

应用淡水发光细菌测定土壤 Cu 急性毒性的影响因素研究

韦东普, 马义兵, 陈世宝

(中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 北京 100081)

摘要:在环境污染物的毒性评价和监测中,发光细菌法是一种具有快速、灵敏和廉价等优点的直接生物测试方法。鉴于海水发光细菌在土壤中应用的局限性,本文拟应用淡水发光细菌青海弧菌 Q67(*Vibrio-qinghaiensis* sp.-Q67)进行土壤中 Cu 的毒性测定,并对其在土壤 Cu 急性毒性测定的影响因素进行了研究,包括 pH 对青海弧菌 Q67 发光的影响,背景溶液的选择及 0.01 mol·L⁻¹ CaCl₂ 对毒性测定的影响,以期确定淡水发光细菌测定土壤 Cu 急性毒性最佳条件。结果表明,青海弧菌 Q67 可以应用于 pH 范围在 5.5~9.0 之间的样品;不同的背景溶液中,青海弧菌 Q67 在高浓度人工土壤溶液中的发光最稳定,且不同背景溶液对 Cu 的毒性测定影响差异不显著,因此,推荐高浓度人工土壤溶液作为青海弧菌 Q67 应用于土壤样品毒性测定的背景溶液;常用的土壤浸提剂 0.01 mol·L⁻¹ CaCl₂ 显著降低了 Cu 的毒性(全 Cu 表示)。研究结果对青海弧菌 Q67 毒性测试方法的建立和在土壤中的应用提供了非常重要的依据。

关键词:青海弧菌;土壤;毒性;背景溶液

中图分类号:X172 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2009)07-1386-06

Factors on Application of Bioluminescent Bacteria to Measure Acute Toxicity of Copper in Soils

WEI Dong-pu, MA Yi-bing, CHEN Shi-bao

(Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Bioluminescent bacterial test is a rapid and cost-effective bioassay for risk assessment and monitoring of environmental pollutants. However, there are some limitations when the bioluminescent bacteria from seawater, such as *Vibrio fischeri*, were used in soils because relatively high concentration of NaCl was added in the tested samples. In the present study, the bioluminescent bacteria *Vibrio-qinghaiensis* sp.-Q67 from freshwater was used to develop a bioluminescent bacterial bioassay. The factors and conditions affecting the acute toxicity of copper in soils were investigated, including pH, background solutions and the extractant of 0.01 mol·L⁻¹ CaCl₂. The results showed that Q67 was suitable for the samples of pH 5.5~9.0 in soil environments. According to the bioluminescence and Cu toxicity measured using Q67 in different background solutions, it was found that the bioluminescence of Q67 was more stable in an artificial soil solution with about 0.01 mol·L⁻¹ electrolytes than in other solutions (an artificial soil solution with about 0.001 mol·L⁻¹ electrolytes, artificial lake water, 0.1 mol·L⁻¹ KCl and 0.1 mol·L⁻¹ CaCl₂), so that the artificial soil solution with about 0.01 mol·L⁻¹ electrolytes was suggested as the background solution for bioluminescent bacterial bioassay with *Vibrio-qinghaiensis* Q67. It was also found that the solution of 0.01 mol·L⁻¹ CaCl₂, which was often used as a soil extractant, decreased significantly the toxicity of total Cu in solutions. These results will be helpful to develop a bioluminescent bacterial bioassay for acute toxicity measurement of heavy metals in soils.

Keywords: *Vibrio-qinghaiensis*; soil; toxicity; background solution

青海弧菌 Q67(*Vibrio-qinghaiensis* sp.-Q67)是从我国青海湖的青海裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)体表分离出的一种淡水型发光菌^[1],该细菌具有天然的发光特性,且没有致病性,因此,我国环境领域的

科学家利用青海弧菌作为测试微生物,建立了应用于水环境样品的发光毒性测试方法^[2-3],并在河水样品的毒性测定和水质监测方面进行了初步研究^[4-5]。但关于青海弧菌 Q67 在土壤环境领域方面的研究还未见报道。

由于土壤或污泥基质对微生物的发光和化合物的有效性有较大影响^[6-7],因此将发光细菌应用于土壤等固相污染物的监测还存在很多问题和困难。发光细菌可以直接监测水环境样品的毒性^[8],不需要对水样

收稿日期:2008-10-10

基金项目:国家自然科学基金面上项目(20677077);重大国际合作项目(40620120436)

作者简介:韦东普(1969—),女,副研究员,主要从事重金属污染方面的研究工作。Email:dpwei@caas.ac.cn

通讯作者:马义兵 E-mail:ybma@caas.ac.cn

进行处理。而将发光细菌应用于土壤环境,需要考虑土壤样品颗粒^[9]、土壤样品的组成^[10]及土壤溶液的提取方法^[11]对细菌的发光及毒性测定的影响。

海水发光细菌如 *Vibrio fischeri* 在土壤重金属的急性毒性测定中已有一些应用^[10,12],但是测试时用于维持一定的渗透压环境所添加的 3.5%NaCl 溶液会显著改变样品的背景条件,从而影响重金属毒性测定^[13]。淡水发光细菌不需要加入高浓度的 NaCl 溶液来维持发光,因此用于土壤样品的毒性测定比海水发光细菌具有优势。但由于土壤样品基质的复杂性,淡水发光细菌应用于土壤样品测定的影响因素还不清楚,如 pH、Ca²⁺和电解质浓度等。因此,本文主要研究 pH、背景溶液和土壤溶液浸提剂 CaCl₂ 对青海弧菌 Q67 的发光和毒性测定的影响,为青海弧菌 Q67 在土壤中的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 青海弧菌 Q67 的来源和培养基

青海弧菌 Q67(*Vibrio-qinghaiensis* sp.-Q67)由中国科学院生态环境研究中心提供。培养基^[2]由 13.6 mg KH₂PO₄、35.8 mg Na₂HPO₄·12H₂O、0.25 g MgSO₄·7H₂O、0.61 g MgCl₂·6H₂O、40.46 mg CaCl₂·2H₂O、1.34 g NaHCO₃、1.54 g NaCl、5.0 g 酵母提取液、5.0 g 胰蛋白胨、3.0 g 丙三醇和 1 000 mL 去离子水配制,用 1 mol·L⁻¹ NaOH 将 pH 调为 9.0。

1.2 青海弧菌 Q67 的菌悬液制备

取低温保存的 Q67 纯化菌株转入斜面,22 ℃ 培养 24 h,然后接种于装有 50 mL 上述液体培养基的三角瓶中,22 ℃ 振荡(180 r·min⁻¹)培养 16~18 h,培养液离心(4 000 r·min⁻¹,5 min),除去液体培养基,收集菌体^[2]。在菌体中加入 10 mL 背景溶液,离心(4 000 r·min⁻¹,5 min),弃去背景溶液,重复 1 次,在菌体中加入背景溶液制成菌悬液,用于发光值测定。

1.3 毒性测试方法

取 900 μL 待测溶液加入样品管中,以 15 s 为间隔,在每个样品管中加入 100 μL Q67 菌悬液并混匀,15 或 30 min 后用发光仪(Berthold Sirius,Berthold 公司,德国)测定发光值,保证测定样品的时间间隔为 15 s,每个处理重复 4 次。发光仪测定条件:低背景管,5 s 计数,发光值测定在 22 ℃ 进行。

发光值用 RLU(Relative Light Units)表示,用 Sirius 发光仪表示的 RLU·s⁻¹ 相当于检测器每秒的计数(cps),RLU 因子默认为 1,只有在和其他发光仪的测

定结果进行比较时 RLU 因子才变化。

$$\text{RLU} \cdot \text{s}^{-1} = \text{cps} \times \text{RLU 因子} \quad (1)$$

相对发光率(Relative light rate)(%)=

$$\frac{\text{样品的 RLU}}{\text{对照的 RLU}} \times 100\% \quad (2)$$

1.4 不同背景溶液对青海弧菌 Q67 发光的影响

选择低浓度人工模拟土壤溶液^[14](总电解质浓度约为 0.001 mol·L⁻¹)、高浓度人工模拟土壤溶液、人工模拟湖水^[2]、0.1 mol·L⁻¹ CaCl₂ 和 0.1 mol·L⁻¹ KCl 作为背景溶液,制成菌悬液,分别取 1 mL 菌悬液于样品管中,测定并记录 0、20、40、60、80、100 和 120 min 时的发光值。背景溶液的组成和 pH(Sartorius PB-10,赛多利斯公司,德国)见表 1。

表 1 背景溶液的组成和 pH

Table 1 Composition and pH of background solutions

背景溶液	pH	溶液组成
CaCl ₂ 溶液	6.08	0.1 mol·L ⁻¹ CaCl ₂
KCl 溶液	5.51	0.1 mol·L ⁻¹ KCl
人工模拟湖水 (ALW)	5.65	0.06 mmol·L ⁻¹ KCl, 0.1 mmol·L ⁻¹ CaCl ₂ , 0.23 mmol·L ⁻¹ MgSO ₄ , 0.5 mmol·L ⁻¹ NaHCO ₃
低浓度人工模拟土壤溶液 (LAS)	5.48	0.25 mmol·L ⁻¹ CaCl ₂ ·2H ₂ O, 0.15 mmol·L ⁻¹ KNO ₃ , 0.06 mmol·L ⁻¹ Na ₂ SO ₄ , 0.33 mmol·L ⁻¹ NH ₄ NO ₃ , 0.1 mmol·L ⁻¹ MgSO ₄ ·7H ₂ O
高浓度人工模拟土壤溶液 (HAS)	5.64	2.5 mmol·L ⁻¹ CaCl ₂ ·2H ₂ O, 1.5 mmol·L ⁻¹ KNO ₃ , 0.6 mmol·L ⁻¹ Na ₂ SO ₄ , 3.3 mmol·L ⁻¹ NH ₄ NO ₃ , 1.0 mmol·L ⁻¹ MgSO ₄ ·7H ₂ O

1.5 不同背景溶液对青海弧菌 Q67 测定的 Cu 毒性的影响

分别用 0.1 mol·L⁻¹ KCl、LAS、HAS 和土壤提取液作为背景溶液,配制 Cu 系列溶液 0、0.02、0.04、0.06、0.08、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、3.0 和 5.0 mg·L⁻¹,用 1 mmol·L⁻¹ 2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES,Amresco,美国)缓冲 pH,将 pH 调为 5.5,作为待测溶液。用 HAS 作为背景溶液,按 1.2 的方法制成菌悬液,按照 1.3 的方法进行发光测定。土壤提取液由 0.01 mol·L⁻¹ CaCl₂ 和土壤按照 10:1 的比例混合,振荡 60 min,离心过滤。

1.6 pH 对青海弧菌 Q67 发光的影响

用 1 mmol·L⁻¹ 2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)和 3.6 mmol·L⁻¹ 3-(N-吗啡啉)乙磺酸(MOPS,Amresco,美国)作缓冲剂,配制 pH 为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 的 HAS 溶液。用 HAS 作为背景溶液,按方法 1.2 制成菌悬液。分别取 900 μL 不同 pH 的 HAS 溶液作为待测溶液加入到样品管中,按照 1.3 的方法进行发光测定。

1.7 CaCl₂ 对青海弧菌 Q67 测定 Cu 毒性的影响

配制 Cu 系列溶液 0、0.005、0.02、0.04、0.06、0.08、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 和 3.0 mg·L⁻¹, 分别加入 0(Ca0) 和 0.01 mol·L⁻¹ CaCl₂(Ca10)作为背景溶液, 用 1 mmol·L⁻¹ MES 缓冲 pH, 将 pH 调为 5.5。用 HAS 作为背景溶液, 制成菌悬液, 按 1.3 的方法进行发光测定。

1.8 数据处理

溶液中 Cu 的形态计算采用 GEOCHEM 软件(2.0 版), 输入 pH 值和 Cu、Ca、Mg、K、Na 等阳离子以及 Cl、NO₃ 等阴离子的浓度, 由于试验处于开放系统, 因此假设 CO₂ 的分压为 3.5×10⁻⁴ atm。

青海弧菌 Q67 的半数抑制浓度(50% effective concentration, EC₅₀)采用 Logistic 曲线(方程 3)拟合:

$$Y = \frac{Y_0}{1 + e^{b(X-M)}} \quad (3)$$

式中: Y 表示相对于对照的细菌的发光值, %; X 表示 Cu 浓度(自由 Cu²⁺活度或全 Cu 浓度); Y_0 、 M 和 b 为拟合常数, M 表示 lgEC₅₀。

2 结果与讨论

2.1 不同背景溶液对青海弧菌 Q67 发光的影响

青海弧菌 Q67 是从我国青海湖中的鱼体表面分离的发光细菌, 属于淡水发光菌, 需要加入溶液维持正常的新陈代谢, 我们将保证青海弧菌 Q67 正常发光的溶液定义为背景溶液。考虑到 Q67 将应用于土壤样品的毒性测定, 在选择背景溶液时应考虑以下几个因素: (1)加入背景溶液必须维持发光细菌正常的新陈代谢, 使发光细菌在测定时间范围内可以稳定的

发光; (2)背景溶液不影响土壤溶液中金属的形态, 不对金属的毒性测定产生影响; (3)背景溶液应和土壤溶液的离子强度和成分尽量一致, 以便于在应用于土壤环境样品测定时, 尽量减少对土壤样品毒性测定的影响。

关于不同背景溶液对细菌的发光和毒性测定的影响, 目前研究的比较多的发光细菌是 *V. fischeri*。由于 *V. fischeri* 是海水发光细菌, 因此在测定时为保证适合细菌 *V. fischeri* 的渗透压环境, 需要保持反应体系的盐度高于 3.5% NaCl。但有研究表明, 将 3.5% NaCl 用于新鲜的海水沉积物中会导致 pH 的变化, 测定的急性毒性增大, 提高了产生假阳性数据的风险^[13]。因此, 需要找到更适合 *V. fischeri* 的背景溶液。Onorati 和 Mecozzi^[13]比较了细菌 *V. fischeri* 在 3.5% 的 NaCl 溶液和人工海水(盐度为 3.1%)中的发光特性, 发现 *V. fischeri* 在 3.5% 的 NaCl 溶液中的发光值虽然稳定, 但是一般都低于人工海水中的发光值, 这说明发光细菌 *V. fischeri* 在人工海水中比较活跃, 是因为人工海水为 *V. fischeri* 提供了较为适合的氢离子和渗透环境。所以, 作者认为相近的生活环境更利于发光细菌的生长和发光。

依据上面的因素, 考虑到将用于土壤样品的毒性测定, 选择 HAS、0.1 mol·L⁻¹ KCl、ALW、LAS 和 0.1 mol·L⁻¹ CaCl₂ 作为背景溶液进行研究。

图 1a 为不同背景溶液中, Q67 的发光值在 0~105 min 内的变化趋势。从图中可以看出, Q67 在不同背景溶液中的相对发光率都随时间的延长而逐渐降低。其中, HAS 和 0.1 mol·L⁻¹ KCl 的处理随时间的延

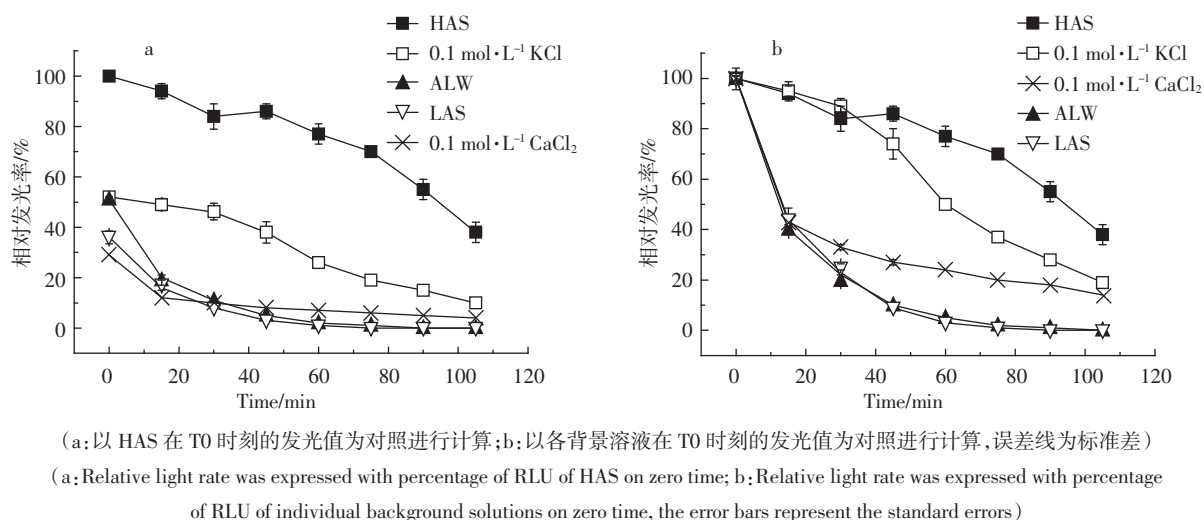


图 1 不同背景溶液对 Q67 发光的影响

Figure 1 The effects of different background solutions on the bioluminescence of Q67

长呈线性降低的趋势,ALW、LAS 和 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ 处理的相对发光率在 0~15 min 之间迅速降低,随后呈逐渐降低的趋势。在所有处理中,HAS 的相对发光率最高,其他处理的相对发光率大部分为 HAS 处理的 50%以下,说明 HAS 作为 Q67 的背景溶液,不但可以保证 Q67 正常发光,而且和其他背景溶液相比可以维持较高的发光强度,这样在进行实际测定时可以保证有较高的灵敏度。图 1b 是以各背景溶液在 T0 时刻的发光值为 100%,计算相对发光率在 0~105 min 内的变化趋势。从图中可以看出,HAS 和 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KCl}$ 处理在 0~105 min 内能够保持一定的发光强度,相对发光率在 32%~100%之间呈线性降低的趋势。随着时间的延长,其他背景溶液的处理的相对发光率降低到较低水平,发光强度已接近仪器的本底值,不能用于发光测定。因此,无论从发光菌的发光强度,还是相对发光率随时间降低的趋势和一定时间内的发光强度的稳定性来考虑,HAS 都是作为 Q67 背景溶液的合适的选择。在有关青海弧菌 Q67 早期的研究中^[2],通常选用 ALW 作为背景溶液进行环境水样品的毒性测试,本试验是将 Q67 应用于土壤样品的毒性测定,从图 1 也可以看出,HAS 作为背景溶液,Q67 的发光稳定性及发光强度都较 ALW 的处理好,而且,其成分与土壤溶液的组成较为接近,因此,高浓度人工模拟土壤溶液可作为青海弧菌 Q67 应用于土壤样品毒性测定的背景溶液。

2.2 不同背景溶液对青海弧菌 Q67 测定的 Cu 毒性的影响

关于不同背景溶液对土壤中金属 Cu 的毒性测定的影响见图 2。选择 LAS、HAS、 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KCl}$ 和土壤提取液作为背景溶液进行比较。从图 2 可以看出,无论用 Cu^{2+} 活度还是全 Cu 表示,LAS、HAS 和 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KCl}$ 作为背景溶液与土壤提取液作为背景溶液测定的 $\lg \text{EC}_{50}$ 没有显著性差异,LAS、HAS、 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KCl}$ 和土壤提取液测定的 EC_{50} (全 Cu) 分别为 12.03、8.44、11.83 和 $12.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,用 Cu^{2+} 活度表示的 EC_{50} 分别为 8.88、4.40、4.13 和 $6.55 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。说明 LAS、HAS 和 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KCl}$ 作为背景溶液不会显著影响土壤中金属的毒性测定。

尽管在本研究中,背景溶液对 Cu 的毒性测定没有明显影响,但从减少测试过程中外部胁迫因素影响的角度考虑,将微生物置于最优化的环境条件下,可以获得较真实的毒性。Onorati 和 Mecozzi^[13]选择具有天然缓冲能力的人工海水作为 Microtox 测定的背景

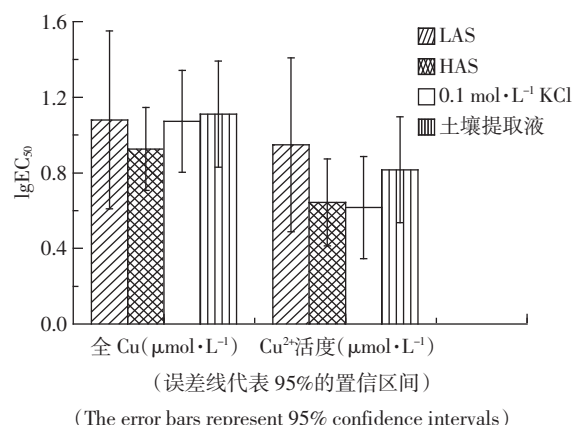


图2 不同背景溶液对 Q67 测定 Cu 毒性的影响

Figure 2 The effects of the different background solutions on the Cu toxicity measured by Q67

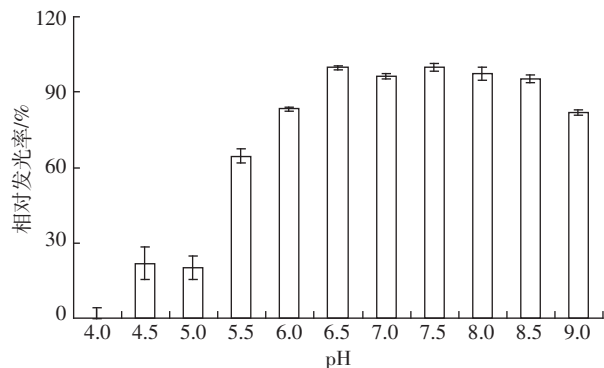
溶液,测定的毒性指标小于 3.5% NaCl 作为背景溶液的处理,这是因为人工海水作为背景溶液使 *V. fischeri* 获得相近的适合环境,从而提高了测定的灵敏度。从这一角度出发,我们考虑背景溶液应尽量与土壤溶液的成分和离子强度一致,以及前面的研究结果,选择 HAS 作为建立 Q67 应用于土壤重金属毒性测定方法中的背景溶液。

2.3 pH 对青海弧菌 Q67 发光的影响

不同 pH 对青海弧菌 Q67 发光的影响见图 3。如图所示,pH 对青海弧菌 Q67 的发光有一些影响。在 pH4.0 时不发光,在 pH4.5 和 pH5.0 的相对发光率较低,都在 25%以下。而在 pH5.5~9.0,大部分处理的相对发光率都在 80%以上,Q67 发光较为稳定,因此可以用于样品的毒性测定。我国土壤的大部分 pH 范围在 4.5~8.5 之间,一般北方土壤为中性或碱性反应,pH 值在 7.0~8.5 之间,而南方红壤、黄壤等多表现为酸性反应,pH 值在 5.0~6.5 之间,因此,青海弧菌 Q67 可以应用于我国大部分土壤样品的测定,和目前在国际上应用较广的海水发光细菌 *V. fischeri* 的 pH6~8 范围比较^[15],Q67 可应用的 pH 范围更宽,因此,可以避免在将来应用到土壤样品时,因调节样品 pH 而对毒性结果产生影响,从而使青海弧菌 Q67 在土壤环境样品毒性测定方面会有较好的应用前景。

2.4 CaCl_2 对青海弧菌 Q67 测定 Cu 毒性的影响

发光细菌毒性测试方法在应用于土壤样品的测定时,将主要应用于土壤样品的水浸提液或 CaCl_2 浸提液或提取的土壤溶液,提取的溶液中含有不同水平的阴阳离子,有研究表明, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Na^+ 等阳离子对金属的毒性会产生影响^[16-18],和其他阳离子相比, Ca^{2+}



(以 pH7.5 的发光值为对照计算相对发光率,误差线为标准差)

(Relative light rate was expressed with percentage of RLU of pH 7.5. The error bars represent the standard errors)

图 3 pH 对青海弧菌 Q67 发光的影响

Figure 3 Effect of pH on the bioluminescence of *V. qinghaiensis* Q67

影响很多金属的毒性^[16,19],而且 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2$ 是提取土壤中生物有效性金属的重要浸提剂,因此,本文就 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2$ 对青海弧菌 Q67 测定的 Cu 毒性的影响进行了研究。

图 4 为 Cu 溶液中 Q67 的相对发光率和全 Cu 之间的剂量效应关系。结果显示与 Ca0 相比,Ca10 处理的 EC_{50} (全 Cu)显著增加,两处理之间差异显著(95% 置信区间,数据未显示),Ca0 和 Ca10 处理的 EC_{50} 分别为 3.16 和 $8.08 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。用自由 Cu^{2+} 活度表示的毒性结果见图 5,加入 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2$ 处理的青海弧菌 Q67 对 Cu 的毒性和不加 Ca 的处理相比有降低的趋势,Ca0 和 Ca10 处理的 EC_{50} 分别为 2.52 和 $4.10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,两处理之间差异不显著(95% 置信区间,数据未显示)。有研究表明, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等阳离子和金属离子竞争生物-水表面的结合位点会降低金属离子的毒性^[16,20],是由于 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等离子的半径和金属离子半

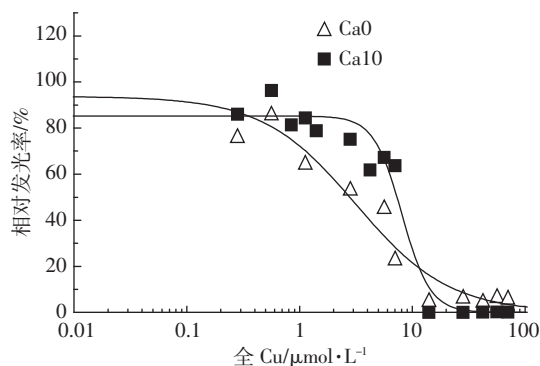


图 4 Cu 溶液中 Q67 的相对发光率和全 Cu 之间的剂量效应关系
Figure 4 Dose-response relationships of the relative light rate as a function of total Cu in solutions

径比较接近,因此,可以取代金属离子通过转运体进入生物体,从而降低了金属离子的毒性。De Schampelaere 等^[16]研究也发现 Ca^{2+} 通过和自由 Cu^{2+} 竞争生物配体的结合位点,从而不同程度地减弱了 Cu 对水蚤的急性毒性。Lock 等^[20-21]发现一定范围的 Ca^{2+} 减轻了 Co 对大麦和蚯蚓的毒性。鉴于 CaCl_2 浸提剂对青海弧菌 Q67 的 Cu 毒性的影响,建议在应用青海弧菌 Q67 测试土壤中 Cu 毒害时应当避免用 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2$ 作为土壤浸提剂,应当使用土壤孔隙水溶液。

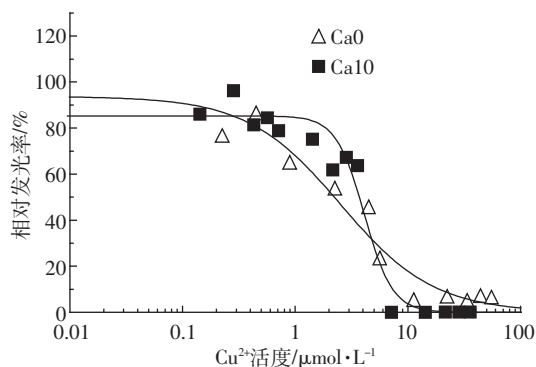


图 5 Cu 溶液中 Q67 的相对发光率和自由 Cu^{2+} 活度之间的剂量效应关系

Figure 5 Dose-response relationships of the relative light rate as a function of free Cu^{2+} activity in solutions

3 结论

(1)青海弧菌 Q67 作为淡水发光菌适用于 pH 范围在 $5.5 \sim 9.0$ 之间的土壤样品,和海水发光细菌相比在土壤样品的毒性测定方面具有更好的应用前景。

(2)通过对不同背景溶液的比较,选择高浓度人工土壤溶液作为将青海弧菌 Q67 应用于土壤样品毒性测试方法的背景溶液。

(3)作为土壤中常用的浸提剂, $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2$ 显著降低青海弧菌 Q67 测定的 Cu 的 EC_{50} (全 Cu)。

参考文献:

- [1] 朱文杰,汪杰,陈晓耘,等. 发光细菌—新种——青海弧菌[J]. 海洋与湖沼, 1994, 25(3): 273-279.
ZHU Wen-jie, WANG Jie, CHEN Xiao-yun, et al. A new species of luminous bacteria *Vibrio qinghaiensis* sp. Nov[J]. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 1994, 25(3): 273-279.
- [2] 马梅. 新的生物毒性测试方法及其在水生态毒理研究中的应用[D]. 北京:中国科学院生态环境研究中心, 2002.
MA Mei. Development and application of new bioassay methods in

- aquatic ecotoxicology[D]. Beijing: Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, 2002.
- [3] Ma M, Tong Z, Wang Z J, et al. Acute toxicity bioassay using the freshwater luminescent bacterium *Vibrio-qinghaiensis* sp. Nov. -Q67[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1999, 62(3): 247-253.
- [4] 刘 赞, 洪 蓉, 朱文杰, 等. 苏州河底泥及河水生物毒性的研究[J]. 华东师范大学学报(自然科学版), 2004(1): 93-98.
- LIU Yun, HONG Rong, ZHU Wen-jie, et al. Study on the toxicity of sediment and water of Suzhou creek[J]. *Journal of East China Normal University (Natural Science)*, 2004(1): 93-98.
- [5] 冉 辉. 应用发光细菌进行水质监测的初步研究[J]. 铜仁师专学报, 2002, 4(2): 56-59.
- RAN Hui. A tentative research on supervision and inspection of the quality of water applying with luminous bacteria[J]. *Journal of Tongren Teachers College*, 2002, 4(2): 56-59.
- [6] Ronnpgel K, Liss W, Ahlf W. Microbial bioassays to assess the toxicity of solid-associated contaminants[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1995, 31(2): 99-103.
- [7] Ivask A, Francois M, Kahru A, et al. Recombinant luminescent bacterial sensors for the measurement of bioavailability of cadmium and lead in soils polluted by metal smelters[J]. *Chemosphere*, 2004, 55(2): 147-156.
- [8] Brown J S, Rattray E A S, Paton G I, et al. Comparative assessment of the toxicity of a papermill effluent by respirometry and a luminescence-based bacterial assay[J]. *Chemosphere*, 1996, 9: 1553-1561.
- [9] Campisi T, Abbondanzi F, Casado-Martinez C, et al. Effect of sediment turbidity and color on light output measurement for microtox basic solid-phase test[J]. *Chemosphere*, 2005, 60(1): 9-15.
- [10] Calace N, Campisi T, Iaconini A, et al. Metal-contaminated soil remediation by means of paper mill sludges addition: chemical and ecotoxicological evaluation[J]. *Environmental Pollution*, 2005, 136(3): 485-492.
- [11] Peltola P, Ivask A, Åström M, et al. Lead and Cu in contaminated urban soils: extraction with chemical reagents and bioluminescent bacteria and yeast[J]. *Science of the Total Environment*, 2005, 350(1-3): 194-203.
- [12] Loureiro S, Ferreira A L G, Soares A M V M, et al. Evaluation of the toxicity of two soils from Jales Mine (Portugal) using aquatic bioassays[J]. *Chemosphere*, 2005, 61: 168-177.
- [13] Onorati F, Mecozzi M. Effects of two diluents in the Microtox® toxicity bioassay with marine sediments[J]. *Chemosphere*, 2004, 54(5): 679-687.
- [14] Ritchie J M, Cresser M, Cotter-Howells J. Toxicological response of a bioluminescent microbial assay to Zn, Pb and Cu in an artificial soil solution: relationship with total metal concentrations and free ion activities[J]. *Environmental Pollution*, 2001, 114(1): 129-136.
- [15] AZUR Environmental, 1998. Microtox acute toxicity test user guide. (www.sdimicrotox.com)
- [16] De Schamphelaere K A C, Janssen C R. A biotic ligand model predicting acute copper toxicity for *Daphnia magna*: the effects of calcium, magnesium, sodium, potassium, and pH[J]. *Environmental Science & Technology*, 2002, 36(1): 48-54.
- [17] Thakali S, Allen H E, Di Toro D M, et al. A terrestrial biotic ligand model. 1. development and application to Cu and Ni toxicities to barley root elongation in soils[J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40(22): 7085-7093.
- [18] 王学东, 马义兵, 华 璐, 等. 铜对大麦(*Hordeum vulgare*)的急性毒性预测模型——生物配体模型[J]. 环境科学学报, 2008, 28(8): 1704-1712.
- WANG Xue-dong, MA Yi-bing, HUA Luo, et al. Development of biotic ligand model (BLM) predicting copper acute toxicity to barley (*Hordeum vulgare*) [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2008, 28(8): 1704-1712.
- [19] Heijerick D G, De Schamphelaere K A C, Janssen C R. Predicting acute zinc toxicity for *Daphnia magna* as a function of key water chemistry characteristics: development and validation of a biotic ligand model[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2002, 21(6): 1309-1315.
- [20] Lock K, De Schamphelaere K A C, Beaulieu S, et al. Development and validation of an acute biotic ligand model (BLM) predicting cobalt toxicity in soil to the potworm *Enchytraeus albidus* [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2006, 38(7): 1924-1932.
- [21] Lock K, De Schamphelaere K A C, Beaulieu S, et al. Development and validation of a terrestrial biotic ligand model predicting the effect of cobalt on root growth of barley (*Hordeum vulgare*) [J]. *Environmental Pollution*, 2007, 147(3): 626-633.