

水质 生物毒性的测定 发光细菌 快速测定法

2020 - 12 - 16 发布

2021 - 01 - 15 实施

目 次

前言	II
引言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 方法原理	1
4 试剂和材料	1
5 仪器设备	2
6 测定	2
7 结果计算与表示	3
8 方法的精密度	3
附录 A（资料性附录） 结果判定参考内容	4

前 言

本文件按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由黑龙江省生态环境厅提出并归口。

本文件参与起草单位：黑龙江省生态环境监测中心。

本文件主要起草人：王鹏杰、曹胜、邢延峰、孟庆庆、李博、胡丽娜、张蕊、杨宏坤、姜景阳、关吉鑫、李经纬、王国梁、李海智、芦旭峰、苏晓慧、于宗灵、柏广宇、李慧。

引 言

为贯彻《中华人民共和国环境保护法》和《中华人民共和国水污染防治法》等法律法规，保护和改善生态环境，保障人体健康，制定本文件。

水质 生物毒性的测定 发光细菌快速测定法

1 范围

本文件规定了水质 生物毒性的测定 发光细菌快速测定法的方法原理、试剂和材料、仪器设备、测定、结果计算和表示及方法的精密度。

本文件适用于工业废水、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 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 15441-1995 水质 急性毒性的测定 发光细菌法

3 方法原理

水样在一定的时间和条件下与发光细菌接触后，发光细菌的发光强度变化与水样中毒性组分总浓度呈负相关关系，通过生物发光光度计测定水样与发光细菌接触一定时间后的发光抑制率来表征水样的急性毒性水平。

4 试剂和材料

4.1 所有的试剂除另有说明外，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。

4.2 超纯水，常温保存。

4.3 氯化汞母液（2000mg/L）。

4.5 复苏稀释液（0.85%的氯化钠溶液）。

4.6 渗透压液（17%的氯化钠溶液）。

4.7 青海弧菌 Q67。

注：菌株冻干粉封装于透明小玻璃瓶中，于-18℃至-20℃下储存。使用前，添加复苏液使发光细菌恢复活性后用于毒性测试。

5 仪器设备

生物发光光度计技术规格：可探测光谱范围，320nm~1000nm；探测结果范围，0~65535 RLU；最快检测时间，5min；相对发光强度，0-200%；可进行ATP测试；测试试管，规格为5ml的反应试管和10ml的测试试管。

6 测定

6.1 测定条件

6.1.1 室温

室温20-25℃，同一批样品在测试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

若需测定包括pH影响在内的急性毒性，不应调节水样pH。

若需测定排除pH影响在内的急性毒性，需将水样和复苏液（氯化钠0.85g/100ml）pH测前调至下值：主要含铜的水样为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。

6.2 测定步骤

6.2.1 试管的排列

与塑料或铁制试管架上按以下要求排列试管架：

第一排，依次为反应管01-标准品、反应管02-阴性/阳性质控和反应管03-水样；

第二排，依次为测试管01-标准品、测试管02-阴性/阳性质控和测试管03-水样。

6.2.2 青海弧菌 Q67 冻干粉剂复苏

从冷冻环境(-18℃)中取出青海弧菌Q67冻干粉(含量约为0.0015 -0.0018 g)小瓶，在常温环境(25℃左右)下放置15 min后，启开并轻敲小瓶，确保冻干细菌充分落在小瓶底部。移取0.5 mL 0.85%的复苏液或3%的复苏液至菌种中，摇匀，放置10min后可以使用。

6.2.3 仪器的预热和调零

打开生物发光光度计电源，预热15min，调零，备用。

6.2.4 测试的步骤

按下列步骤进行测试：

a) 分别往三支反应试管中加入2ml的标准品（稀释液），2ml（1:19-稀释液：样品）的阴性质控及2ml（1:19-稀释液：样品）的被测水样；

b) 待冻干粉复苏时间到后，分别往反应管中加入50μl冻干粉复苏试剂（注意混匀）；

c) 混匀后，等待15min反应时间；

d) 分别从反应试管中移取350μl混合液至测试管中（注意尽量不要溅到瓶壁上）；

e) 将测试试管按顺序分别放入到主机中，最终结果以RLI%发光强度表示。

7 结果计算与表示

7.1 计算结果

计算结果以发光强度来表示。

相对发光强度的表达式：

$$\text{相对发光强度}RLI(\%) = \frac{\text{样品发光强度}(s^{-1})}{\text{标准品发光强度}(s^{-1})} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

7.2 结果表示

用氯化汞表达样品毒性，见表1。

表1 氯化汞表达样品毒性

相对发光强度 (RLI)	抑制率 (IR%)	等当的HgCl ₂ 溶液浓度C _{Hg} (mg/L)	毒性级别
90% < RLI ≤ 110%	-10 < IR ≤ 10	C _{Hg} < 0.03	无毒
80% ≤ RLI < 90%	10 ≤ IR < 20	0.03 ≤ C _{Hg} < 0.05	低毒
50% ≤ RLI < 80%	20 ≤ IR < 50	0.05 ≤ C _{Hg} < 0.09	中毒
30% ≤ RLI < 50%	50 ≤ IR < 70	0.09 ≤ C _{Hg} < 0.12	重毒
0% ≤ RLI < 30%	70 ≤ IR < 100	0.12 ≤ C _{Hg} < 0.16	高毒
RLI=0	IR=100	C _{Hg} ≥ 0.16	剧毒

7.3 原始记录表

原始记录表，见表2。

表2 原始记录表

分析号	加菌液时间 (s) (反应开始, 读到秒)	测定时间 (s) (反应分钟, 读到秒)	发光量	相对发光强度	备注

8 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 录 A
(资料性附录)
结果判定参考内容

A.1 干扰的影响

水样的色度会对测量结果产生影响。

A.2 水样预处理

饮用水的测试，需要考虑管网中消毒剂的影响，建议水样静止15min以上或者煮沸放置过夜即可。
