

20种水溶性有机溶剂对发光菌的毒性效应

刘树深^{1*}, 刘芳², 刘海玲¹ (1. 同济大学环境科学与工程学院, 长江水环境教育部重点实验室, 上海 200092; 2. 桂林工学院材料与化学工程系, 广西 桂林 541004)

摘要: 以新型淡水发光菌——青海弧菌Q67(*Vibrio-tinghaiensis* sp. Q67)为检测生物, 应用VeritasTM微孔板光度计测定了甲醇等20种常见水溶性有机溶剂对Q67的毒性效应。结果表明, 乙腈、甲醇、乙醇、丙酮、乙醚、四氢呋喃和异丙醇7种有机溶剂具有非单调J型剂量-效应关系, 其他13种为典型S型剂量-效应关系。分别采用Biphasic、Logit和Weibull等非线性函数进行曲线模拟, 利用模拟函数可有效估算有机溶剂的各个效应浓度EC_x值。不同组成和结构的有机溶剂对淡水发光菌的毒性效应不同, 官能团相同的直链溶剂含碳数越多毒性越大。

关键词: 有机溶剂; 毒性; 青海弧菌Q67; 剂量-效应关系

中图分类号: X503.225 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2007)03-0371-06

Toxicities of 20 kinds of water-soluble organic solvents to *Vibrio-tinghaiensis* sp. Q67. LIU Shu-shen^{1*}, LIU Fang², LIU Hai-ling¹ (1. Key Laboratory of Yangtze River Water Environment, Ministry of Education, College of Environmental Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092, China; 2. Department of Material and Chemistry Engineering, Guilin University of Technology, Guilin 541004, China). *China Environmental Science*, 2007, 27(3): 371~376

Abstract: The Q67 toxicities of 20 kinds of common water-soluble organic solvents ethanol, et al were determined using new type fresh water luminescent bacterium, *Vibrio-tinghaiensis* sp. Q67 as detecting organism, applying VeritasTM photometer. 7 kinds of organic solvents including acetonitrile, methanol, ethanol, acetone, ether, tetrahydrofuran, and isopropanol possessed non-monotone J-type dose-effect relationship, the other 13 kinds were typical S-type dose-effect relationship. Adopting respectively Biphasic, Logit, and Weibull nonlinear functions to carry out curve fitting, utilizing fitted function could estimate effectively each effect concentration EC_x value of organic solvent. The toxic effect of organic solvent of different composition and structure on fresh water luminescent bacterium was different. The more the carbon containing amount of straight chain solvent of same, the greater the toxicity.

Key words: organic solvent; toxicity; *Vibrio-tinghaiensis* sp. Q67; dose-effect relationship

有机溶剂是一类具有脂溶性和挥发性的液体有机化学物质,种类繁多,理化性质差异很大。根据其极性大小一般可分为水溶性和非水溶性两类,水溶性有机溶剂主要用来溶解在水中溶解度较小的极性和弱极性物质。由于有机溶剂广泛地暴露于各个环境单元中,对动植物的生长造成了严重危害^[1],有的已经成为环境中的重点污染物,有些被列为优先控制环境污染物^[2],因此如何准确评价各类有机溶剂的毒性已成为环境科学研究的重要课题^[3]。在某些实验科学中,许多反应和测试是在有机溶剂中完成的,特别是对以低剂量暴露于环境中的有机污染物的毒性测试,有机溶剂的影响和选择尤为重要。

发光细菌荧光酶生物活性测定方法是以发

光细菌作为指示生物的毒性测试方法^[4-7]。刘保奇等^[8]建立了以青海弧菌(*Vibrio-tinghaiensis* sp.) Q67为检测生物,VeritasTM微板光度计为发光强度测定仪器的新型发光菌毒性测定方法,并已成功用于取代酚类物质^[9]和苯胺类物质^[10]的毒性和联合毒性测试。本研究将微板毒性测试方法应用于20种常见水溶性有机溶剂对Q67发光菌的发光毒性测试,并利用非线性最小二乘拟合(NLSF)工具,选择Biphasic、Weibull与Logit等^[11-12]

收稿日期: 2006-10-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20577023);上海市重点基础研究计划(06JC14067);全国优秀博士学位论文作者基金资助(200355)

* 责任作者, 教授, ssluohl@263.net

多种非线性函数研究其剂量-效应关系,以期为合理评价有机溶剂对发光菌的生物毒性以及有效选择有机溶剂作为助溶剂提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料及仪器、试剂

实验用菌种为青海弧菌Q67(华东师范大学生物系),菌种的培养与保存参考文献[9-10,13]。

Veritas™ 微板光度计(美国 Turner Biosystems 公司);LRH-150Z 型恒温振荡培养箱(广东医疗器械厂);LS-B50L 型立式压力蒸气灭菌器(上海医用核子仪器厂);Pipetman 移液器(P20 与 P100 单道及 12 道,法国吉尔森公司);微量振荡器(苏州市东吴医用电子仪器厂)。

甲醇、乙醇、丙酮、乙腈、二甲亚砜、异丙醇、苯酚、乙醚、乙酸乙酯、四氢呋喃、吡啶、N,N-二甲基甲酰胺、甲醛、乙酰丙酮、正丁醇、1-甲基-2-吡咯烷酮、乙二醇均为分析纯试剂(国药集团化学试剂有限公司);乙酸甲酯、水合肼、N,N-二甲基乙酰胺均为化学纯试剂(上海化学试剂厂)。

1.2 实验方法

应用文献[8]的分析方法,在 96 孔微板的第 1、2、4 横排的 12 个孔中分别加入种类相同但浓度不同的有机溶剂样品,第 1 横排的 12 个孔中有机溶剂的浓度是在预试验的基础上,根据稀释因子按等对数间距取得,浓度由大到小呈几何级

数递减,使各浓度产生的发光强度抑制率(E)在 0~100% 均匀分布。第 2、4 横排中 12 孔是第 1 横排相应各孔样品的平行试验,第 3 横排的 12 个孔中不加有机溶剂作为空白对照,每一个孔都用蒸馏水补足至 100 μ L,再用 12 道移液器依次从微板第 1 至第 4 排各孔中加入 150 μ L 培养好的菌液,使每孔内溶液总体积均为 250 μ L。将微板置于微量振荡器上均匀振荡 20~35s,立即转入 Veritas™ 微板光度计中测定各孔样品的发光强度,记录发光菌与样品作用时间大致为 15min 时的发光强度值,计算出 12 个空白测量值的平均值(I_0)和每个浓度的样品 3 次测量的平均值(I),按公式(1)计算出有机溶剂在不同浓度下对发光菌的抑制率。

$$E=(I_0-I)/I_0\times 100\% \tag{1}$$

1.3 不同形状剂量-效应曲线(DRC)的拟合方法

对实验测得的 DRC 散点图进行数学拟合的传统方法是线性回归法,它只适应于 DRC 中线性部分的描述,其他部分特别是低剂量区域信息无法评价,因而不能有效表达整个 DRC 信息。本研究根据实验得到的 DRC 数据散点图的大致形状,并考虑到 DRC 数据实验点的个数,选择能描述实验 DRC 数据的非线性函数,利用 Origin 软件中非线性最小二乘拟合(NLSF)模块,求得各个模型参数,并对模拟效果进行比较分析,选择拟合相关系数最大而拟合均方根误差最小者为最优拟合模型,从而获得完整的 DRC 信息。3 个用于描述实验数据的非线性函数及其反函数见表 1。

表 1 剂量-效应曲线的非线性拟合函数
Table 1 Selected non-linear fitting functions describing dose-response curves (DRC)

函数名称	函数表达式	反函数表达式
Logit(L)	$E=1/(1+\exp(-\alpha-\beta g(c)))$	$c=10^{((\ln(E/(1-E))-\hat{\alpha})/\hat{\beta})}$
Weibull(W)	$E=1-\exp(-\exp(\alpha+\beta g(c)))$	$c=10^{((\ln(-\ln(1-E))-\hat{\alpha})/\hat{\beta})}$
Biphasic(B)	$E=A_{\min}+\frac{(A_{\max 1}-A_{\min})}{1+10^{(c-x_1)/h_1}}+\frac{(A_{\max 2}-A_{\min})}{1+10^{(x_2-c)/h_2}}$	

2 结果与讨论

2.1 7 种有机溶剂的 J 型剂量-效应曲线

实验表明,乙腈、甲醇、乙醇、丙酮、乙醚、

四氢呋喃和异丙醇 7 种有机溶剂对发光菌的毒效应曲线呈非单调的 J 型剂量-效应关系。图 1 为 7 种有机溶剂的 DRC 数据散点图和用 Biphasic 函数拟合的 DRC 曲线,拟合所得模型参数与拟合相关系

数及由模型计算出的半数效应浓度值(EC_{50})等 列于表2.

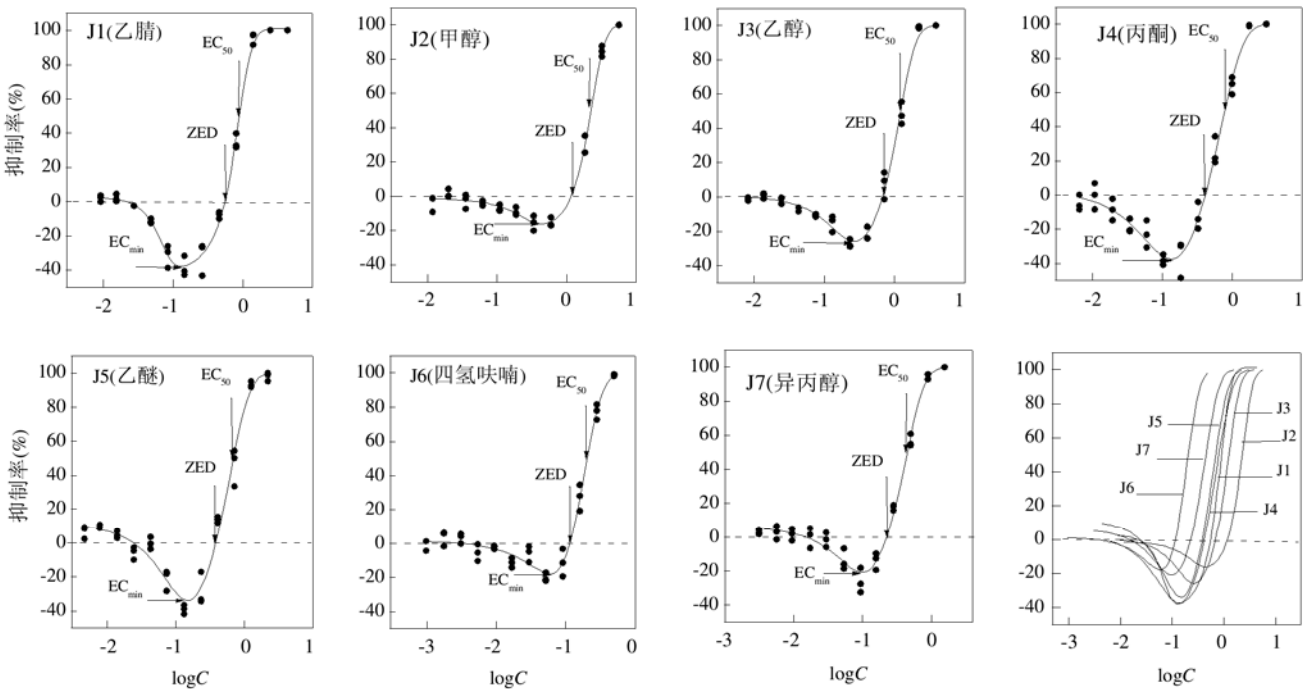


图 1 7种有机溶剂对发光菌Q67的剂量-效应关系
Fig.1 Dose-response curves of 7 organic solvents to the Q67 toxicity
— Biphasic模型拟合值 ● 试验值

表 2 7种有机溶剂对发光菌Q67的毒性效应
Table 2 Toxicities of 7 organic solvents to Q67

编号	溶剂	模型参数					<i>R</i>	EC_{min}	ZED (mol/L)	EC_{50} (mol/L)	pEC_{50}
		A_{min}	x_1	x_2	h_1	h_2					
J1	乙腈	-0.53	0.0533	0.714	19.67	1.725	0.997	0.138	0.551	0.890	0.0507
J2	甲醇	-0.30	0.1458	1.941	3.805	0.670	0.997	0.441	1.157	2.239	-0.350
J3	乙醇	-0.38	0.0789	1.057	8.485	1.214	0.995	0.235	0.705	1.243	-0.0968
J4	丙酮	-0.55	0.0322	0.601	20.16	1.656	0.990	0.107	0.447	0.802	0.0961
J5	乙醚	-0.42	0.0557	0.567	26.56	2.268	0.983	0.117	0.407	0.697	0.157
J6	四氢呋喃	-0.27	0.0196	0.180	36.72	8.291	0.989	0.0491	0.113	0.206	0.687
J7	异丙醇	-0.33	0.0340	0.380	25.77	3.243	0.992	0.0855	0.234	0.454	0.343

注: A_{min} 为最大促进生长点的效应; x_1 、 h_1 分别代表J型剂量-效应曲线单调递减部分的中位值和斜率; x_2 、 h_2 分别为单调递增部分的中位值和斜率; EC_{min} 为最大促进生长点的浓度; pEC_{50} 为半数效应浓度的负对数

由表 2 可见,用 Biphasic 函数计算的 7 种有机溶剂的效应拟合值与实验值之间的 R 均 >0.98 ,拟合统计性显著.由图 1 可见,7 种有机溶剂对发光菌的抑制毒性具有相似的变化规律.首先,均有一个效应等于零的零等价剂量(ZED).在浓度等于 ZED 时,有机溶剂对发光菌的发光强度没有影响;在浓度 $<ZED$ 时,发光强度先随有机溶剂浓度的增大逐渐增大,至最大值后又随浓度的增大而

逐渐减少,使发光抑制率随浓度的增大总体呈现不对称的 U 型负增长变化,说明这一浓度范围的有机溶剂,对发光菌的生长没有毒害作用,反而有促进(或刺激)作用;当浓度高于 ZED 后,发光菌的发光强度随有机溶剂浓度的增大而减小,说明此浓度范围内的有机溶剂对发光菌的生长有明显的毒害作用.整条剂量-效应曲线显示出低剂量刺激和高剂量抑制的 J 型,物质对发光菌的这种

低剂量刺激与高剂量抑制的作用称为“hormesis”^[14-15],即毒物兴奋效应,其产生的原因和可能对化学品风险评价产生的影响已引起科学家的高度重视^[16-17].有关有机溶剂的非单调J型剂量-效应关系目前尚未见报道,有关作用机制本课题组正在进行深入研究.

根据常用的EC₅₀值判断标准,7种有机溶剂对淡水发光菌青海弧菌Q67的抑制毒性顺序为:四氢呋喃>异丙醇>乙醚>丙酮>乙腈>乙醇>甲醇.

2.2 13种有机溶剂的S型剂量-效应曲线

实验表明,苯酚、二甲亚砆、乙酰丙酮、乙

酸乙酯、正丁醇、甲醛、吡啶、乙酸甲酯、乙二醇、水合肼、N,N-二甲基甲酰胺、1-甲基-2-吡咯烷酮和N,N-二甲基乙酰胺13种有机溶剂对发光菌毒性效应-浓度散点图均为S型.利用Logit(L)或Weibull(W)函数进行非线性拟合,得到各物质的拟合参数和模型方程.将所得参数代入各自反函数,可得各个效应浓度(表3).由表3可知,用Logit或Weibull函数拟合DRC时,对低效应区和高效应区浓度均可有效估计,由模型计算的13种有机溶剂的效应拟合值与实验值之间的R均>0.98,均方根误差(RMSE)均<0.06,拟合统计性显著.

表 3 13种有机溶剂对发光菌Q67的毒性效应
Table 3 Toxicities of 13 organic solvents to Q67

编号	有机溶剂	函数	α	β	R	RMSE	EC ₁ (mol/L)	EC ₁₀ (mol/L)	EC ₅₀ (mol/L)	pEC ₅₀
S1	苯酚	W	6.07	2.79	0.997	0.0293	1.50E-4	1.04E-3	4.93E-3	2.307
S2	二甲亚砆	W	-0.71	4.29	0.999	0.0167	1.24E-1	4.37E-1	1.20	-0.080
S3	乙酰丙酮	W	2.71	1.79	0.994	0.0401	8.24E-5	1.69E-3	1.91E-2	1.719
S4	乙酸乙酯	L	3.51	3.59	0.997	0.0207	5.61E-3	2.60E-2	1.06E-1	0.975
S5	正丁醇	W	2.39	1.80	0.993	0.0394	1.31E-4	2.64E-3	2.94E-2	1.531
S6	甲醛	L	8.23	2.79	0.986	0.0593	2.53E-5	1.83E-4	1.12E-3	2.950
S7	吡啶	W	2.75	1.98	0.998	0.0251	1.94E-4	2.98E-3	2.67E-2	1.574
S8	乙酸甲酯	W	1.10	2.46	0.994	0.0363	4.82E-2	4.35E-2	2.53E-1	0.596
S9	乙二醇	W	-1.32	4.20	0.992	0.0396	1.66E-1	6.00E-1	1.69	-0.227
S10	水合肼	L	7.83	4.33	0.994	0.0417	1.35E-3	4.83E-3	1.55E-2	1.808
S11	N,N-二甲基甲酰胺	W	1.47	2.09	0.999	0.0193	1.25E-3	1.66E-2	1.32E-1	0.879
S12	1-甲基-2-吡咯烷酮	W	2.14	2.37	0.998	0.0229	1.43E-3	1.40E-2	8.76E-2	1.058
S13	N,N-二甲基乙酰胺	W	1.60	1.89	0.998	0.0222	5.24E-4	9.18E-3	9.11E-2	1.040

注:EC₁、EC₁₀为产生效应分别为1%和10%时毒物的浓度;pEC₅₀为半数效应浓度的负对数

由13种溶剂对发光菌毒效应的拟合曲线可以看出(图2),有机溶剂性质不同,曲线的形状和斜率不同,因而EC₅₀值也不同,跨度达4个数量级.比较13个有机溶剂的EC₅₀值,可判断出它们对发光菌的毒性顺序为:甲醛>苯酚>水合肼>乙酰丙酮>吡啶>正丁醇>1-甲基-2-吡咯烷酮>N,N-二甲基乙酰胺>乙酸乙酯>N,N-二甲基甲酰胺>乙酸甲酯>二甲亚砆>乙二醇.

2.3 有机溶剂的结构与其毒性效应的关系

发光细菌的发光过程是一个非常复杂的生理过程.通常认为发光菌的发光反应是在荧光素酶的催化作用下,菌体中的还原型黄素单核苷酸

(FMNH₂)和分子氧及一长链醛发生氧化还原反应,生成黄素单核苷酸(FMN)、羧酸(RCOOH)和水,并伴随光的释放过程^[18].当发光细菌接触到有机溶剂时,可影响或干扰其正常新陈代谢,从而使细菌的发光强度增大或下降,因此能够显示有机溶剂对生物体的毒性作用,这种影响除与有机溶剂的量有关外,还与其自身的结构或性质有关.

实验表明,同为醇类溶剂,对发光菌的毒性顺序:正丁醇>异丙醇>乙醇>乙二醇>甲醇,即含碳数越多、碳链越长,毒性越大.同样的规律存在于N,N-二甲基乙酰胺>N,N-二甲基甲酰胺,乙酸乙酯>乙酸甲酯;当碳链长度相同时,毒性顺序为乙

醚>乙腈>乙醇;对于环状结构的溶剂,毒性顺序为苯酚>吡啶>四氢呋喃,即环上碳数越多,毒性越大,具有相似结构的丙酮>二甲亚砜.可见,结构与毒性之间存在密切关系.

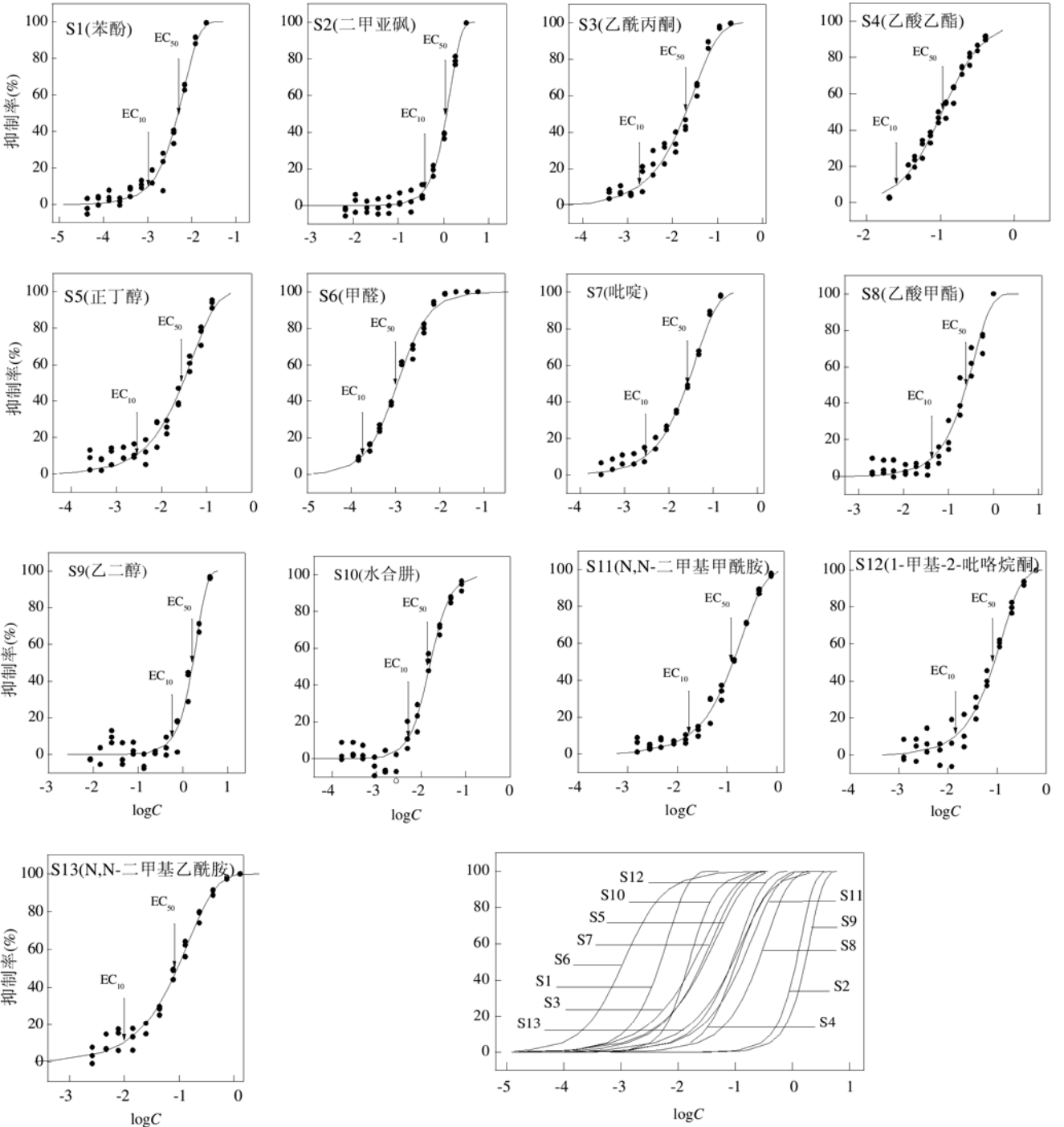


图 2 13种有机溶剂对发光菌Q67的剂量-效应关系

Fig.2 Dose-response curves of 13 organic solvents to the Q67 toxicity

— W/L模型拟合值 ● 试验值

在发光菌体内,化合物的毒性作用是通过毒物分子活性中心与发光菌中萤光素酶这一靶分子相互作用而产生的.20种有机溶剂中,甲醇、乙醇、异丙醇、乙腈、苯酚、正丁醇、乙二醇均为

亲核试剂,具有负电性,是氢键的接受体,而四氢呋喃、吡啶、甲醛、水合肼、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺均为亲电试剂,具有正电性,是氢键的给予体,无论是氢键的给予体还是氢键的接受体,均能与发光菌体细胞内的黄素单核苷酸发生氢键键合,从而阻碍了氢对菌体细胞的传递,进而抑制发光菌的发光.丙酮、乙酰丙酮为双极性分子,能够改变发光菌体细胞膜的磷脂结构从而增强细胞膜的渗透性;乙醚为急性麻醉型化合物,能够蓄积于发光菌体细胞膜上.渗透性的加强和蓄积达到一定程度时将对菌体细胞产生抑制作用,如抑制氧的运输,进而抑制发光菌的发光.二甲亚砒主要抑制菌体细胞内核酸、蛋白质的合成,进而抑制发光菌的发光.乙腈、甲醇、乙醇、丙酮、乙醚、四氢呋喃和异丙醇7种有机溶剂与发光菌的作用机制还与其浓度有关,当发光体系中存在少量这些有机溶剂时,增强了菌体细胞细胞膜的渗透性,有机溶剂渗入细胞膜的同时也带入了氧,导致体系的发光强度增大.

3 结论

3.1 乙腈、甲醇、乙醇、丙酮、乙醚、四氢呋喃和异丙醇7种有机溶剂对发光菌Q67的发光抑制毒性效应具有非单调的J型剂量-效应关系,即均具有低剂量刺激高剂量抑制作用.按 EC_{50} 作为毒性强弱判别标准,其抑制毒性顺序:四氢呋喃>异丙醇>乙醚>丙酮>乙腈>乙醇>甲醇.

3.2 苯酚、二甲亚砒、乙酰丙酮、乙酸乙酯、正丁醇、甲醛、吡啶、乙酸甲酯、乙二醇、水合肼、N,N-二甲基甲酰胺、1-甲基-2-吡咯烷酮和N,N-二甲基乙酰胺13种有机溶剂对发光菌的发光抑制毒性效应具有典型的S型剂量-效应关系.按 EC_{50} 毒性标准的毒性顺序:甲醛>苯酚>水合肼>乙酰丙酮>吡啶>正丁醇>1-甲基-2-吡咯烷酮>N,N-二甲基乙酰胺>乙酸乙酯>N,N-二甲基甲酰胺>乙酸甲酯>二甲亚砒>乙二醇.

3.3 有机溶剂分子结构与其对发光菌的毒性有密切关系,碳链越长毒性越大;环上碳数越多毒性越大;碳链长度相同时乙醚>乙腈>乙醇.

参考文献:

- [1] 周文敏,傅德黔,孙宗光.水中优先控制污染物黑名单 [J]. 中国环境监测,1990,6(4):1-3.
- [2] 马梅,童中华,王子健,等.新型淡水发光菌(*Vibrio qinghaiensis* sp.-Q67)应用于环境样品毒性测试的初步研究 [J]. 环境科学学报, 1998,18(1):86-91.
- [3] GB/T15441-1995,水质急性毒性的测定——发光细菌法 [S].
- [4] 朱文杰,王杰,陈晓耘,等.发光细菌一新种—青海弧菌 [J]. 海洋与湖泽,1994,2:273-280.
- [5] 刘清,马梅,童中华,等.Cu、Zn、Cd、Hg对青海弧菌(Q67菌株)联合毒性作用的研究 [J]. 中国环境科学,1997,17(4):301-303.
- [6] 廖宜勇,张文华,何艺宾,等.三嗪类化合物溶解度参数及毒性-构效关系 [J]. 应用化学,1996,13(1):34-37.
- [7] 袁星,朗佩珍,洪晖,等.应用发光菌测定有机化合物的毒性 [J]. 环境化学,1994,13(3):253-256.
- [8] 刘保奇,葛会林,刘树深.测定环境污染物对青海弧菌发光强度抑制的微板发光法研究 [J]. 生态毒理学报,2006,1(2):186-191.
- [9] 莫凌云,刘海玲,刘树深,等.5种取代酚化合物对淡水发光菌的联合毒性 [J]. 生态毒理学报,2006,1(3):259-264.
- [10] 葛会林,刘树深,刘芳.多组分苯胺类混合物对发光菌的抑制毒性 [J]. 生态毒理学报,2006,1(4):296-303.
- [11] Faust M, Altenburger R, Backhaus T, *et al.* Predicting the joint algal toxicity of multi-component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants [J]. Aquatic Toxicology, 2001,56:13-32.
- [12] Faust M, Altenburger R, Blanck H, *et al.* Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action [J]. Aquatic Toxicology, 2003,63:43-63.
- [13] 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.
- [14] 王东红,彭安,王子健.有毒物质低剂量刺激作用的研究进展 [J]. 安全与环境学报,2004,4(1):18-21.
- [15] Stebbing A R D. Tolerance and hormesis-increased resistance to copper in hydroids linked to hormesis [J]. Marine Environmental Research, 2002,54:805-809.
- [16] Gaylor D W, Lutz W K, Conolly R B. Statistical analysis of nonmonotonic dose-response relationships: research design and analysis of nasal cell proliferation in rats exposed to formaldehyde [J]. Toxicological Sciences, 2004,77:158-164.
- [17] Thayer K A, Melnick R, Burns K, *et al.* Fundamental flaws of hormesis for public health decisions [J]. Environmental Health Perspectives, 2005,113:1271-1276.
- [18] 顾宗渊.发光细菌法检测水土环境毒性的进展和评价 [J]. 环境科学与技术,1987,2:2-4.

作者简介: 刘树深(1961-),男,湖南新化人,教授,博士,主要从事化学计量学及其在环境科学中应用研究.发表论文 70 余篇.