosphoreum* as a bioindicator, a rapid, simple and reproducible flow injection analysis system has been established. The toxicities of the organophosphorus pesticides, acid, alkali and phenol to *photobacterium phosphoreum* were probed into. The effects of pH, temperature on decomposition of organophosphorus pesticides were studied, the detrimental values of some heavy metal ions, inorganic anions, SDS and colin bacillus were determined. Some water samples from Xiamen were analyzed.

**Keywords:** *photobacterium phosphoreum*, flow injection.