

# Microtox 技术检测多环芳烃生物毒性的研究<sup>\*</sup>

张金丽

袁建军

(集美大学生物工程学院 厦门 361021) (泉州师范学院生物系 泉州 362000)

郑天凌<sup>\*\*</sup>

席 峰

(厦门大学生命科学学院 厦门 361005) (集美大学水产学院 厦门 361021)

**摘 要** 利用 Microtox 技术检测 5 种多环芳烃化合物生物毒性结果表明,二甲亚砜配制的测试液中萘、菲及荧蒹均对发光细菌具有一定生物毒性,且随浓度的增大而增强,相同浓度下毒性菲 > 萘;测试液中当萘浓度小于其溶解度时即产生 100% 的抑光率,萘  $EC_{50}$  为 4.32mg/L,而菲及荧蒹浓度近其溶解度时所产生的最大抑光率分别为 < 50% 和 15% 左右;芘及蒹最大浓度时则对发光细菌无生物毒性显示。表明 Microtox 技术可有效检测低环化合物萘的生物毒性,但对高环化合物(3 环)的检测因受其低水溶性的限制而灵敏度降低,利用二甲亚砜获取多环芳烃污染物提取液的生物毒性主要与低分子化合物萘及菲有关。

**关键词** 多环芳烃 生物毒性 Microtox 技术

**Assay of biotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons by Microtox test.** ZHANG Jin-Li (School of Biotechnology, Jimei University, Xiamen 361021), YUAN Jian-Jun (Department of Biology, Quanzhou Normal College, Quanzhou 362000), ZHENG Tian-Ling (School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005), XI Feng (School of Fisheries, Jimei University, Xiamen 361021), *CJEA*, 2004, 12(4): 68 ~ 71

**Abstract** The biotoxicity of five polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) was assayed by Microtox test. It has been found that some kinds of PAHs such as naphthalene, phenanthrene and fluoranthene have acute toxicity to the test microbes in the water solution produced using DMSO solvent and the toxicity is strengthened with the increasing concentration. The toxicity of phenanthrene is stronger than that of naphthalene at the same concentration. The inhibitory effect of luminosity in the solution of naphthalene is up to 100% under its solubility and the  $EC_{50}$  value of naphthalene is 4.32 mg/L. The inhibitory effect of luminosity in the solution of phenanthrene and fluoranthene is only up to 50% and 15% at the concentration near its solubility, respectively. However, anthracene and pyrene have no effect on the microbes even at their highest concentration. It appears that the sensitivity of the detection of the toxicity of PAHs by Microtox test is restricted to their low solubility, and the toxicity observed in the leachates of PAHs contamination is linked to the low molecular PAHs such as naphthalene and phenanthrene.

**Key words** Polycyclic aromatic hydrocarbons, Biototoxicity, Microtox test

多环芳烃 (PAHs) 为环境中广泛分布的重要污染物之一,因其潜在毒性、致癌性和致畸诱变作用<sup>[9]</sup>,其环境污染的危害及风险评价已成为当今环境科学研究的重要课题<sup>[1,10]</sup>。Microtox 技术(又称发光细菌毒性测试技术)由于其高灵敏性,近年来在多环芳烃污染环境的毒性评价方面已被国外广泛应用<sup>[11,12]</sup>,并被列为我国环境质量生物监测的国家标准<sup>[2,3]</sup>。且发现其在水及溶剂提取液的生物毒性与多环芳烃污染浓度间无显著相关关系<sup>[11,12]</sup>。目前利用 Microtox 技术检测多环芳烃化合物生物毒性的研究尚少见报道。实验利用 Microtox 技术检测研究了多环芳烃化合物萘、菲、蒹、芘和荧蒹的生物毒性,为科学评价多环芳烃污染环境的生物毒性提供理论依据。

## 1 实验材料与方法

实验采用新鲜发光细菌培养测定法进行<sup>[4]</sup>,所用 DXY-2 型生物发光光度计(生物毒性测试仪)由中国科

<sup>\*</sup> 国家自然科学基金项目(30070157)、福建省教育厅基金项目(KB 0316)和福建省泉州市科技计划重点项目(Z200234)共同资助

<sup>\*\*</sup> 通信作者

收稿日期: 2003-08-02 改回日期: 2003-09-30

学院南京土壤研究所研制,发光细菌(*Photobacterium phosphoreum* T3 变种)冻干粉菌剂由中国科学院南京土壤研究所提供,其培养基配方和菌种培养方法见文献<sup>[4]</sup>。供试化合物萘(N)、菲(Ph)、蒽(An)、芘(Pyr)和荧蒽(Fla)均购于 Sigma 公司,测试前用二甲亚砜(分析纯,作溶剂,购自上海制药公司)分别配成一定浓度储备液,然后分别取不同量二甲亚砜溶解的有机物于 30g/L NaCl 溶液中配制系列浓度测试液,实验前先确定二甲亚砜作溶剂使用浓度及多环芳烃的实验浓度。测定时取 2mL 不同浓度待测液置于具塞磨口比色瓶(直径 1.2cm ×高 5cm)中,以 2mL NaCl(30g/L)溶液作对照(CK),每浓度设 3 管重复。将已培养好的 2mL 菌液用适量 NaCl(30g/L)溶液稀释(控制稀释菌液的初始发光度为 800mV 左右),置摇床充 O<sub>2</sub> 振荡均匀后迅速移取 20μL 稀释菌液于各比色管中,加塞上下振摇 10 次后去塞,15min 后将比色管插入生物毒性测试仪中进行发光强度检测,测定结果以相对发光度表示,样品管与对照管发光强度比值即为相对发光度(%),取 3 次重复测定平均值(样品 3 次重复测定结果相对偏差应 ≤ 15%<sup>[2]</sup>,否则须重新测定)。

## 2 结果与分析

### 2.1 发光细菌发光强度随测定时间的变化

由图 1 可知发光细菌发光强度在反应(暴露)初始(1min)有所上升,尔后(2min)在毒物作用下其发光强度随测定时间的延长而下降,2~5min 时降幅较小,每 min 降幅约为初始值的 3%;6~12min 时降幅最大,每 min 降幅约为初始值的 6%;13~16min 时降幅与 2~5min 时相似;17~22min 时降速更为缓慢,至 29min 后趋于平稳。其原因可能是反应初始菌液瞬时被稀释而使发生强度有所升高,尔后可能因毒物抑制细菌细胞发光反应(使细菌荧光素酶失活)而使发光强度下降,但此剂量下并未产生致死效应,此后由于细胞的“应激”作用而使发光强度降速减缓<sup>[5]</sup>。与耗时数天的鱼体毒性试验比较 Microtox 技术最大优点是检测时间短,检测水质毒性通常仅需几分钟暴露时间,考虑不同化合物的毒性作用模式可能不同,稍长暴露时间可消除潜在的扩散问题,因此 Microtox 技术常用测定时间为 5min、15min 及 30min 等<sup>[13]</sup>。由图 1 可知延长检测时间(达 30min)可提高检测的灵敏度<sup>[5]</sup>,但为便于比较,本研究按国标要求选择变化较为缓慢的第 15min 作为检测时间。

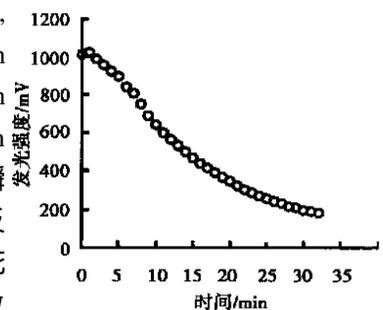


图1 发光细菌发光强度随时间的变化

Fig. 1 Change of luminosity of *P. phosphoreum* with time course

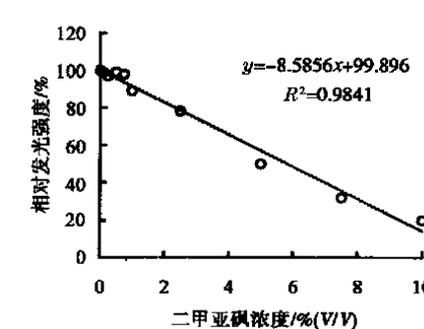


图2 二甲亚砜对发光细菌发光强度的影响

Fig. 2 Effect of DMSO on the luminosity of *P. phosphoreum*

### 2.2 二甲亚砜对发光细菌发光强度的影响

二甲亚砜相对于其他有机溶剂对发光细菌的毒性较小,故评价环境中有机污染物生物毒性时常用二甲亚砜交换极性的萃取溶剂获取污染物提取液<sup>[14]</sup>。本实验采用二甲亚砜配制多环芳烃化合物测试液,并使其对发光细菌发光强度的影响减至最小,在溶解和测试过程中保持样品溶液中二甲亚砜浓度 0.1%(V/V)。由图 2 可知当二甲亚砜浓度为 0.1%~0.75%(V/V)时对发光细菌发光强度无甚影响,其相对发光强度保持在 97%~99%间。当二甲亚砜浓度 > 1%(V/V)时对发光细菌发光强度的影响显著,且随二甲亚砜浓度的升高而发光细菌发光强度逐渐减弱,二者间存在极显著负相关关系( $P < 0.001$ )。当其相对发光强度降低 50%时,二甲亚砜的 15min EC<sub>50</sub>值(细菌发光半数抑制剂

量)为 5.8%(V/V)。

### 2.3 不同多环芳烃对发光细菌发光强度的影响

不同多环芳烃化合物对发光细菌发光强度的影响研究结果见图 3~5。由图 3 可知萘浓度为 0.50~8.04mg/L 时其相对发光强度随萘浓度的增加而逐渐减弱,相对发光强度与萘浓度间存在极显著负相关关系( $P < 0.001$ );萘浓度为 0.50mg/L 时其相对发光强度降为 91%;萘浓度为 8.04mg/L (小于萘溶解度)时其相对发光强度降至 24%;并测得萘 15min EC<sub>50</sub>值为 4.32mg/L。说明水溶液中萘对发光细菌具有一定生物毒性,且随萘浓度的增大而逐渐增强,萘浓度小于其溶解度时可完全抑制发光细菌发光反应(其抑光率达 100%)。由图 4 可知菲浓度为 0.27~1.37mg/L 时其相对发光强度随菲浓度的增加而逐渐减弱,且其相对发光强度与菲浓度间存在显著负相关关系( $P < 0.05$ );菲浓度为 0.27mg/L 时其相对发光强度降为 76%,发光细菌受明显抑制;菲浓度为 1.37mg/L 接近其溶解度水平时其相对发光强度降至 56%,对发光细菌的抑制作用大于相

同浓度萘表现。说明水溶液中菲对发光细菌具有较强生物毒性,其毒性大于萘,且随菲浓度的增大而逐渐增强,但因其水溶性较低,故测试液中菲浓度所产生的抑光率 $< 50\%$ 。由图5可知荧蒽浓度为 $0.01 \sim 0.23\text{mg/L}$ 时其相对发光强度随荧蒽浓度的增加而逐渐减弱,其相对发光强度与荧蒽浓度间存在显著负相关关系( $P < 0.01$ ),但在荧蒽最大实验浓度 $0.23\text{mg/L}$ 时(略小于其溶解度),其相对发光强度仍为 $87\%$ ,小于 Microtox 技术毒性检测的临界发光强度( $90\%$ )<sup>[6]</sup>。说明水溶液中荧蒽对发光细菌具有一定生物毒性,且随荧蒽浓度的增大而略增强,但因其水溶性更小,测试液中荧蒽浓度仅产生弱的抑制作用,其抑光率为 $15\%$ 左右。实验发现芘浓度为 $0.02 \sim 0.20\text{mg/L}$ 时其相对发光强度变化很小,均保持在 $94\%$ 以上,其相对发光强度与芘浓度间不存在显著负相关关系( $P > 0.05$ )。而蒽浓度为 $0.01 \sim 0.11\text{mg/L}$ 时,其相对发光强度基本未受影响,蒽最大实验浓度 $0.11\text{mg/L}$ 时,其相对发光强度仍为 $100\%$ 。由于芘、蒽水溶性很小,在水溶液中所形成的浓度不足以对发光细菌产生毒性效应<sup>[15]</sup>,故芘、蒽最大实验浓度时对发光细菌也无生物毒性显示。

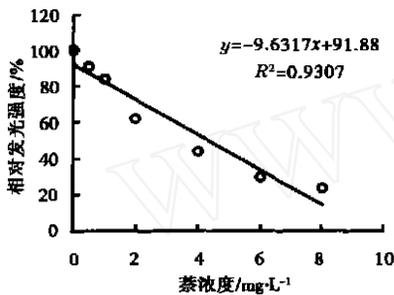


图3 萘对发光细菌发光强度的影响

Fig. 3 Effect of naphthalene on the luminosity of *P. phosphoreum*

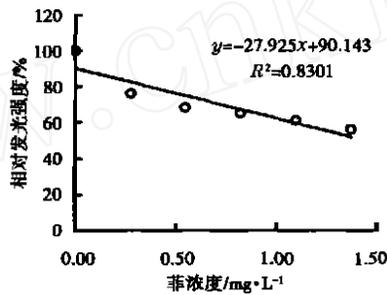


图4 菲对发光细菌发光强度的影响

Fig. 4 Effect of phenanthrene on the luminosity of *P. phosphoreum*

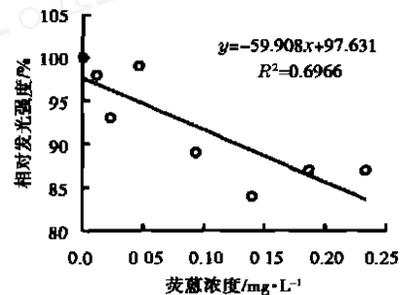


图5 荧蒽对发光细菌发光强度的影响

Fig. 5 Effect of fluoranthene on the luminosity of *P. phosphoreum*

### 3 小结与讨论

多环芳烃水溶性是影响其毒性的主要因素<sup>[15]</sup>。多环芳烃随分子量从二环到三环的增大而毒性增强;当分子量继续增大时 $4 \sim 5$ 环多环芳烃除荧蒽仍具有较强毒性外,其他化合物毒性反而减弱<sup>[16]</sup>。本实验研究结果表明利用二甲亚砜配制的测试液中萘、菲及荧蒽对发光细菌均产生一定生物毒性,且毒性菲 $>$ 萘;水溶液中萘浓度可完全抑制发光细菌的发光反应,并测得萘 $15\text{min}$   $\text{EC}_{50}$ 值为 $4.32\text{mg/L}$ ;而水溶液中菲及荧蒽浓度分别仅产生 $< 50\%$ 及 $15\%$ 左右的抑光率;水溶性更小的芘及蒽对发光细菌则无生物毒性显示。已有相关研究表明萘、菲对鱼体(麦穗鱼)的 $96\text{h}$   $\text{LC}_{50}$ 值分别为 $7.180\text{mg/L}$ 和 $0.224\text{mg/L}$ <sup>[7]</sup>,萘、菲对海洋浮游植物的 $72\text{h}$   $\text{EC}_{50}$ 值分别为 $3.9 \sim 7.3\text{mg/L}$ 和 $0.6 \sim 1.92\text{mg/L}$ <sup>[8]</sup>。这表明二甲亚砜作助溶剂 Microtox 技术可在一定程度检测出多环芳烃化合物的毒性大小顺序,尤对低环化合物萘的检测较灵敏有效,且检测时间更短,而对高环化合物( $3$ 环)的检测因受其低水溶性的限制而灵敏度降低。故利用二甲亚砜获取多环芳烃污染提取液的生物毒性主要与低分子化合物萘及菲有关,也表明 Microtox 技术检测多环芳烃污染物提取液的生物毒性与多环芳烃污染浓度间无显著相关性<sup>[11,12]</sup>。故弱极性有机污染物多环芳烃的毒性检测中应选择使用更高效的增溶剂以提高其测试灵敏度。近年有关低毒性非表面活性剂和生物表面活性剂的使用研究已见报道<sup>[10,17]</sup>。弱极性有机污染物多环芳烃能与非表面活性剂环糊精形成包合物从而使溶解度显著增加<sup>[18]</sup>,但有研究表明利用羟丙基- $\beta$ -环糊精配制高达溶解度 $6.25$ 倍的菲、芘、苯并[a]芘对 $4$ 种发光酶基因标记细菌却无生物毒性显示<sup>[17]</sup>,因此环糊精在多环芳烃污染毒性检测中应用尚需进一步研究确定。另有研究表明利用生物表面活性剂鼠李糖脂和固定化重组发光菌体 GC2 成功检测出土壤中多环芳烃(菲)的生物毒性<sup>[10]</sup>,展示了生物表面活性剂在多环芳烃污染物毒性检测中的良好应用前景。有关生物表面活性剂对不同多环芳烃的增溶及生物毒性测定的影响尚待进一步深入研究。

### 参 考 文 献

- 1 赵云英,马永安. 天然环境中多环芳烃的迁移转化及其对生态环境的影响. 海洋环境科学, 1998, 17(2): 68 ~ 72
- 2 国家环境保护总局,国家技术监督局. 水质 急性毒性的测定 发光细菌法. 北京:中国标准出版社, 1996. 1 ~ 7
- 3 郑天凌,王 斐,陈进才等. 发光细菌监测沿岸水质应用研究. 福建环境, 1997, 14(1): 9 ~ 11
- 4 马文猗,杨柳燕主编. 环境微生物工程. 南京:南京大学出版社, 1998. 104 ~ 108

- 5 黄正,汪亚洲,王家玲. 细菌发光传感器在快速检测污染物急性毒性中的应用. 环境科学,1997,18(4):14~17
- 6 顾宗濂,吴留松,谢思琴等. 黄棕壤填加重金属的毒性评价及其临界浓度确定. 土壤学报,1992,29(2):158~167
- 7 解静芳,吴歧,潘绍先. 多环芳烃的几种理化参数与 $LC_{50}$ 的相关性研究. 上海环境科学,2000,19(10):497~499
- 8 江玉,吴志宏,韩秀荣等. 多环芳烃对海洋浮游植物的生物毒性研究. 海洋科学,2002,26(1):46~50
- 9 Cerniglia C. E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon. Biodegradation,1992,3:351~368
- 10 GU M. B., Chang S. T. Soil biosensor for the detection of PAH toxicity using an immobilized recombinant bacterium and a biosurfactant. Biosensors and Bioelectronics,2001,16:667~674
- 11 Bispo A., Jourdain M. J., Jauzein M. Toxicity and genotoxicity of industrial soils polluted by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Organic Geochemistry,1999,30:947~952
- 12 Hyotylainm T., Oikari A. The toxicity and concentrations of PAHs in creosote-contaminated lake sediment. Chemosphere,1999,38(5):1135
- 13 Kaiser K. L. E., Palabrica V. S. Photobacterium phosphoreum toxicity data index. Water Poll. Res. J. Canada,1991,26(3):361~431
- 14 Gazzella L. Comparison of test procedure for sediment toxicity evaluation with vibrio fischeri bacteria. Chemosphere,1998,37(14~15):2895
- 15 Sved D. W., Roberts M. H., VanVeld P. A. Toxicity of sediments contaminated with fractions of creosote. Wat. Res.,1997,31(2):294
- 16 Rossi S. S., Neff J. M. Toxicity of polynuclear aromatic hydrocarbons to the marine polychaete Nereis arenaceodentata. Mar. Pollut. Bull.,1978,9:220~223
- 17 Reid B. J., Semple K. T., Macleod C. J., et al. Feasibility of using prokaryote biosensors to assess acute toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. FEMS Microbiology Letters,1998,169:227~233
- 18 Wang X., Brusseau M. L. Cyclopentanol-enhanced solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons by cyclodextrins. Environ. Sci. Technol.,1995,29:2346~2351

### 欢迎订阅 2005 年《中国农业资源环境文摘》

《中国农业资源环境文摘》(原名《中国农业文摘——土壤肥料》)于1985年创刊,收录了全国200余种农业科技期刊中关于土壤学、肥料学、植物营养学和生态环境科学方面的文献,是本学科专业核心期刊评价的指标刊物,也是我国本学科唯一文献检索刊物。2003年起《中国农业文摘——土壤肥料》更名为《中国农业资源环境文摘》,原办刊宗旨与发行范围不变。报道内容包含原《中国农业文摘——土壤肥料》报道范围,侧重于报道生态农业、环境科学、资源可持续利用以及学科之间交叉领域的新理论、新技术和新方法,为广大土壤科学、资源与环境科学科技工作者服务,促进学术交流,推动学科发展。本刊为双月刊,16开本,刊号:CN 11-4920/S,ISSN 1002-543X。邮发代号:18-124,每期定价10.00元,全年60.00元,国内外公开发行,全国各地邮局均可订阅,漏订者可直接向编辑部补订。地址:(100081)北京市中关村南大街12号中国农业科学院科技文献信息中心《中国农业资源环境文摘》编辑部,电话:(010)68919886转2313。

### 欢迎订阅 2005 年《北京农业》

《北京农业》是由北京市农业局主办的农业科普期刊,主要刊登农业新技术、新品种、新产品和农村实用技术、农业政策信息等,内容丰富,信息量大,适于各层农业管理部门、生产部门、农业院校师生、种养户等阅读。本刊为月刊,每期定价4.00元,全年48.00元。邮发代号:2-87,全国各地邮局均可订阅,漏订者可直接汇款至本刊补订,地址:(100029)北京市西城区裕民中路6号《北京农业》编辑部。