

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202101028



费氏弧菌检测土壤联合毒性模型分析

江伟^{1,2}, 肖昕², 王昆², 吴晋芝², 张良², 陆方筱²

(1. 华侨大学 福建省生物化工技术重点实验室, 福建 厦门 361021;

2. 华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 在获得费氏弧菌(*Vibrio fischeri*)相对发光强度与重金属离子浓度关系的基础上,采用响应面分析法建立相对发光强度与土壤联合毒性的数学模型.同时,对五处正在从事生产的工厂土壤进行采样检测验证模型的可行性.结果表明:通过建立的模型成功得出五处采样地点的土壤状况.其中,五处采样点中浅层土生物毒性均大于深层土,同一工厂排污口和生产车间之间土壤生物毒性差异较小;各采样点土样中的离子联合毒性均位于模型中的Ⅱ级毒性区间,相当于重金属离子含量为 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.说明,该模型可用于初步判断土壤生物毒性.

关键词: 土壤污染; 费氏弧菌; 重金属离子; 毒性检测; 模型分析; 响应面分析法

中图分类号: X 530.2

文献标志码: A

文章编号: 1000-5013(2021)06-0809-08

Combined Toxicity Model Analysis of Soil Detection With *Vibrio fischeri*

JIANG Wei^{1,2}, XIAO Xin², WANG Kun²,
WU Jinzhi², ZHANG Liang², LU Fangxiao²

(1. Fujian Provincial Key Laboratory of Biochemical Technology, Huaqiao University, Xiamen 361021, China;

2. College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

Abstract: Based on the relationship between the relative luminous intensity of *Vibrio fischeri* and the concentration of heavy metal ions, a response surface analysis method was used to establish a mathematical model between the relative luminous intensity and the soil combined toxicity, and the feasibility of the model was verified by sampling and testing of the soil from five factories that were engaged in production. The result shows that the soil conditions at five sampling sites are successfully obtained through the model. The biological toxicity of top soil is greater than that of deep soil, and the difference between the sewage outlet and the production workshop of the same factory is small. The combined toxicity of the ions in the soil samples at each sampling point is located in Grade II toxicity interval in the model, which is equivalent to a heavy metal ion content of $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. This means the model can be used for the preliminary judgment of soil biological toxicity.

Keywords: soil pollution; *Vibrio fischeri*; heavy metal ions; toxicity detection; model analysis; response surface analysis

被污染土壤中的重金属离子往往表现出化学污染物的联合毒性,即几种污染物会同时存在于现实环境中,暴露在其中的生物机体会受其影响而产生完全不同于单一化学污染物的生物学效应.这类两种

收稿日期: 2021-01-20

通信作者: 江伟(1987-),男,副教授,博士,主要从事合成生物学与生物信息学、生物催化与生物转化,以及应用酶学与定向进化的研究. E-mail: wjiang@hqu.edu.cn.

基金项目: 福建省泉州市科技计划项目(2018C008); 华侨大学高层次人才科研启动项目(600005-Z17Y0072)

或两种以上的化学污染物共同作用而产生的综合毒性作用,称为化学污染物的联合毒性作用^[1-2].

发光细菌是一类在正常的生理条件下能够发射可见荧光的细菌,荧光波长在 420~660 nm 之间^[3]. 常见的菌属有异短杆菌属、发光杆菌属、希瓦氏菌属和弧菌属等^[4]. 朱丽娜^[5]等指出发光细菌毒性试验具有检测方法简单、对有毒物质反应灵敏、检测周期短、具有同高等动物相类似的理化特性(如呼吸作用,ATP 水平变化,酶活性变化等),能在短时间内得到准确的毒性数据等优点. 发光细菌中的费氏弧菌(*Vibrio fischeri*)属弧菌属,曾用来检测污水中的毒性物质^[6]并作为一种单一重金属离子毒性的表征试剂^[7]. 同时,费氏弧菌拥有培养成本低、繁殖周期短,耐受性强等优点,是探究联合毒性检测的理想材料. 本文通过费氏弧菌相对发光强度与重金属离子的综合含量的关系,建立一个对土壤重金属综合含量进行定量分析的数学模型.

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

主要仪器有 AOL-1 型全光谱超微弱光检测器、摇床等. 主要试剂有氯化钠、硫酸锌、硫酸铜、硫酸亚铁、氯化铅、乙酸铬、乙酸镍. 五处采样地点的土壤样品. 费氏弧菌冻干粉购自浙江托科司生物科技有限责任公司.

1.2 菌种的复苏及菌液的制备

取一份费氏弧菌冻干粉和一只复苏液,置于室温下平衡 15 min. 将 2 mL 复苏液注入冻干粉试剂瓶中,静置 10 min. 复苏完成后将费氏弧菌以 1:4 的比例用 2% 的氯化钠溶液进行稀释,得菌稀释液.

1.3 单因素实验

分别配制浓度为 0.3 mg·L⁻¹ 的硫酸锌、硫酸铜、硫酸亚铁、氯化铅、乙酸铬、乙酸镍溶液作为单因素实验的待测液. 将菌稀释液以 1:90 的比例与待测液混合,反应时间为 15 min. 采用 AOL-1 型全光谱超微弱光检测器对混合后的样品进行检测,记录费氏弧菌在不同种类重金属离子中的发光强度.

在单因素实验中设置空白组,将费氏弧菌稀释液与 2% 氯化钠溶液以 1:90 的比例混合 15 min 后检测其发光强度,并计算相对发光强度(相对发光强度=样品发光强度/空白发光强度).

1.4 响应面实验

计算单因素实验中每种重金属离子的相对发光强度. 为确保模型的上限毒性足够大,选择毒性较大的 3 种重金属离子作为响应面实验的 3 个因素. 参考赵莉等^[8]的研究,设置水平分别为 0.10,0.20,0.30 mg·L⁻¹ Pb²⁺; 0.10,0.45,0.80 mg·L⁻¹ Ni²⁺; 0.10,0.35,0.60 mg·L⁻¹ Cu²⁺, 使用 Design-Expert 8.0 软件进行响应面结果分析.

1.5 样品土壤的采集和预处理

本研究选取五处土壤样品采集点,布置如表 1 所示. 每一个采样点采集 4 份土样,分别采集距地表 20 cm 处深层土和地表浅层土,取样点分布在排污口和车间两处,采用随机取样的方法进行取样.

采集到土样后,剔除土壤中砂砾、石块、木棒、杂草、植物残根、昆虫尸体、石块,以及新生体锰结核和石灰结核等杂物,然后将土壤平铺在垫衬有干净白纸的晾晒板或木板上自然风干(严禁暴晒). 当样品达到半干状态时,将大块土打碎,以免结成硬块,并在风干过程中,随时拣掉石砾、动植物残体. 风干室保持干燥通风,风干温度为 30~35 ℃,风干时间为 3~7 d. 将风干土用研磨棒磨碎,首先需将其过孔径为 2 mm 尼龙筛,再进一步用研钵反复研磨,过筛 3~4 遍,直至仅有少量沙粒方可停止,最后再过 100 目细筛.

1.6 土壤样品的制备

称取过筛后的土样,以土壤:水=1:5 的比例配成土壤悬浊液,摇床震荡 8 h,静置 16 h 后取得上清液;然后,用 20 μm 超滤膜进行过滤,将滤液以转速 5 000~9 000 r·min⁻¹,时间为 3 min 进行离心,

表 1 土壤样品采集点

Tab. 1 Soil sample collection point

取样地	企业	采样点布置
1	厦门二化化工有限公司	排污口,车间
2	厦门同恒金属有限公司	排污口,车间
3	厦门富士电气化学有限公司	排污口,车间
4	宏凯泡沫塑料包装厂	排污口,车间
5	闽粤涂料工业公司	排污口,车间

得到无色透明的溶液即为待测土壤样品.

1.7 土壤样品的检测

将菌稀释液以 1 : 90 的比例与待测样品混合,同时设立空白组. 此空白组与单因素实验中的空白组相同.

2 实验结果与分析

2.1 单因素实验结果

在单因素实验中, 计算可得硫酸铜、硫酸亚铁、氯化铅、乙酸铬和乙酸镍的相对发光强度(I_{re})分别为 17.12%, 22.51%, 12.52%, 19.29% 和 12.10%. 相对发光强度最低的前 3 种金属离子分别为 Ni^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , 故将它们作为响应面分析的 3 因素.

2.2 响应面实验分析

响应面试验因素及水平设计, 如表 2 所示. 使用 Design-Expert 8.0 软件进行响应面结果分析, 如表 3 所示. 表 3 中: I 为发光强度. Box-Behnken 试验设计结果方差分析, 如表 4 所示. 表 4 中: “*”表示 $P < 0.05$, 具有统计学意义; “**”表示 $P < 0.01$, 极具统计学意义; “—”表示 $P > 0.05$, 不具有统计学意义. 由表 4 可知: 模型的 $F = 10.98$, 说明该模型显著; 失拟项 $P = 0.238\ 9 > 0.05$, 即不显著, 表明该模型在零水平处拟合较好, 模型选择正确.

表 2 响应面试验因素及水平

Tab. 2 Factors and levels of response surface test

因素	水平		
	1	2	3
A(Pb^{2+})/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0.1	0.20	0.3
B(Cu^{2+})/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0.1	0.35	0.6
C(Ni^{2+})/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0.1	0.45	0.8

表 3 响应面实验设计及结果

Tab. 3 Design and results of response surface experiment

Std.	Run.	A(Pb^{2+})/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	B(Cu^{2+})/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	C(Ni^{2+})/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	I	Std.	Run.	A(Pb^{2+})/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	B(Cu^{2+})/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	C(Ni^{2+})/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	I
1	1	0.1	0.10	0.45	802.993	2	10	0.3	0.10	0.45	965.184
14	2	0.2	0.35	0.45	476.508	7	11	0.1	0.35	0.80	621.484
15	3	0.2	0.35	0.45	429.820	12	12	0.2	0.60	0.80	450.375
4	4	0.3	0.60	0.45	688.894	3	13	0.1	0.60	0.45	691.816
11	5	0.2	0.10	0.80	643.415	6	14	0.3	0.35	0.10	498.972
5	6	0.1	0.35	0.10	735.757	9	15	0.2	0.10	0.10	623.420
10	7	0.2	0.60	0.10	434.459	16	16	0.2	0.35	0.45	518.634
17	8	0.2	0.35	0.45	499.378	8	17	0.3	0.35	0.80	686.061
13	9	0.2	0.35	0.45	554.424						

表 4 Box-Behnken 试验设计结果方差分析

Tab. 4 Variance analysis of Box-Behnken test results

因素	平方和	自由度	均方	F	Prob> F	显著性
模型	3.192×10^5	9	35 465.16	10.98	0.002 3	**
A	20.93	1	20.93	6.480×10^{-3}	0.938 1	—
B	74 010.13	1	74 010.13	22.92	0.002 0	**
C	1 477.70	1	1 477.70	0.46	0.520 5	—
AB	6 815.58	1	6 815.58	2.11	0.189 6	—
AC	22 704.76	1	22 704.76	7.03	0.032 9	*
BC	4.16	1	4.16	1.288×10^{-3}	0.972 4	—
A ²	1.594×10^5	1	1.594×10^5	49.36	0.000 2	**
B ²	39 542.42	1	39 542.42	12.24	0.010 0	*
C ²	12 618.73	1	12 618.73	3.91	0.088 6	—
残差	22 605.10	7	3 229.30			
失拟项	13 908.61	3	4 636.20	2.13	0.238 9	—
纯误差	8 696.50	4	2 174.12			
总变异	3.418×10^5	16				

各金属离子浓度交互作用对发光强度(I)影响的曲面图和等高线图,如图 1 所示.

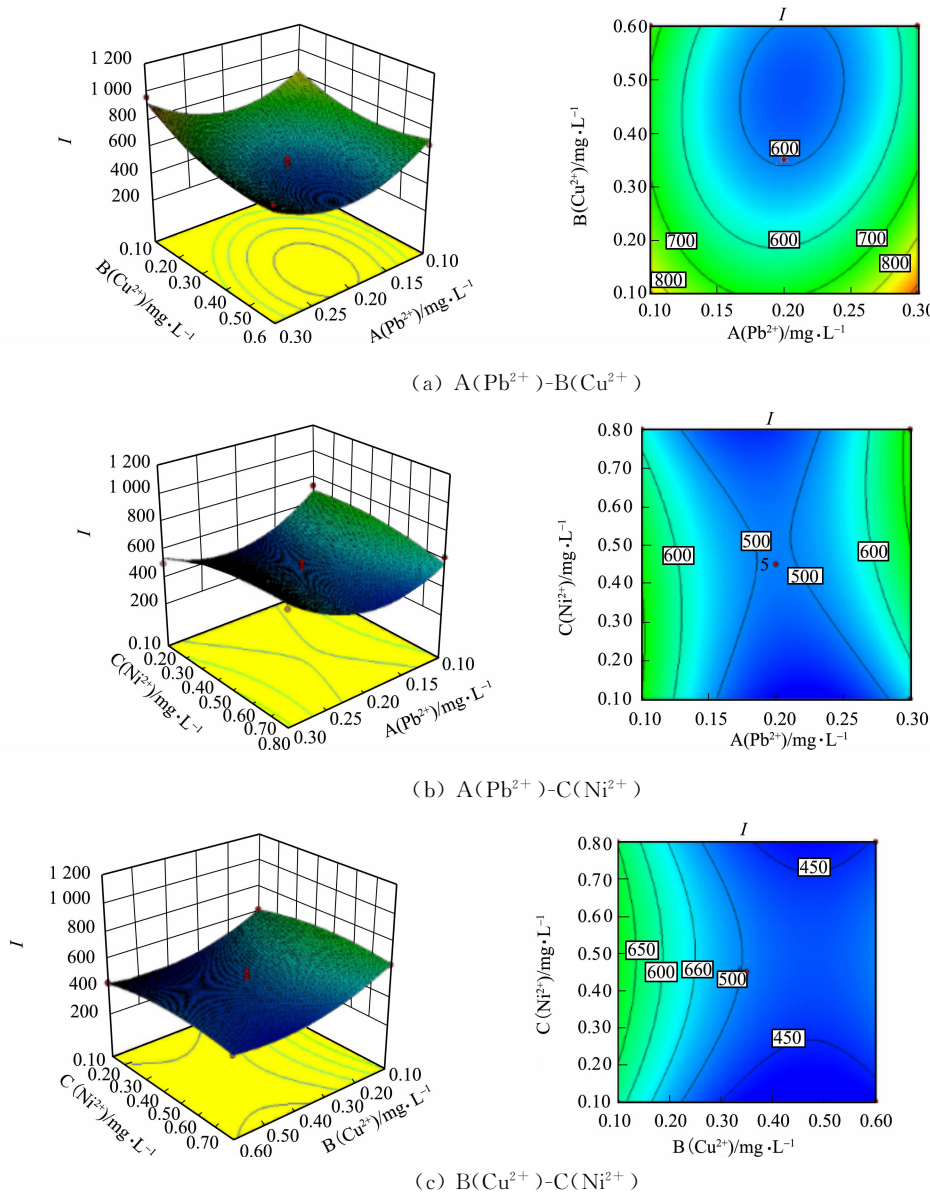


图 1 各金属离子浓度交互作用对发光强度影响的曲面图和等高线图

Fig. 1 Surface and contour maps of effects of metal ion concentration interaction on luminous intensity
运用构建好的二阶经验模型来进行分析. 对试验模型进行二阶回归拟合,得到回归方程为

$$I=495.75-1.62A-96.18B+13.59C-41.28AB+75.34AC-1.02BC+194.56A^2+96.91B^2-54.74C^2.$$

上式中: A,B,C 分别代表 $Pb^{2+}, Cu^{2+}, Ni^{2+}$, 其中 C 的系数最大,表明 Ni^{2+} 的浓度对费氏弧菌的发光强度的影响最显著. 这可能是由于 Ni^{2+} 的浓度梯度范围过大所导致,但本研究并未进行深入探讨. 因素对费氏弧菌发光强度影响的主次顺序依次为 $Ni^{2+}, Pb^{2+}, Cu^{2+}$. 当 Ni^{2+} 浓度不变时,可以看出费氏弧菌的发光强度随着 Cu^{2+} 浓度的上升先减小后变大, BC 交互项($P>0.05$)对发光强度的影响并不显著.

在最优条件下,各因素及响应值的取值如图 2 所示. 从图 2 可知:当理论上的浓度值 $Pb^{2+}=0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}, Cu^{2+}=0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}, Ni^{2+}=0.737\ 602\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,发光强度可以达到最大值 960.015 .

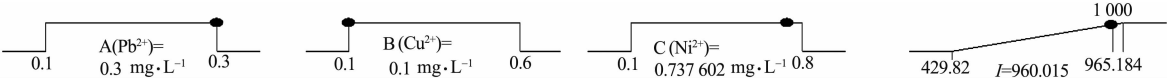


图 2 各因素及响应值在最优条件下的取值

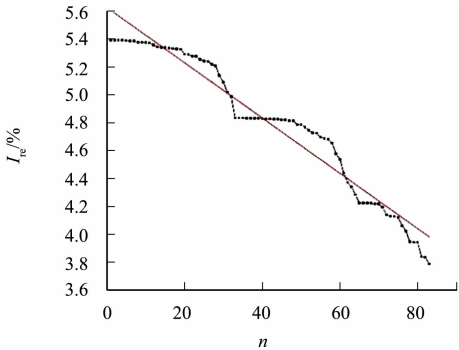
Fig. 2 Values of various factors and response values under optimal conditions

2.3 联合毒性模型的构建

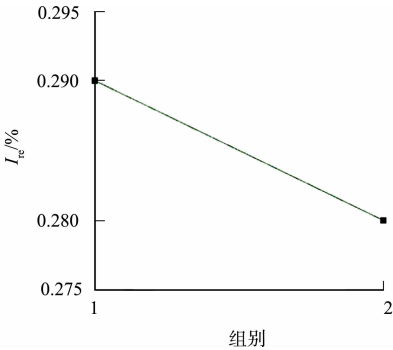
利用响应面分析,拟合出不同离子配比下相对发光强度由强到弱的线性关系模型;然后,将此线性模型中离子综合浓度等比例放大和缩小,结果如表 5,图 3 所示. 图 3 中: I_{re} 为相对发光强度; n 为浓缩倍数. 从表 5,图 3 可知:不同倍数下,斜率相同,线性关系仍然成立,即在浓度条件改变下,配比不变,相对发光强度差值不变.但是在同一配比下,离子综合浓度不同,相对发光强度不同.

表 5 不同稀释倍数下三元混合体系线性回归方程

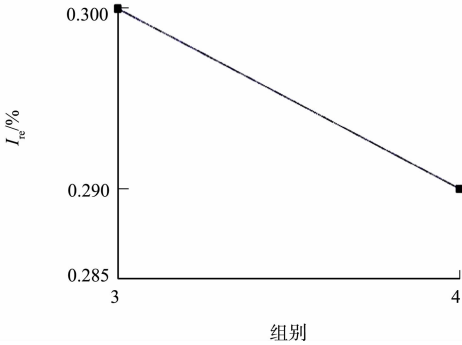
混合体系组成	线性回归方程
$Pb^{2+} : Cu^{2+} : Ni^{2+} = 0.10 : 0.03 : 0.246$	$y = -1x + 3$
$Pb^{2+} : Cu^{2+} : Ni^{2+} = 0.10 : 0.20 : 0.195$	
$Pb^{2+} : Cu^{2+} : Ni^{2+} = 0.15 : 0.05 : 0.369$	$y = -1x + 5$
$Pb^{2+} : Cu^{2+} : Ni^{2+} = 0.15 : 0.30 : 0.293$	
$Pb^{2+} : Cu^{2+} : Ni^{2+} = 3 : 1 : 7.38$	$y = 1x - 4$
$Pb^{2+} : Cu^{2+} : Ni^{2+} = 3 : 6 : 5.86$	



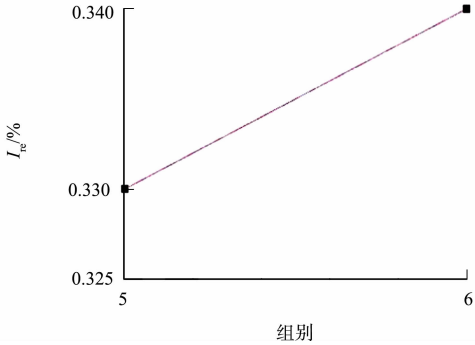
(a) 响应面模拟



(b) 各离子浓度均缩小 2 倍



(c) 各离子浓度均缩小 1 倍



(d) 各离子浓度均放大 10 倍

图 3 不同离子配比下相对发光强度由强到弱的线性关系模型

Fig. 3 Linear relationship model of relative luminous intensity from strong to weak under different ion ratios

在此基础上,将离子配比固定,改变离子综合浓度,得到相对发光强度数值后,再次构建联合毒性模型,如图 4 所示. 图 4 中: I_{re} 为相对发光强度; ξ 为毒性系数. 首先定义毒性系数,将 $Pb^{2+} : Cu^{2+} : Ni^{2+}$ 的浓度比例为 $0.20 : 0.35 : 0.45$ 时,定义毒性系数为 1. 即放大 10 倍,毒性系数就是 10,放大 0.3 倍,毒性系数就是 0.3,放大 0.5 倍,毒性系数就是 0.5,以此类推. 其次,进行毒性区间的划分,即 I 级、II 级、III 级的毒性区间分别表示土壤的综合毒性相当于重金属离子含量分别为 $0.01, 10, 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

2.5 模型在土壤检测中的应用

在对土壤检测的应用中,本实验分别采集了上述 5 个企业的深层和表层的土壤进行检测,结果如表 6 所示. 表 6 中: I_{re} 为相对发光强度;取样地靠近排污口为“样一”,靠近车间为“样二”.

同一工厂不同采样点相对发光强度标准差(SD)对比,如图 5 所示. 深层层土与表层层土的相对发

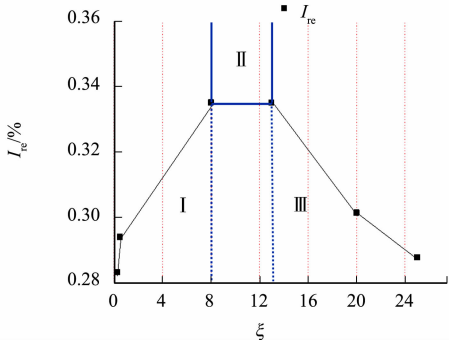


图 4 联合毒性模型

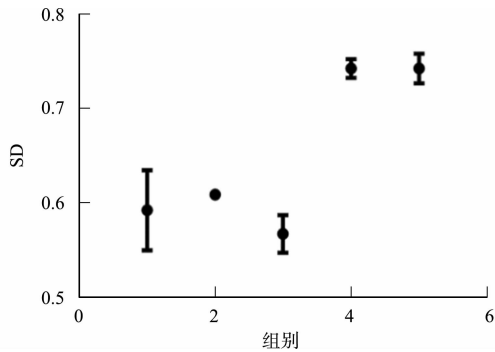
Fig. 4 Combined toxicity model

光强度(I_{re})对比,结果如图 6 所示.

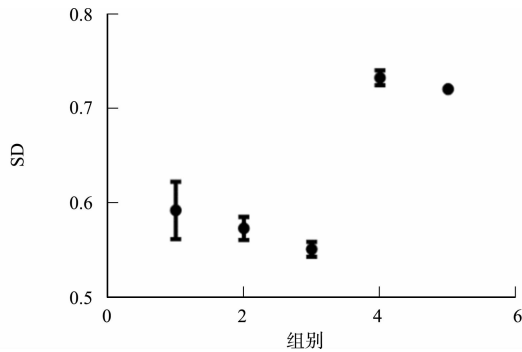
表 6 五个取样地点深层与表层土上清液对应相对发光强度

Tab. 6 Corresponding relative luminous intensity of deep and topsoil supernatants at five sampling sites

编号	名称	$I_{re}/\%$	名称	$I_{re}/\%$
1	取样地 1 深层样一	0.622	取样地 1 表层样一	0.613
	取样地 1 深层样二	0.562	取样地 1 表层样二	0.570
2	取样地 5 深层样一	0.607	取样地 5 表层样一	0.564
	取样地 5 深层样二	0.610	取样地 5 表层样二	0.581
3	取样地 2 深层样一	0.581	取样地 2 表层样一	0.556
	取样地 2 深层样二	0.553	取样地 2 表层样二	0.545
4	取样地 4 深层样一	0.735	取样地 4 表层样一	0.726
	取样地 4 深层样二	0.749	取样地 4 表层样二	0.737
5	取样地 3 深层样一	0.753	取样地 3 表层样一	0.717
	取样地 3 深层样二	0.731	取样地 3 表层样二	0.722



(a) 深层样一,深层样二



(b) 表层样一,表层样二

图 5 同一工厂不同采样点相对发光强度标准差对比

Fig. 5 Comparison of relative luminous intensity standard deviation of different sampling points in same factory

从图 5 可知:同一工厂“深层样一,深层样二”和“表层样一,表层样二”的相对发光强度有着相同的变化趋势,其中二化工厂排污口和车间的土壤污染程度存较其他工厂存在较为明显的差异.从图 6 可知:深层土的生物毒性比表层土的要弱,即深层土壤的污染程度略低于表层土壤的污染程度.此外,所有土样毒性区间都在 II 区,土壤的生物毒性相当于重金属离子含量 $10^1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 等级,生物毒性较小.

3 讨论

本研究采用响应面分析法得出费氏弧菌相对发光强度与重金属离子的综合含量的关系,将不同重金属的含量范围定义为不同的毒性区间,从而建立了一个可以对土壤重金属综合含量进行定量的数学模型.单因素实验中所得出的离子毒性从大到小排序为 $\text{Ni}^{2+}>\text{Pb}^{2+}>\text{Cu}^{2+}>\text{Cr}^{6+}>\text{Fe}^{2+}$,这与赵莉等^[8]、杨虹^[7]研究中 Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{6+} 的毒性大小排序相符合.同时,本实验增加检测了镍、铬的毒性,而镍是合金、陶瓷染料等生活中常见的物品配方.此外,近年来推广的混合动力汽车多数使用的是镍氢动力电池^[9],报废的镍氢电池造成的城市污染也是不容小觑的.铬则一直作为合金生产等工业生产的重要元素,因此,铬渣带来的污染也同样值得关注.

不同放大倍数下费氏弧菌毒性的变化趋势,如图 7 所示.图 7 中: I_{re} 为相对发光强度; ξ 为毒性系数.从图 7 可知:费氏弧菌的相对发光强度在不同浓度重金属离子的作用下,存在“低浓度促进,高浓度抑制”的现象,即毒物兴奋效应(hormesis).此效应广泛存在于各类发光细菌检测中.它是指某种毒物在高浓度时对生物体产生负面作用,但在低浓度时对生物体却产生正面作用^[10].Shen 等^[11]研究了 Cu^{2+} ,

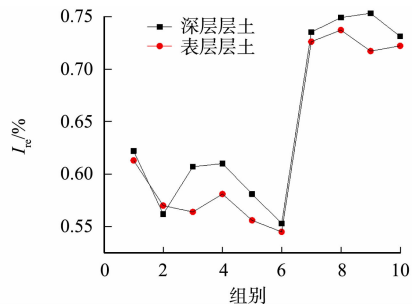


图 6 深层层与表层土相对发光强度对比

Fig. 6 Comparison of relative luminous intensity between deep and topsoil

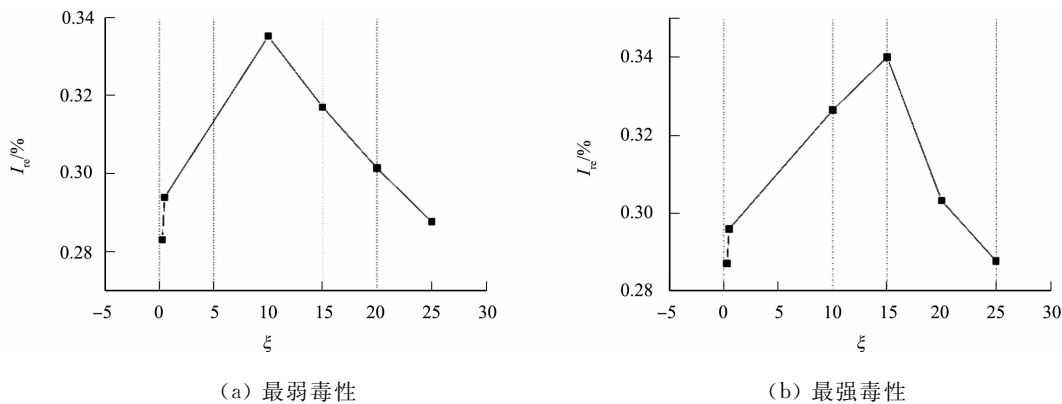


图 7 不同放大倍数下费氏弧菌毒性的变化趋势
Fig. 7 Toxicity trend of *Vibrio fischeri* under different magnifications

Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cr^{6+} 作为单一毒物对青海弧菌的影响, 也发现了上述效应, 并且还发现这种效应不随接触时间的改变而改变. 此现象出现的可能原因是, 发光细菌的发光反应是一种氧化反应, 它会产生一种氧化产物黄素单核苷酸(FMN)^[12]. 研究表明, FMN 能够结合烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)提供的 H^{+} 而被还原重新生成 FMNH_2 ^[13], 从而使得发光能够连续进行.

通过研究盐酸四环素对费氏弧菌发光的影响, 汤森等^[14]发现低浓度的盐酸四环素会促进发光的原因在于, 盐酸四环素相较于 NADH 更能提供所需的质子. 一般情况下, 重金属离子在水溶液中会存在一种水解反应, 且浓度越低越能促进水解反应的发生. 水解反应会使得溶液中存在一定量的 H^{+} , 这一一定量的 H^{+} 可能促使 FMN 重新还原为 FMNH_2 . 这种效应的存在会产生一个相对发光强度最大值, 在本实验的模型中将它称之为“拐点”. 方便起见, 将 $\text{Pb}^{2+} : \text{Cu}^{2+} : \text{Ni}^{2+}$ 浓度比例为 0.20 : 0.35 : 0.45 时的模型作为初步模型.

由于拐点的存在, 本实验的模型在应用时可以借助其他数据来细化区间. 根据赵莉等^[8]的研究, 汞离子对于费氏弧菌的毒性较强, 不存在拐点. 因此, 当待测样品的相对发光强度可同时对应Ⅰ级毒性区间和Ⅲ级毒性区间, 将该样品的相对发光强度带入汞离子与费氏弧菌相对发光强度进行对比. 若该发光强度与汞离子浓度的对应值在 $0.09 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上, 则认为毒性在Ⅲ级毒性区间; 否则, 在Ⅰ级毒性区间. 此处, 将 $0.09 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为判断Ⅰ和Ⅲ区间的原因是, 正如杨虹^[7]所述, 发光细菌的相对发光强度随汞离子浓度的增加而逐渐减弱, 当汞离子浓度大于等于 0.09 时, 相对发光强度趋近于 0, 此浓度范围以上已经超过了生物法检测的范围, 生物已经失活. 在本文的模型中, 金属离子综合浓度在 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围时, 发光细菌尚未失活, 但发光强度在逐渐减弱. 因此, 将 $0.09 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为判断离子浓度在Ⅰ还是Ⅲ区间的标准.

此外, 毒性区间Ⅱ区的这个“拐点”, 在理论上是难以通过实验的方法找出的, 这与菌种对生物毒性的敏感度有关; 再者, 对于并非单因素水平实验, 联合毒性受限于实验菌种的生物敏感性和各因素水平变化幅度的精确性, 在实验水平上只能无限逼近这个拐点而很难找到拐点的具体数值. 当然, “拐点”可以通过进行大量的实验缩小, 得到更为精确的区间范围.

在现行的国家标准 GB/T 15441—1995《水质急性毒性的测定发光细菌法》中, 所用发光细菌为明亮杆菌, 所测发光值对应的 Hg^{2+} 浓度为土壤污染标准. 相比费氏弧菌而言, 明亮杆菌较喜低温环境, 发光最适温度在 $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ^[15]; 而费氏弧菌的发光最适温度在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ^[16], 更加方便在室温条件下进行操作. 此外, 土壤的成分复杂, 其中可能包括多种金属氧化物或金属化合物, 它们之间往往存在着复杂的联合毒性作用^[17]. 本研究模型采用的是 Pb^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} 等 3 种重金属离子三因素三水平联合毒性, 相比于单因素或两因素单水平的毒性探究而言更加复杂, 也能够更好地模拟土壤重金属生物毒性的复杂性.

本研究通过费氏弧菌相对发光强度与重金属离子的综合含量的关系, 将不同重金属的含量范围定义为不同的毒性区间, 建立了一个可以对土壤重金属综合含量进行定量的数学模型. 此模型可以表示土壤中重金属离子的综合含量, 同时也能表征土壤中重金属离子的联合毒性, 可为后续的研究发展提供了新思路.

参考文献：

[1] 曾鸣,林志芬,尹大强,等. 混合污染物联合毒性研究进展[J]. 环境科学与技术,2009,32(2):80-86. DOI:10. 3969/j. issn. 1003-6504. 2009. 02. 021.

[2] 石昊,袁孟杰,孟一鸣,等. 铜、铬和敌敌畏对费氏弧菌的联合毒性效应研究[J]. 环境与发展,2019,31(3):105,107. DOI:10. 16647/j. cnki. cn15-1369/X. 2019. 03. 061.

[3] MA Xiaoyan,WANG Xiaochang C,NGO H H,*et al.* Bioassay based luminescent bacteria: Interferences, improvements, and applications[J]. Science of the Total Environment,2014,468/469:1-11. DOI:10. 1016/j. scitotenv. 2013. 08. 028.

[4] LEON M B,ALBRECHT J A. Comparison of adenosine triphosphate (ATP) bioluminescence and aerobic plate counts (APC) on plastic cutting boards[J]. Journal of Foodservice,2007,18(4):145-152. DOI:10. 1111/j. 1745-4506. 2007. 00060. x.

[5] 朱丽娜. 基于发光细菌法的水质综合毒性研究[D]. 北京:中央民族大学,2012. DOI:10. 7666/d. y2137416.

[6] ABBAS M,ADIL M,EHTISHAM-UL-HAQUE S,*et al.* *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review[J]. Science of the Total Environment,2018,626:1295-1309. DOI:10. 1016/j. scitotenv. 2018. 01. 066.

[7] 杨虹. 常见重金属对费氏弧菌的生物毒性研究[J]. 环境科学与管理,2015,40(10):140-142. DOI:10. 3969/j. issn. 1673-1212. 2015. 10. 033.

[8] 赵莉,杨虹,郭晶晶. 二元含汞重金属混合物对费氏弧菌的联合毒性研究[J]. 安全与环境学报,2015,15(1):297-300. DOI:10. 13637/j. issn. 1009-6094. 2015. 01. 062.

[9] 王雨潇,任慧平,皇甫益. 镍氢电池在电动汽车上的发展[J]. 包钢科技,2019,45(1):95-98. DOI:10. 13647/j. cnki. btgkj. 2019. 01. 024.

[10] CARELLI G,LAVICOLI I. Defining hormesis: The necessary tool to clarify experimentally the low dose-response relationship[J]. Human and Experimental Toxicology,2002,21(2):103-104,113-114. DOI:10. 1191/0960327102ht 219oa.

[11] SHEN Kaili,SHEN Chaofeng,LU Yuan,*et al.* Hormesis response of marine and freshwater luminescent bacteria to metal exposure[J]. Biological Research,2009,42(2):183-187. DOI:10. 4067/S0716-97602009000200006.

[12] JIAN Qijie,GONG Liang,LI Taotao,*et al.* Rapid assessment of the toxicity of fungal compounds using luminescent *Vibrio qinghaiensis* sp. Q67[J]. Toxins,2017,9(10):335. DOI:10. 3390/toxins9100335.

[13] ZOU Xiaoming,LIN Zhifen,DENG Ziqing,*et al.* Novel approach to predicting hormetic effects of antibiotic mixtures on *Vibrio fischeri*[J]. Chemosphere,2013,90(7):2070-2076. DOI:10. 1016/j. chemosphere. 2012. 09. 042.

[14] 汤淼,曾鸿鹄,王大力,等. 四环素对费氏弧菌产生生毒物兴奋效应(Hormesis)的时间关系和机制[J]. 环境化学,2015,34(11):1981-1987. DOI:10. 7524/j. issn. 0254-6108. 2015. 11. 2015051403.

[15] 蒋媛媛,孟芹,苏嘉缘,等. 明亮发光杆菌连续培养条件的优化[J]. 华东理工大学学报(自然科学版),2016,42(1):48-53,109. DOI:10. 14135/j. cnki. 1006-3080. 2016. 01. 008.

[16] 陈水松,王英才,胡文,等. 不同条件对 2 种发光菌毒性测试的影响研究[J]. 环境科学与技术,2013,36(增刊 2):1-5,36.

[17] BAVELLONI A,PIAZZI M,RAFFINI M,*et al.* Prohibitin 2: At a communications crossroads[J]. IUBMB Life,2015,67(4):239-254. DOI:10. 1002/iub. 1366.

(责任编辑：黄仲一 英文审校：刘源岗)