

应用发光细菌监测重金属污染土壤 和底泥的总体生物毒性

吴留松 顾宗濂 谢思琴

(中国科学院南京土壤研究所)

明亮发光杆菌 T_3 变种的生物毒性测定是一项新兴起的方法。该法依据有生物毒性的有机无机污染物对 T_3 菌荧光酶的敏感性,凭借在一定条件下,污染物浓度与 T_3 菌发光度呈线性负相关^[1],从而可以快速、简便地测定污染环境的总体生物毒性。

应用该法监测污染水体的总体生物毒性已有报道^[1,2],然未见有关运用该原理监测重金属污染土壤和河海底泥总体生物毒性的报道。为此,近几年来,我们分别探讨了砷、镉、铅污染的土壤和底泥与 T_3 菌发光度之间的关系,并把 T_3 菌作为一种指示菌,以它的相对发光度表征重金属污染土壤和河海底泥的总体生物毒性指标。

材料和方法

1.发光菌为 Y. T. TChan提供的明亮发光杆菌(*Photobacterium phosphoreum*) T_3 变种^[3,4]。

2.仪器为本所研制的GDJ—2型生物发光光度计,记录仪为XWZ—2042型,最大量程为10伏。

3.培养方法:

(1)培养基:酵母浸出汁5克,胰蛋白胨5克,NaCl30克,Na₂HPO₄5克,KH₂PO₄1克,甘油3克(固体培养基加15—20克琼脂),蒸馏水1000毫升,pH6.9,15磅灭菌30分钟。

(2)生长条件:

斜面菌种:将 T_3 菌接种于上述灭菌的新鲜斜面培养基上,20—25℃培养12—14小时。

菌液摇瓶培养:将上述培养12—14小时后的新鲜斜面菌种接种一小环于盛有25毫升无菌培养液的150毫升三角瓶中,20—25℃振荡培养(转速210转/分)12—14小时后立即用于测定。

4.污染土壤样品的采集:

(1)水稻盆栽土壤添加砷($Ca_3(AsO_4)_2$)——0, 10, 20, 30, 40, 60, 100, 200 ppm)、

孙汉中、李勋光、旭军分别提供了可提取态Cd、As、Pb资料,特此致谢。

峰电位正移。

土壤类型 绿肥经土壤或高岭土粉处理后,峰电位较低的水溶性有机物质的极谱峰消失,其中加中国砖红壤和第四纪红色粘土处理的伏安曲线,在0.225—0.400伏处较意大利砂壤土和高岭土粉处理者为平缓。设想这主要是由于前者富含氧化铁,从而在大量吸附带负电荷的有机物质的同时,也氧化峰电位较低的有机物质所致。

镉($\text{CdCl}_2 \cdot 2\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ —0, 1, 3, 5, 10, 30, 60, 100, 200ppm)、铅(PbCl_2 —0, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2500, 4000ppm)和水稻小区土壤添加铅(PbCl_2 —0, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2500, 4000ppm), 分别于水稻分蘖期按各自系列浓度采集土壤样品。

(2) 大田砷、镉、铅污染土壤样品的采集: 1983年秋在湖南桃江铅锌矿区附近, 采集了水稻成熟期受铅锌污染十分严重的污染区、背景区约70个土壤样品; 于江西大吉山钨矿区附近, 采集了水稻成熟期(早晚稻)中度和重度污染区和背景区约200个土壤样品。

所采集的土壤样品均置室温下风干, 经20孔筛作为总体生物毒性待测样品。

(3) 底泥样品的采集: 于1984年8月丰水期采集常州大运河底泥, 1985年2月采集青岛沿海底泥。

5. 总体生物毒性的测定

(1) 土壤浸提液的提取: 按土(风干土或折算成干土的新鲜土)水比为1:1的比例, 将待测土样和蒸馏水置于离心管中, 在旋转式振荡机上振荡1小时(转速210转/分), 放置24小时, 离心20—30分钟(转速4000转/分), 吸取上层清液4毫升入待测样管(管内预先加入27% NaCl 0.5毫升)备用。

(2) T_3 菌发光度的测定: 用3% NaCl 将上述培养好的新鲜菌液稀释至发光度相当于记录仪量程约0.6V处, 用磁力搅拌器充分搅拌均匀, 准确吸取0.5毫升稀释菌液, 分别放入对照管(管内预先加蒸馏水4毫升, 27% NaCl 0.5毫升)和待测样管。然后将对照和待测样管摇匀放置30分钟, 准时放入仪器样品室, 分别测定 T_3 菌发光度, 以对照发光度为百分之百, 待测样品占对照发光度的百分数来表示待测样品总体生物毒性的大小, 同一批样品应控制在同一温度下进行测定, 适宜的测定温度范围为15—25℃。

结果和讨论

基于 T_3 菌发光度随重金属、有机无机污染物浓度的升高而呈线性降低, 根据这一关系, 我们研究证明了 T_3 菌发光度可作为水质总体生物毒性的指标^[1]。通过被重金属砷、镉、铅污染的土壤、河海底泥对 T_3 菌总体生物毒性的测定, 进一步证明了 T_3 菌同样可作为土壤或底泥重金属污染程度的指示菌, 它的相对发光度可作为重金属污染土壤或底泥的总体生物毒性指标。1. 水稻盆栽土壤添加性砷、镉、铅所测生物毒性表明(图1), T_3 菌发光度分别随添加性As、Cd、Pb系列浓度的增高而降低, 其相关系数(r)均呈高度负相关($p < 0.01$)。这一结果表明, 盆栽土壤生物毒性随土壤添加性As、Cd、Pb系列浓度的增加而增强。

2. 水稻小区土壤添加Pb的试验结果与水稻盆栽土壤添加Pb的结果趋势一致, 即 T_3 菌发光

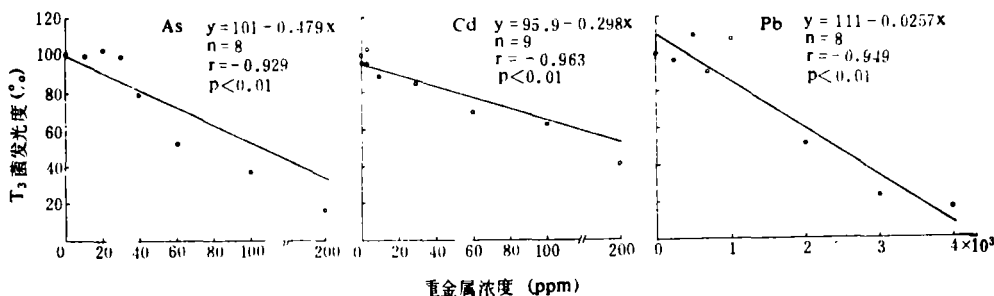


图1 水稻盆栽土壤添加性As、Cd、Pb含量对 T_3 菌发光度的影响

度随小区土壤添加Pb浓度、可提取态(0.5N醋酸提取)Pb含量的增高而降低,它们的相关系数r同样呈高度负相关($p < 0.01$)。其生物毒性也随添加性Pb、可提取态Pb浓度增加而增强(图2)。

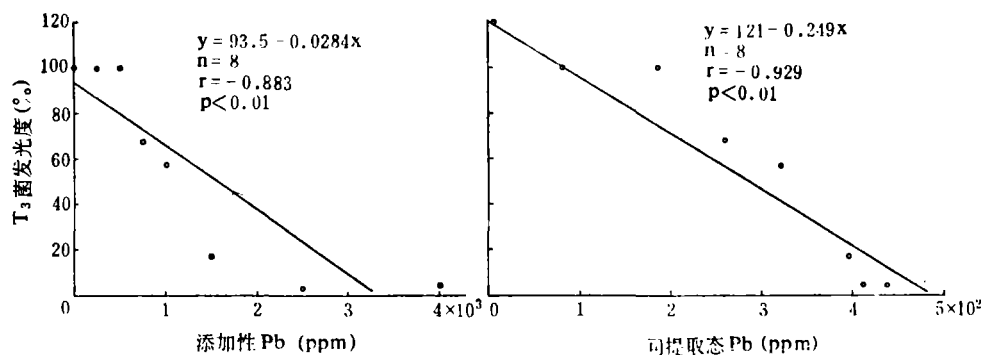


图2 水稻小区土壤添加性Pb及可提取态Pb含量对T₃菌发光度的影响

3.大田重金属污染的水稻土,所测总体生物毒性同样取决于这些污染土壤所含可提取态As(1NHCl提取)、Cd(0.1MNaNO₃提取)、Pb的含量。在湖南桃铅矿污染区,其中铅锌污染十分严重的杨梅州土壤,实测52个土样,其T₃菌发光度大部分等于零,这与污染土样中可提取态Pb、Zn、Cu、Cd含量极高有关(各个土样可提取态Pb、Zn、Cu、Cd的和的平均值为527ppm)。从江西大吉山钨矿污染区实测108个砷、镉污染土壤的总体生物毒性中,该地区重、中二个污染区的早、晚稻土样可提取态As、Cd与T₃菌发光度呈中度负相关,它们的相关系数r分别为-0.446(n=96)和-0.495(n=108),p均<0.01。而早、晚稻背景区土壤总体生物毒性与其可提取As、Cd含量则相关很差或相关不显著。这表明土壤生物毒性仅与污染区土壤可提取态As、Cd含量相关,即仅在污染区内生物毒性才随所含可提取As、Cd含量的

表1 河流与沿海底泥的生物毒性

采样地点	样点号	T ₃ 菌发光度(%)
常州大运河	1	93.7
	2	90.6
	3	65.6
	4	50.0
	5	18.0
青 岛	沿海	
	1	92.1*
	2	70.6

* 砂

的增高而增强。

4.河流与沿海带底泥生物毒性实测结果表明(表1),常州大运河底泥样是沿该运河从上游至下游取5个点的底泥样,测得T₃菌发光度逐点降低,表明从上游至下游底泥生物毒性逐点增强,标志着底泥内污染物浓度逐点增高,这一趋势符合河流污染的一般规律;青岛沿海二个点的底泥样品同样显示出程度不同的生物毒性。

结 束 语

T₃菌发光度与具有生物毒性的有机无机污染物浓度呈线性负相关,因而T₃菌可视为土壤或河海底泥污染的一种指示菌,而它的相对发光度则标志污染物的总体生物毒性并可作为环境污染程度的指标。实测As、Cd、Pb污染土壤样品就证明了这一点,T₃菌发光度随盆栽、小区土壤添加砷、镉、铅浓度的增高而降低,两者呈高度负相关($p < 0.01$)。大田污染土壤实测结果同样表明,T₃菌发光度随可提取态As、Cd、Pb含量的增高而降低,两者呈中度负相

(下转第155页)

表1 I 条件下测定的 pH 值

溶 液 pH	测 定 次 数				平均值	误 差
	1	2	3	4		
4.01	4.01	4.01	4.02	4.01	4.01	0
A	5.20	5.21	5.21	5.20	5.21	
6.86	6.85	6.85	6.87	6.85	6.86	0

注：A为自配的溶液。

电光器件厂 231 型玻璃电极。测定结果列于表 1。I。测定条件：pH4.01和 6.86缓冲溶液标定，用江苏电分析仪器厂复合玻璃电极。测定结果列于表 2。

(2) 在土壤溶液中反复交错测定 测定条件：pH4.01和 6.86 缓冲溶液标定，用上海电光器件厂 231 型玻璃电极。测定结果列于表 3。

2. 讨论。以上测试结果表明仪器输入阻抗高，具有较高的精密度和好的稳定性。

仪器和其它离子选择电极配合经标定后可以直接测定一价离子的 pX 值。仪器可以进行氧化还原电位的测定，也可以用标准曲线法、标准添加法、已知减量法等方法测定溶液的浓度。因此，仪器除测定土壤 pH、氧化还原电位以外，还适合于化工、环境保护、湖泊、医学等方面在实验室或现场测定被测物质的 pH 值或电位。仪器也可以做为一只满度为 2 V 的高阻抗直流数字式电压表使用。

参 考 文 献

- [1] 于天仁、张效年等编著：电化学方法及其在土壤研究中的应用，科学出版社，1980。
- [2] 方建安、周国祥等编著：离子选择性电极测量仪器，江苏科学技术出版社，1984。

注：如需购买 DMP—1 型袖珍式数字 pH/mV 计，请与中国科学院南京土壤研究所开发公司联系。

(上接第 147 页)

关($p < 0.01$)。背景区则二者相关性很差。被污染的河流、沿海底泥也能使 T_3 菌发光度降低而显示其生物毒性。

参 考 文 献

- [1] 顾宗藻等，用生物发光光度计测定污染水体生物毒性，环境科学，4 (5):30, 1983。
- [2] A. A. Bulich and D. L. Isenerg, ISA Transactions 20(1): 30, 1981。
- [3] Tchan. Y. T. et al., Soil Biol. Biochem., 7:30, 1974。
- [4] Tchan. Y. T. et al., Acta Phytopathologia Academie Scientiarum Hungarica, 12:3, 1977。

表2 II 条件下测定的 pH 值

溶 液 pH	测 定 次 数				平均值	误 差
	1	2	3	4		
4.01	4.02	4.01	4.02	4.02	4.02	+ 0.01
B	5.15	5.17	5.17	5.17	5.17	
6.86	6.87	6.86	6.87	6.86	6.87	+ 0.01

注：B为自配的溶液。

表3 土壤溶液的 pH 值

土样号	测 定 次 数				平均值
	1	2	3	4	
1	4.56	4.57	4.55	4.55	4.56
2	4.45	4.45	4.45	4.45	4.45
3	5.49	5.49	5.48	5.48	5.49
4	5.07	5.06	5.05	5.08	5.07
5	8.69	8.70	8.69	8.71	8.70
6	8.93	8.90	8.90	8.91	8.91
7	6.50	6.50	6.52	6.51	6.51
8	4.71	4.69	4.69	4.69	4.70