ICS 59.140.30
CCS Y 45

团　体　标　准

T/CLIAS ××××—××××

皮革 环境安全评价试验 发光细菌法

Leather- Assessment of ecological performance - luminescent bacteria method

（征求意见稿）

（在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上）

202×-××-××发布　　202×-××-××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

本文件规定了皮革环境安全评价的试验方法。

本文件适用于皮革（坯革）的环境安全性评价。

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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 15441 水质 急性毒性的测定 发光细菌法

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

本方法采用蒸馏水萃取样品，然后采用明亮发光杆菌，测定萃取液的生物毒性。

将皮革样品剪碎，然后用蒸馏水在液固比为20:1（mL:g），25℃±2℃，100 r/min条件下萃取24h±5min，萃取液过滤后，调节pH 7±0.1，用明亮发光杆菌进行生态性测试。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≤0.05）。

报告结果按相对发光强度或EC50（半数有效浓度---以mg/kg为单位）来表征。

4 试剂

警告：使用浓酸和氯化汞时，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。蒸馏水应符合GB/T 6682规定的三级水，新鲜制备。

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。

4.8 甘油。

4.9 氢氧化钠，0.1 mol/L。

4.10 盐酸，0.1 mol/L。

4.11 氯化钠溶液，3%。氯化钠30g于玻璃容器内，加蒸馏水定容至1000mL。

4.12 氯化汞溶液，0.10 mg/L。

用万分之一分析天平，称取密封保存良好的无结晶水氯化汞0.0500g，放入50 mL棕色容量瓶，用3%氯化钠溶液稀释至刻度，将该1000 mg/L氯化汞母液置于（2～5）℃冰箱备用，保存期3个月。

移取母液1.0mL，入100mL棕色容量瓶，用3%氯化钠溶液定容，再移取该工作溶液1mL，入100mL棕色容量瓶，3%氯化钠定容。氯化汞稀释液保存期不得超过24h，超过者务必重配。

5 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20min。
5.3 pH计，精度为0.01。
5.4 恒温振荡器，能够保持温度20℃或者25℃，转速100r/min或者200r/min。
5.5 生物毒性测试仪，配置2mL或5mL测试管。
5.6 微量注射器，50μL。
5.7 注射器，1mL。
5.8 吸管，1mL、2mL、5mL、10mL。
5.9 锥形瓶及具塞锥形瓶，250mL。
5.10 试剂瓶，100mL。
5.11 量筒，50mL、500mL。
5.12 棕色容量瓶，50mL、100mL。
5.13 分析天平，精确至0.1mg。
5.14 快速定性滤纸。
5.15 快速混匀器。

6 样品与明亮发光细菌准备

6.1 样品制备和萃取

6.1.1 取样

如果用于测试的是完整的皮革，按照QB/T 2706中给出的标准程序进行取样。如果不能按照QB/T 2706进行取样（例如鞋面革、服装革、革屑等），应在测试报告中提供取样的详细信息。

6.1.2 样品调节

按QB/T 2716将皮革样品剪碎。对于潮湿的试样（水分超过30％），应在不超过45℃±5℃的温度下干燥12h以上。按QB/T 2707调节试样，待测。

6.1.3 萃取

使用分析天平（5.13）准确称取3.0 g样品（6.1.2），置于250 mL具塞锥形瓶（5.9），加入60 mL蒸馏水，置于恒温振荡器（5.4）于温度25±2℃，转速100 r/min下振动24h±5min。滤纸（5.14）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3g/100mL浓度。pH计（5.3）测定萃取液pH，0.1 mol/L HCl或NaOH溶液调节pH为7.0±0.1。毒性测定应在萃取后6h内进行。否则应在2℃～5℃下保存样品，但不得超过24h。报告中应写明样品萃取时间和测定时间。

6.2 明亮发光细菌准备

6.2.1 冻干粉

取明亮发光杆菌冻干粉一瓶，加入3%氯化钠溶液2mL～5mL，在20℃-25℃复苏15min。

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。

——培养基配制：胰蛋白胨5.0g/L，酵母浸粉5.0g/L，K_2HPO_4 1.0g/L，Na_2HPO_4 5.0g/L，NaCl 30.0g/L，甘油3.0g/L，加蒸馏水，用0.1mol/L的HCl调节pH为6.5，配制1L培养基。

——分装灭菌：按每瓶100mL分装在250mL锥形瓶中，压力蒸汽灭菌器（5.2）中121℃灭菌20min后，置于超净工作台（5.1）备用。同时需准备实验所需的枪头等实验器材，灭菌后置于操作台备用。

——一次接种：分别取复苏后的菌液1mL（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，培养条件为20℃、200r/min，17h-19h左右发光强度到达最大值，可收获。

——二次接种：选择发光效果最好的菌种，分别取1mL菌液，二次接种于3个分装灭菌的锥形瓶中。接种后的锥形瓶放置于恒温振荡器（5.4）中，培养条件为20℃、200r/min，17h-19h左右细菌处在减数分裂末期，可用于毒性测试。

注： 一次接种培养的目的是选择生长和发光状态较好的菌种进行传代培养。

7 生态毒性测定

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1h置于控温的测试室内。

以3%NaCl为阴性对照样，0.10 mg/L $HgCl_2$为阳性对照样，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

按顺序分别取950μL阴性对照、阳性对照、测试样品加入到各测试管，平行样按相同顺序在后排摆放。

7.3.1 取明亮发光杆菌冻干粉一瓶，加入 2mL～5mL 3%氯化钠溶液在 20℃-25℃复苏 15min。

7.3.2 从第一个样计时，逐排依次取 50μL 冻干粉复苏液或新鲜菌液，每隔 20s-30s 加至各测试管（7.3.1），快速混匀器（5.15）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，读出其发光强度(或以光电信号转化的电信号-电压 mV 数表示)。

7.3.4 有色样品测定干扰的校正

a) 在2mL测试管(直径12mm)中加阴性对照950μL,将该管放进一装有少量阴性对照溶液的5mL测试管(直径20mm)内，使外管与内管的液面平齐，此作对照管；

b) 另取一只2mL测试管，加阴性对照950μL，放入另一装有少量有色待测样品液的5mL测试管内，使外管与内管的液面平齐，此作颜色校正管；

c) 于a)、b)内管中同时加50μL发光细菌菌液（注意：必须是本批样品测定所用同一个菌液)，记时到秒，反应15min，立即放入仪器测试舱，测定带有内管的5mL管的发光强度。分别记录发光量L1(对照管)和L2(校正管)；

d) 计算阴性对照因颜色引起的发光量校正值ΔL＝L1-L2；

e) 按7.3.1～7.3.3所述常规步骤测试带色样品管及阴性对照样的发光强度，阴性对照管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发光强度。

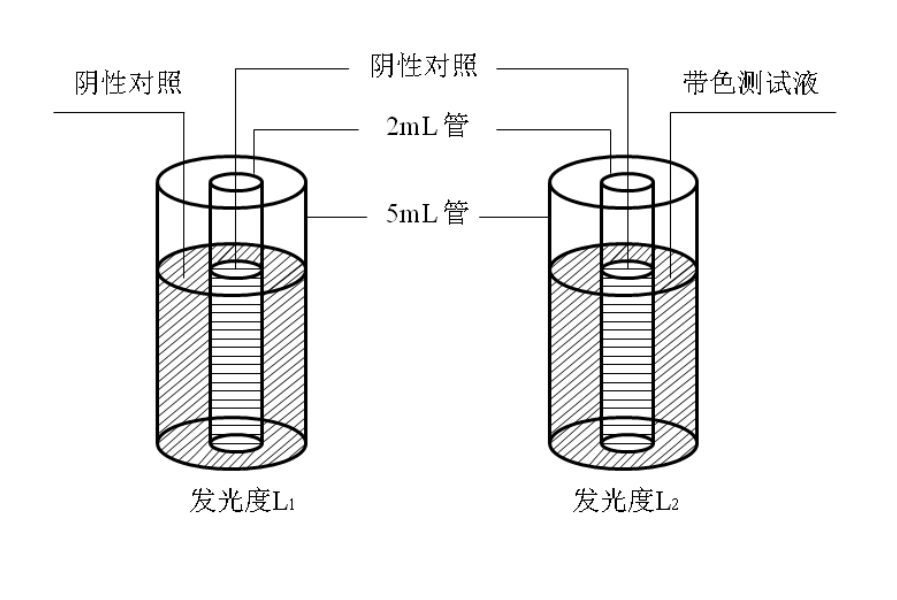

图1 有色样品溶液测定干扰的校正

7.4 测试质量控制

以阴性对照的平均发光强度为分母，阳性对照或待测样品萃取液的平均发光强度为分子，计算相对发光强度。

$$\text{相对发光强度}T(\%)=\frac{\text{阳性对照管或样品管平均发光强度}}{\text{阴性对照管平均发光强度}}\times 100\% \qquad (1)$$

阳性对照管的相对发光强度须在50%±10%。若高出60%，以3%NaCl适当稀释菌液后重新测试；低于40%，发光细菌活力不够，需使用新的发光杆菌冻干粉或重新培养发光细菌。

8 结果表示

8.1 原则

当样品萃取液的相对发光强度T高于50%（含等于）时，直接采用相对发光强度T（1式）表达样品生态性；

当样品萃取液相对发光强度T高于20%，低于50%时，可采用相对发光强度T（1式）或半数光抑制浓度EC_{50}表达；

当样品萃取液相对发光强度T低于20%（含等于），宜采用半数光抑制浓度EC_{50}表达。

8.2 EC_{50}

8.2.1 测定程序

将萃取液稀释成5个浓度：100%、10%、1%、0.1%、0.01%(它们的对数依次为0，-1，-2，-3，-4)，按第7章进行测试，计算相对发光强度T，确定1% < T< 100% 所在的浓度范围R_1。

在浓度范围R_1内，按等浓度间距或者等对数间距增配7~9个浓度(例如，若0.1% < R_1 < 10%，则稀释为0.1%、0.25%、0.5%、0.75%、1%、2.5%、5%、7.5%、10%；若1% < R_1 < 10%，则稀释为1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%)，按条款7测试，计算相对发光强度。

8.2.2 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。并检验相关系数r，若r ≥0.95，则所求相关方程成立；反之，须重新稀释萃取液，做毒性测定。

将T＝50%代入相关方程，求出萃取液浓度，即EC_{50}值。该EC_{50}值以样品的稀释浓度(百分浓度表示），可换算为mg/kg表示：

$$EC_{50}(mg/kg)=EC_{50}(\%)\times\frac{\text{皮粉质量(g)}}{\text{浸提液体积（mL）}}\times 10^{6} \quad (2)$$

测试结果报告列举样品的EC_{50}值。

8.3 测定结果报告

a) 实验室室温；

b) 样品部位、萃取条件、日期；

c）0.10mg/L氯化汞阳性对照样的相对发光强度；

d）样品萃取液相对发光度(%)或稀释浓度与其相对发光度的拟合方程 _____ ，r ＝ _____ ，EC_{50} =_____

e）测定人及所在单位。

9 方法的精密度

样品至少进行3次平行测定，测定结果的相对偏差应不大于15%。

附　录　A
（资料性）
发光细菌法实验记录

发光细菌法实验记录见表 A.1。

表 A.1 发光细菌法实验记录

测定日期：　　测定人：　　提取方式：

序号	加菌液时间（暴露开始, XX 时：XX 分：XX 秒）	测定时间 (暴露 15 分钟，XX 时：XX 分：XX 秒)	发光强度或发光量（mV）	相对发光强度 T（%）	毒性记录 (EC_{50} 或光抑制率)

拟合方程 _____　　r ＝ _____