

# 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的水质急性毒性监测。

### 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和分析纯试剂、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称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  $\mu\text{l}$ 。

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1h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3g/100ml)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3g/100ml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 <sub>预试1</sub>	CK <sub>预试2</sub>														
后一排	CK	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 <sub>n</sub>
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0.10mg/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15min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0.10mg/L溶液。

## 6.2.2 加3g/100ml氯化钠溶液

用5ml的定量加液瓶给每支CK管加2或5ml氯化钠3g/100ml(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 μl 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 μl 微量注射器(勿用定量加液器以减少误差)准确吸取 10 μl 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 μl(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  $\Delta L$ (mV)后才能作为 CK 发光量(mV)。

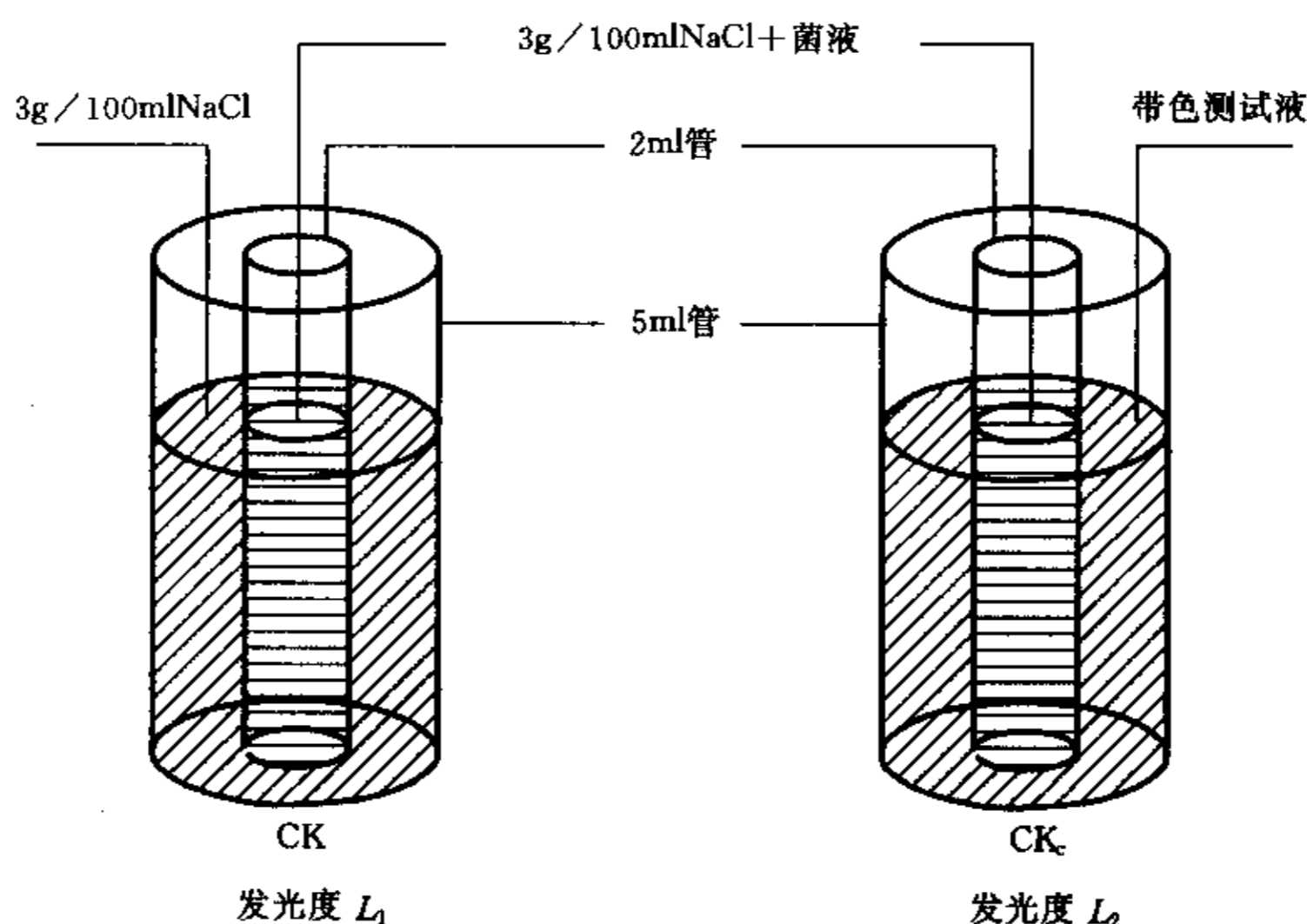


图 1 有色样品溶液测定干扰的校正

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。

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

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

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:

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

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



## 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：

$$T = a + bC$$

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

- 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。