ICS 59.140.30
CCS Y 45

团 体 标 准

T/CLIAS 005—2022

皮革 环境安全评价试验 发光细菌法

Leather—Environmental safety assessment method—Luminescent bacteria test

2022-11-01 发布 2022-12-01 实施

中国皮革协会 发布

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。

本文件不涉及相关专利。

本文件由四川大学提出。

本文件由中国皮革协会归口。

本文件起草单位：四川大学、中国皮革制鞋研究院有限公司、四川亭江新材料股份有限公司、成都产品质量检验研究院有限责任公司。

本文件主要起草人：张文华、彭良琼、桑军、李靖、王睿。

本文件为首次发布。

皮革 环境安全评价试验 发光细菌法

1 范围

本文件规定了用发光细菌法检测皮革对环境影响的试验原理、试验方法。

本文件适用于用发光细菌法对皮革（坯革）进行环境影响的安全性检测。

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。

QB/T 2706 皮革 化学、物理、机械和色牢度试验 取样部位

QB/T 2707 皮革 物理和机械试验 试样的准备和调节

QB/T 2716 皮革 化学试验样品的准备

3 原理

本方法用蒸馏水萃取皮革样品，采用明亮发光杆菌测定萃取液的生物毒性。

将皮革样品剪碎，用蒸馏水在规定条件下萃取，萃取液过滤后调节pH，测试萃取液对明亮发光杆菌发光强度的影响，结果按相对发光强度或半数有效浓度（EC_{50}，以mg/L为单位）进行表征。

发光细菌相对发光强度与浸提液毒性组分总浓度呈显著负相关（$P \leq 0.05$）。

4 试剂和材料

警示：使用浓酸时，必须使用必要的人体防护设备。

4.1 一般说明：本文件中所用试剂，在没有注明其他要求时，均为分析纯试剂，水为蒸馏水。

4.2 氯化钠。

4.3 磷酸氢二钠。

4.4 磷酸氢二钾。

4.5 胰蛋白胨。

4.6 酵母浸粉。

4.7 明亮发光杆菌 T3 小种（photobacterium phosphoreum T3 spp.）冻干粉，冻干粉复苏后 30 min 内相对发光强度应该在 0.6～1.8 之间，吸光度（OD_{600}）大于 0.5。也可由实验室冻存的菌种，复苏培养获得新鲜菌液。

4.8 甘油。

4.9 氢氧化钠溶液，0.1 mol/L。

4.10 盐酸溶液，0.1 mol/L。

4.11 氯化钠溶液，30 g/L。

4.12 硫酸锌溶液，1.23 mg/L。

称取 0.2200 g 密封保存良好的七水合硫酸锌，放入 1000 mL 容量瓶，用氯化钠溶液（4.11）稀释至刻度，将该 123 mg/L 硫酸锌母液置于 2 ℃～5 ℃冰箱备用，保存期 3 个月。

移取硫酸锌母液1.0 mL，放入100 mL容量瓶，用氯化钠溶液（4.11）定容。硫酸锌稀释液保存期不超过24 h。

4.13 培养基制备。

分别称取 5.0 g 胰蛋白胨（4.5），5.0 g 酵母浸粉（4.6），5.0 g 磷酸氢二钠（4.3），1.0 g 磷酸氢二钾（4.4），30.0 g 氯化钠（4.2），3.0 g 甘油（4.8），放入 1000 mL 容量瓶中，加蒸馏水溶解，用盐酸溶液（4.10）调节 pH 为 6.5，定容至刻度。

5 仪器和设备

5.1 超净工作台。
5.2 压力蒸汽灭菌器，能够升温至 121 ℃，并保持 20 min。
5.3 pH 计，精度为 0.01。
5.4 恒温振荡器，能够保持温度（20±2）℃或者（25±2）℃，转速 100 r/min 或者 200 r/min。
5.5 生物毒性测试仪，配置 2 mL（直径 12 mm）、5 mL(直径 20 mm)测试管。
5.6 干燥箱，能够保持温度（45±2）℃。
5.7 恒温恒湿箱，温度（20±2）℃，湿度（65±5）%。
5.8 微量注射器，50 μL。
5.9 注射器，1 mL。
5.10 移液管，1 mL、2 mL、5 mL、10 mL。
5.11 锥形瓶及具塞锥形瓶，250 mL。
5.12 试剂瓶，100 mL。
5.13 量筒，50 mL、100 mL、500 mL。
5.14 容量瓶，50 mL、100 mL、1000 mL。
5.15 分析天平，精度为 0.1 mg。
5.16 快速定性滤纸。
5.17 快速混匀器。
5.18 紫外分光光度计。

6 样品与发光细菌液准备

6.1 样品制备和萃取

6.1.1 取样

取样应按照QB/T 2706中给出的标准程序进行取样。非标准部位取样，应在试验报告中详细说明。

6.1.2 样品调节

按QB/T 2716将皮革样品剪碎，按QB/T 2707调节试样。

6.1.3 萃取

使用分析天平（5.15）准确称取3.0 g样品（6.1.2），置于250 mL具塞锥形瓶（5.11），加入60 mL蒸馏水，置于恒温振荡器（5.4）中，在温度(25±2)℃、转速100 r/min下振动24 h±5 min。用滤纸（5.16）过滤萃取液。

6.1.4 萃取液预处理

根据样品萃取液体积，加氯化钠固体至3 g/100 mL浓度。pH计（5.3）测定萃取液pH，用氢氧化钠溶液（4.9）或盐酸溶液（4.10）调节pH为7.0±0.1。

毒性测定应在萃取后6 h内进行，否则应在2 ℃～5 ℃下保存样品，但不得超过24 h。

6.2 发光细菌液准备

6.2.1 冻干粉复苏液

取明亮发光杆菌冻干粉一瓶（0.5 g～1.0 g），加入2 mL～5 mL氯化钠溶液（4.11），在20 ℃～25 ℃复苏15 min。

6.2.2 新鲜菌液

培养新鲜菌液的所有操作应在超净工作台中进行。

——培养基分装灭菌：培养基（4.13）按每瓶100 mL分装在6个250 mL锥形瓶（5.11）中，加棉塞，用牛皮纸捆扎，在压力蒸汽灭菌器（5.2）中121 ℃灭菌20 min，置于超净工作台（5.1）备用。同时根据需要，准备足够数量的移液管等实验器材，灭菌后置于操作台备用。

——菌种活化：分别取1 mL复苏后的菌液（6.2.1），接种于3个分装灭菌的锥形瓶后，置于恒温振荡器（5.4）中，在20 ℃、200 r/min条件下培养17 h～19 h，选择发光效果最好的菌种，用于菌体培养。

——菌体培养：分别取1 mL活化菌液，二次接种于3个分装灭菌的锥形瓶。接种后的锥形瓶置于恒温振荡器（5.4）中，在20 ℃、200 r/min条件下培养17 h～19 h，取菌液用氯化钠溶液（4.11）稀释5倍后，用紫外分光光度计（5.18）在600 nm测试吸光度（OD_{600}），OD_{600}大于0.5，可用于毒性测试。

7 生物毒性测定

7.1 测定条件

室温20 ℃～25 ℃，同一批样品在测定过程中要求温度波动不超过±1 ℃，且所有测试器皿及试剂测前1 h置于控温的测试室内。

氯化钠溶液（4.11）为阴性对照溶液，硫酸锌溶液（4.12）为阳性对照溶液，样品萃取液（6.1.4），各至少三个平行样。

7.2 仪器预热和调零

打开生物毒性测试仪（5.5）电源，调零，备用。

7.3 操作步骤

7.3.1 分别取 950 μL 阴性对照溶液（4.11）、阳性对照溶液（4.12）、测试样品萃取液（6.1.4），按表 1 顺序，加入到各测试管（5.5），平行样按相同顺序在后排放置。

表1 毒性测试管排列顺序

平行1	阴性对照溶液	阳性对照溶液	样品1	样品2	……	样品n
平行2	阴性对照溶液	阳性对照溶液	样品1	样品2	……	样品n
平行3	阴性对照溶液	阳性对照溶液	样品1	样品2	……	样品n

7.3.2 从第一个样计时，逐排依次取 50 μL 冻干粉复苏液（6.2.1）或新鲜菌液（6.2.2），每隔 20 s～30 s 加至各测试管（7.3.1），用快速混匀器（5.17）混匀。

7.3.3 计时 15 min 后，按加菌液的时间顺序，将测试管放入生物毒性测试仪（5.5）的测试舱，测试并记录发光强度。

7.4 测试结果有效性的确认

阳性对照溶液的相对发光强度（△T）应在50%±10%。

——△T大于60%，以氯化钠溶液（4.11）适当稀释菌液后重新测试相对发光强度；

——△T小于40%，需使用新的发光杆菌冻干粉或重新培养发光细菌。

7.5 半数有效浓度 EC_{50} 测定

7.5.1 操作步骤

a）将萃取液用灭菌后的氯化钠溶液（4.11）稀释成5个浓度：100%、10%、1%、0.1%、0.01%(其对数依次为0，-1，-2，-3，-4)，按7.3进行测试，分别计算相对发光强度△T，确定1% ＜ △T＜100%所在的浓度范围R_1。

b）在浓度范围R_1内，按等浓度间距或者等对数间距增配至少7个浓度(例如，若1% ＜ R_1 ＜ 10%，则按等浓度间距稀释为1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%；若0.1% ＜R_1＜10%，则按等对数间距稀释为0.1%、0.25%、0.5%、0.75%、1%、2.5%、5%、7.5%、10%)，按 7.3 进行测试，计算相对发光强度△T。

7.5.2 数据处理

用origin或类似统计软件，拟合相对发光强度(△T)与稀释浓度（C）的关系曲线，得到相关方程。检验相关系数r，若r ≥ 0.95，则相关方程成立；反之，应重新稀释萃取液，进行测试。

7.6 有色样品测定干扰的校正

a）在2 mL测试管（5.5）中加入950 μL阴性对照溶液（4.11），将该管放入一只装有阴性对照溶液（4.11）的5 mL测试管（5.5）内，使外管与内管的液面平齐，作为对照管；

b）另取一只2 mL测试管（5.5），加入950 μL阴性对照溶液（4.11），放入另一只装有有色待测样品萃取液（6.1.4）的5 mL测试管（5.5）内，使外管与内管的液面平齐，作为颜色校正管；

c）向a)、b)内管中同时加入50 μL发光细菌液（6.2）(应为同一批次样品测定所用的同一个菌液)，记时到秒，反应15 min，立即放入仪器测试舱，测定带有内管的5 mL管的发光强度。分别记录发光强度L_1(对照管)和 L_2(校正管)；

d）计算阴性对照溶液因颜色引起的发光强度校正值（$\Delta L=L_1-L_2$）；

e）按7.3.1～7.3.3步骤测试带色样品萃取液（6.1.4）及阴性对照溶液（4.11）的发光强度，阴性对照溶液（4.11）测得的发光强度减去校正值ΔL后，为样品颜色校正后的阴性对照溶液（4.11）发光强度。

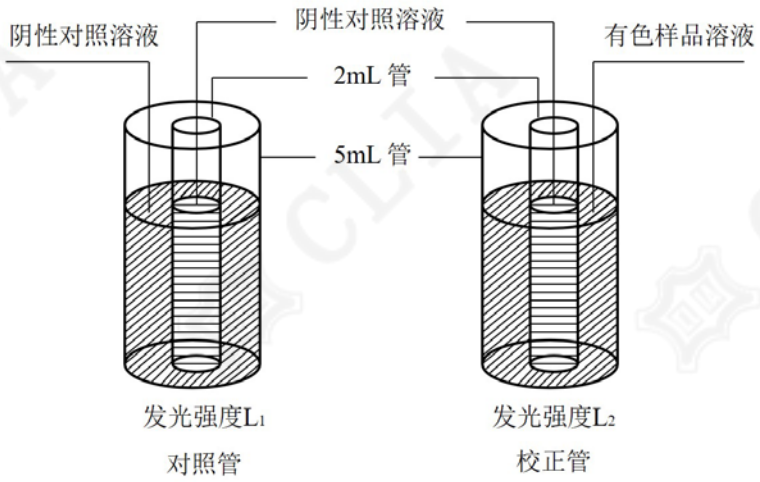

图1　有色样品溶液测定干扰的校正

8　计算

8.1　相对发光强度△T

按公式（1）分别计算阳性对照溶液、待测样品溶液的相对发光强度（△T）。

$$\Delta T=\frac{T_1}{T_2}\times 100 \cdots\cdots (1)$$

式中：

ΔT — 相对发光强度，单位为百分比（%）；

T_1 — 阳性对照溶液（或待测样品萃取液）的平均发光强度，单位为坎德拉（cd）；

T_2 — 阴性对照溶液的平均发光强度，单位为坎德拉（cd）。

8.2　半数有效浓度 EC_{50}

将△T=50%代入7.5.2的相关方程，求出萃取液浓度（样品的稀释浓度），C_{EC50}值，以百分浓度表示，按公式（2）换算为mg/L表示，即为EC_{50}。

$$EC_{50} = C_{EC_{50}} \times \frac{m_0}{V} \times 10^6 \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots(2)$$

式中：

EC_{50} — 半数有效浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

C_{EC50} — 萃取液半数光抑制百分浓度，单位为百分比（%）；

m_0 — 皮革样品质量，单位为克（g）；

V — 萃取液体积，单位为毫升（mL）。

9 结果表示

样品生物毒性检测结果的表示形式：

——样品萃取液的相对发光强度△T大于等于50%时，应采用相对发光强度△T表示；

——样品萃取液相对发光强度△T小于50%、大于20%时，可采用相对发光强度△T或半数有效浓度EC_{50}表示；

——样品萃取液相对发光强度△T小于等于20%时，宜采用半数有效浓度EC_{50}表示。

10 方法的精密度

样品至少进行3次平行测定，结果的相对偏差应不大于15%。

11 试验报告

a）本文件的编号；

b）测试条件（温度、湿度）；

c）非标准取样应详细说明；

d）发光细菌种类（冻干粉复苏液或新鲜菌液）；

e）测试结果；

f）实际操作与本文件的不同之处；

g）报告批准人及批准日期。