

基于多种微生物的毒性检测 MTOXPlate 冻干板制备及优化

林奕云^{1,2,3,4} 张国霞^{2,3,4} 许玫英^{2,3,4} 贺丽苹^{1*} 孙国萍^{2,3,4*}

(1. 华南农业大学 食品科学学院 广东 广州 510642)

(2. 广东省微生物研究所广东省菌种保藏与应用重点实验室 广东 广州 510070)

(3. 广东省微生物应用新技术公共实验室 广东 广州 510070)

(4. 广东省华南应用微生物重点实验室—省部共建国家重点实验室培育基地 广东 广州 510070)

摘要: 【目的】制备基于多种微生物的生物毒性检测 MTOXPlate 冻干板,从而简化操作程序,使其能更灵敏、方便、快速地进行生物毒性测试。【方法】采用真空冷冻干燥法将指示微生物固定在微孔板中。以存活率为指标,利用荧光分光光度法确定冻干保护剂的组成。通过分析毒性响应灵敏度对检测条件进行优化。【结果】MTOXPlate 的冻干保护剂组成为 8%海藻糖、2%葡萄糖、2%甘露醇、1%谷氨酸钠。在此组成下,11 株菌株的平均存活率最高,可达 89.41%。复活介质与测试样品同时加入,在缩短了测试时间的同时也提高了检测灵敏度。该冻干板具有良好的灵敏度和重现性,能较好地满足污染物生物毒性测试的需要。【结论】MTOXPlate 冻干板可作为一种新型的生物毒性测试技术,在生态毒理检测领域推广应用。

关键词: 11 种微生物, MTOXPlate 微孔板, 冷冻干燥, 毒性检测

基金项目: 广东联合基金项目(No. U1133005); 广东省产学研项目(No. 2011A090100030); 广东省自然科学基金研究团队项目(No. 9351007002000001); 国家水体污染控制与治理科技重大专项项目(No. 2008ZX07211-007)

*通讯作者: 贺丽苹: Tel: 86-20-85280198-607; 邮箱: heliping@scau.edu.cn

孙国萍: Tel: 86-20-37656331; 邮箱: guopingsun@163.com

收稿日期: 2012-08-15; 接受日期: 2012-11-15

Preparation and optimization of lyophilised MTOXPlate for toxicity testing based on eleven different microorganisms

LIN Yi-Yun^{1,2,3,4} ZHANG Guo-Xia^{2,3,4} XU Mei-Ying^{2,3,4} HE Li-Ping^{1*}
SUN Guo-Ping^{2,3,4*}

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

(2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510070, China)

(3. Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510070, China)

(4. State Key Laboratory of Applied Microbiology (Ministry-Guangdong Province Jointly Breeding Base), South China, Guangzhou, Guangdong 510070, China)

Abstract: [Objective] In order to simplify the procedure and improve the sensitivity of biological toxicity testing method, the lyophilised MTOXPlate based on 11 genetically diverse microorganisms was prepared. **[Methods]** The tested microbial strains were fixed on the microplate by the vacuum freeze-drying method. Fluorescence spectrophotometry was used to determine the effects of several cryoprotectants on the freeze dried strains with the survival rate as the selecting index. The test condition was optimized through the sensitivity of toxicity detection. **[Results]** When the protective agent contains 8% trehalose, 2% glucose, 2% mannitol and 1% sodium glutamate, the mean cell survival rate can reach 89.41% for 11 microbial strains used in this study. The resurrection medium and test sample were added to each well of the pre-prepared 96-well microplate at the same time. So that, short testing time and optimal detection sensitivity could be obtained. This lyophilised MTOXPlate exhibits high sensitivity and good reproducibility, which is suitable for the toxicity assessment. **[Conclusion]** MTOX-Plate could be a new biological toxicity test technology, which can be applied to the field of ecological toxicity testing.

Keywords: Eleven microorganisms, MTOXPlate, Lyophilization, Toxicity testing

随着工业化程度的提高以及人类对化工产品需求的不断增加,各种化学物质的用量猛增,从而造成越来越多的化学物质通过生产和使用进入水体,对水环境造成日益严重的污染^[1-3]。对水源水毒性的传统分析方法主要是分析某几种代表性污染物的浓度来估测样品的毒性,其有效性并不为毒理学界广泛认同,且水环境中还含有许多痕量的未知物质,其毒性不可忽视。近年来,

人们提出了多种生物毒性测试方法对水环境中有毒污染物的生物毒性进行分析评价。其中,以微生物为受试对象的毒性检测方法,因微生物具有生物机体小、种群数量大、生长繁殖快、保存简单方便、对环境变化反应快,并且与高等动物有着类似的物理化学特征和酶作用过程等特点而得以迅速发展^[4-6]。目前,国内外已实现商业化的水质毒性检测仪与试剂盒主要有

Toxi-chromotestTM、MetPADTM、MetPLATETM、BioToxTM、ToxAlertTM、MicrotoxTM、DeltatoxTM、LUMIStox 300TM、LumiFox 8000TM和 DXY-2 型生物毒性测试仪等^[7-8],它们都是以一株细菌为指示生物, Polytox 检测体系则是以混合菌剂作为受试生物获得一个单一的试验结果^[9]。然而, Gabrielson 等^[10-11]利用 11 株微生物建立了一种毒性试验方法 MARA (Microbial assay for risk assessment), MARA 利用多物种进行化合物的毒性检测,一次试验提供多个试验结果,相当于将成套的几个试验集成一次试验完成,避免了试验结果的片面性,而且具有较宽的检测谱,对于复杂的环境样品,能同时检测到多种物质的毒性。

本实验室前期已筛选到能对水体中常见不同结构类型的化学物质具有良好的响应灵敏度和稳定性的本土微生物,以这些微生物为受试材料,建立了一种基于细胞脱氢酶活性的生物毒性检测方法 MTOXPlate,其工作原理是:以 96 孔板为反应载体,11 种不同种属的微生物为指示生物,采用 2,3,5-氯化三苯基四氮唑盐(TTC)为指示剂,当毒性污染物存在时,微生物细胞的脱氢酶活性因受到抑制作用表现出光密度(OD_{490})的变化,根据待测污染物对微生物细胞脱氢酶活性的抑制程度来判断其毒性的强弱。前期研究表明,该毒性检测方法对无机物和有机物的毒性测试具有良好的灵敏度和重现性^[12]。然而,在实际进行毒性检测时,使用新鲜培养菌液成为限制其推广应用的一个关键因素,因而,如何简化操作程序,使其更灵敏、快速地进行生物毒性测试,具有实际的研究意义^[10,13-14]。

本研究选取前期筛选的 11 种微生物(10 种细菌和 1 种酵母菌)为指示生物,采用真空冷冻干燥法将微生物细胞平行固定在聚苯乙烯的 96 孔板上,选择和优化生物毒性检测 MTOXPlate 冻干板的保护剂配方及检测条件,探讨其在污染物的生

物毒性检测中的响应性能,为实现 MTOXPlate 冻干板在生态毒理检测领域的推广应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂: LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit L7007 试剂盒,美国 Invitrogen 公司; 2,3,5-氯化三苯基四氮唑,葡聚糖,葡萄糖,海藻糖,甘露醇,谷氨酸钠,苯酚,乙二醇等均为分析纯。

1.1.2 主要仪器: LS-55 荧光/磷光/发光分光光度计,美国 Perkin Elmer 公司; Ultrospec 6300 pro 紫外/可见光分光光度计,美国 Beckman 公司; Labconco 真空冷冻干燥机,美国 Labconco 公司; Multiskan GO 全波长酶标仪,赛默飞世尔科技公司; GHP-9160 恒温培养箱,上海一恒科学仪器有限公司; E-51703-05 恒温振荡培养箱,美国 Coleparmer 公司; Milli-Q 超纯水系统; 酶标板选用 96 孔 U 型底透明聚苯乙烯微孔板,美国 Costar 公司。

1.1.3 菌种: 11 株实验菌种来源于广东省微生物研究所环境菌种库,菌株信息如表 1 所示。

1.2 复合保护剂的制备

5 种复合保护剂的组成如表 2 所示,各种保护剂成分均用蒸馏水配成一定浓度储备液,灭菌后按照表 2 实验设计配制成复配保护剂(均为质量分数)。其中糖类用 0.22 μm 的微孔滤器过滤除菌,其余溶液在 0.8 MPa 下灭菌 20 min。

1.3 冻干粉制备

活化后的菌株,分别按 1%接种量接种于 LB 液体培养基(其中,酿酒酵母采用 YPD 液体培养基^[15]),在 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养至对数生长期,取菌液于 3 000 r/min 离心 10 min,去上清液,收集菌体,将菌体分别悬浮于等体积的复合保护剂中,分装于 10 mL 玻璃瓶中,每瓶 1.0 mL,于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 预冻

表 1 MTOXPlate 试验微生物
Table 1 Microbial strains used in the MTOXPlate

菌株编号 Number	菌株信息 Information	菌株名称 Designation
1	睾丸酮丛毛单胞菌 <i>Comamonas testosterone</i>	N9
2	表皮短杆菌 <i>Brevibacterium epidermidis</i>	AN3
3	松鼠葡萄球菌 <i>Staphylococcus sciuri</i>	Bei2
4	硝酸还原代尔夫特菌 <i>Diaphorobacter nitroreducens</i>	DR391
5	缺陷短波单胞菌 <i>Brevundimonas diminuta</i>	DR395
6	假单胞菌 <i>Pseudomonas</i> sp.	Q2
7	人苍白杆菌 <i>Ochrobactrum anthropic</i>	AN419
8	弗氏柠檬酸杆菌 <i>Citrobacter freundii</i>	J13
9	成团泛菌 <i>Pantoea agglomerans</i>	J7
10	铅黄肠球菌 <i>Enterococcus casseliflavus</i>	J11
11	酿酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y109

表 2 不同保护剂的组成
Table 2 The composition of different cryoprotectants

成分 Ingredient	保护剂 I ^[10] Cryoprotectant I	保护剂 II Cryoprotectant II	保护剂 III Cryoprotectant III	保护剂 IV Cryoprotectant IV	保护剂 V Cryoprotectant V
葡聚糖 Dextran	2%	2%	—	—	—
海藻糖 Trehalose	—	—	4%	6%	8%
葡萄糖 Glucose	7.5%	7.5%	6%	4%	2%
磷酸盐缓冲液 Phosphate buffer	0.3 mol/L, pH 7.5	—	—	—	—
甘露醇 Mannitol	—	2%	2%	2%	2%
谷氨酸钠 Sodium glutamate	—	1%	1%	1%	1%

注: —: 没有添加物质。

Note: —: Nothing added.

过夜, 真空冷冻干燥 12 h 后, 置于-20 °C 冰箱中, 保存备用。

1.4 MTOXPlate 冻干板制备

将 OD_{600} 为 1.0 的菌液稀释 10 倍, 3 000 r/min 离心 10 min, 去上清液, 将菌体分别悬浮于等体积的复合保护剂 V。在 96 孔 U 型细胞培养板中, 使用多道移液器往每列加入相应的菌悬液, 每孔

加入量为 50 μ L。微孔板的设计如图 1 箭头所示, 11 个菌株分别分布在第 1-11 列, 第 12 列为空白对照。将 96 孔板置于-80 °C 冰箱中预冻过夜, 随后放入真空冷冻干燥机中进行冷冻干燥 12 h, 冷阱温度为-55 °C, 真空度为 4 Pa。取出, 将冻干板放入 14 cm×20 cm 的铝袋, 抽真空密封, 袋内放入一包 5 g 硅胶干燥剂, -20 °C 冰箱保存

备用。

1.5 冻干存活率的测定

BacLight 染色法是基于细胞膜完整性检测的荧光染色技术, 其原理是利用荧光染色剂与细胞核酸结合, 使核酸在蓝光的激发下发射荧光, 通过测定发射荧光的强度确定样品中活菌比例。所用核酸染色剂为 SYTO[®]9 和 Propidium iodide (PI)。当两种染色剂共同作用下的细菌细胞, 显绿色荧光的细胞被认为是具完整细胞膜的活菌, 而显红色荧光的细胞被认为是细胞膜有破损的死菌。通过这种染色方法, 可以简便清晰地分析出活菌在菌液中的比例^[16]。本实验采用 BacLight 染色-荧光分光光度法^[17-18], 利用 LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit L7007 试剂盒, 按照操作说明书进行冻干菌体存活率的测定。

1.5.1 标准曲线的测定: 取 25 mL 对数生长期的菌液于 4 °C、10 000×g 离心 10 min; 去上清, 将菌体重悬于 2 mL 生理盐水(0.85% NaCl 溶液)中, 混合均匀; 等分两份, 分别加入 20 mL 生理盐水(活细胞)和 20 mL 70%异丙醇(死细胞); 在 25 °C 振荡培养 1 h; 10 000×g 离心 10 min, 去上清, 将菌体重悬于 20 mL 生理盐水中, 重复洗涤菌体 1 次; 用生理盐水调整 OD₆₇₀ 为 0.03; 标准曲线的配比如表 3 所示。

荧光染料的配制: Component A 和 Component B 各 250 μL, 混匀, 备用。

表 3 标准曲线中的配比		
Table 3 Proportions of live:dead cells for standard curve		
存活率	活细胞悬浮液	死细胞悬浮液
Survival rate	Live-cell suspension	Dead-cell suspension
(%)	(mL)	(mL)
0	0.0	3.0
10	0.3	2.7
50	1.5	1.5
90	2.7	0.3
100	3.0	0.0

染色: 向 3 mL 样品液中加入 9 μL 混合染色液, 分别混合均匀, 在暗室下孵育 15 min。

测定: 在 470 nm 激发波长下, 扫描 490–700 nm 范围的荧光发射光谱, 分别对 510–540 nm (绿光 G)的荧光峰和 620–650 nm (红光 R)的荧光峰进行积分, 并计算其峰面积比值(G/R), 每个样品 3 个平行, 取平均值, 绘制标准曲线。

1.5.2 冻干菌体存活率的测定: 将 1.3 制备的冻干菌粉复水后, 参照 1.5.1 用生理盐水离心洗涤 2 次后, 再用生理盐水调菌液 OD₆₇₀ 至 0.03, 按上述方法染色, 荧光分光光度法测定, 计算 510–540 nm 和 620–650 nm 对应的峰面积比值, 根据标准曲线计算冻干菌体存活率。每个样品做 3 个平行。

1.6 MTOXPlate 冻干板毒性检测

从–20 °C 冰箱中取出 MTOXPlate 冻干板, 置于超净工作台往每孔加入 50 μL 含 0.02% TTC 的 LB 培养基, 作为复活介质。向第 H 排加入 50 μL 未经稀释的样品溶液, 由 G 往上至 B 依次加入 2、4、8、16、32、64 倍稀释的样品液各 50 μL, A 行加入 50 μL LB 培养基, 作为阴性对照, 使各孔总体积均为 100 μL, 如图 1 所示。为抑制水分蒸发, 用封口膜将微孔板边缘封住。将 MTOXPlate 板置于 30 °C 恒温培养箱染毒培养 18 h, 用酶标仪在 490 nm 处测定吸光值。每个化合物的浓度梯度系

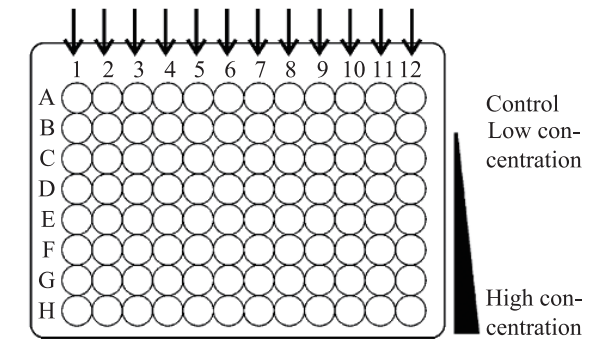


图 1 MTOXPlate 毒性试验的微孔板设计
Fig. 1 Microplate design of MTOXPlate toxicity assay

列做 3 组平行试验。为保证实验结果的准确性, 以第 12 列的菌株是否生长检验该板是否受污染。MTOXPlate 毒性检测结果以 11 株菌株的 EC_{50} 平均值表示。

1.7 数据处理与分析

测定结果以抑制率表示, 即:

抑制率 I (%) =

$$\frac{\text{对照吸光度} A_0 - \text{样品染毒后吸光度} A}{\text{对照吸光度} A_0} \times 100$$

以浓度为自变量, 抑制率为因变量, 利用 SPSS 16.0 软件, 建立概率单位-质量浓度对数的回归方程, 计算出受试毒物的半数抑制浓度 (EC_{50})。采用 Origin 8.5 作图, 单因素方程分析 (One-way ANOVA) 法统计分析其显著性, 以 $P < 0.05$ 作为差异显著水平, 相关性分析采用 Pearson 相关系数检验法。

2 结果与分析

2.1 保护剂的优化

在冷冻和干燥过程中, 冻干微生物的部分细胞会发生损伤、死亡及某些蛋白酶分子被钝化^[19]。添加保护剂可以改变生物样品冷冻干燥时的物理、化学环境, 减轻或防止冷冻干燥或复水对细胞的损害, 使其保持原有的各种生理生化特性和生物活性^[20-21]。然而, 不同保护剂对菌种的保护效果是不同的, 单一保护剂通常不能满足菌体抵抗外界恶劣条件的要求。因此, 以渗透型保护剂和非渗透型保护剂相复配为原则, 根据预实验的结果, 以 MARA 的保护剂 I 为对照, 选取了保护剂 II、III、IV、V 对实验菌株进行冻干。以冻干存活率为指标, 比较 5 种复合保护剂对实验菌株的冻干保护效果, 确定冻干保护剂的组成。

以细胞存活率(%)为横坐标, 以活、死细胞荧光强度比例 G/R 为纵坐标绘制标准曲线, 从而获得 11 个菌株细胞存活率的标准曲线方程及相关

系数 R^2 , 如表 4 所示, 从中可以看出, 标准曲线的相关系数均大于 0.96, 具有良好的相关性。

将冻干粉测得的 G/R 荧光强度比值, 根据标准曲线方程计算存活率, 得到不同保护剂处理的 11 株菌株的冻干存活率, 结果见表 5。

由表 5 可知, 5 种复合保护剂对试验菌株的保护作用存在显著性差异。其中, 复合保护剂 V 对各试验菌株具有较好的保护作用, 11 株菌株的平均存活率最高, 达到 89.41%。MARA 采用复合保护剂 I 作为其冻干保护剂, 然而对于 MTOXPlate 微孔板中的试验菌株, 复合保护剂 V 表现出更好的保护作用。通常认为, 复配保护剂中各成分在冷冻干燥中均发挥着各自的作用, 同时相互间又具有协同作用, 且微生物细胞结构和大小存在差异, 复合保护剂中各成分的比例及质量浓度达到协调时, 将会提高细胞存活率, 达到最佳的保护效果。因而, 以冻干存活率最优为指标, 确定保护剂 V 为 MTOXPlate 的冻干保护剂, 其配方为 8%海藻糖、2%葡萄糖、2%甘露醇、1%谷氨酸钠(W/V)。

保护剂 I、II 和 III 对 11 株菌株的平均存活率没有显著性差异, 而与保护剂 IV、V 存在显著性

表 4 菌株细胞存活率的标准曲线
Table 4 The standard curves of cell survival rate of eleven strains

菌株 Strain	标准曲线方程 Equation of standard curve	相关系数 R^2 Correlation coefficient
1	$y=37.658x+1.890\ 3$	0.965 4
2	$y=18.182x+3.890\ 2$	0.999 4
3	$y=15.596x+4.102\ 1$	0.980 2
4	$y=25.908x+2.459\ 7$	0.995 8
5	$y=32.257x+3.239\ 4$	0.992 5
6	$y=13.203x+3.924\ 5$	0.993 4
7	$y=12.192x+1.423\ 3$	0.963 4
8	$y=14.846x+4.288\ 4$	0.993 2
9	$y=37.767x+0.673\ 5$	0.989 7
10	$y=21.241x+2.373\ 0$	0.993 9
11	$y=25.233x+4.556\ 0$	0.987 8

表 5 不同保护剂对 11 株菌株存活率的影响
Table 5 Effect of cryoprotectants on the survival rate of eleven microbial strains

菌株 Strain	存活率 Survival rate (%)				
	保护剂 I Cryoprotectant I	保护剂 II Cryoprotectant II	保护剂 III Cryoprotectant III	保护剂 IV Cryoprotectant IV	保护剂 V Cryoprotectant V
1	58.60±2.41	63.72±0.72	95.01±1.03	60.57±1.57	94.00±1.35
2	88.99±2.87	89.25±1.65	80.52±0.36	87.26±3.77	99.58±1.43
3	97.06±1.22	60.49±2.84	81.84±0.79	79.56±2.87	90.61±3.73
4	75.68±0.34	78.68±0.33	71.25±2.15	83.46±4.27	85.21±5.72
5	76.14±1.87	67.83±1.27	58.84±1.17	68.37±2.01	75.19±1.37
6	51.69±3.24	74.17±2.14	43.01±2.45	67.21±2.73	92.27±0.79
7	52.66±2.76	36.01±2.58	52.94±2.68	63.27±1.84	90.76±4.43
8	67.91±0.82	89.16±1.44	78.18±1.25	92.24±3.02	94.11±0.71
9	83.68±1.81	62.43±2.76	76.68±4.09	91.71±4.14	84.64±1.03
10	59.71±2.93	67.81±3.56	80.54±3.66	85.69±0.79	88.69±3.92
11	86.78±1.05	95.67±2.04	70.88±1.57	83.21±1.35	88.49±1.56
均值 Mean	72.63c	71.38c	71.79c	78.41b	89.41a

注: 表中不同小写字母表示差异达显著水平($P<0.05$).

Note: Different small letters in the table are significantly different at the 0.05 level.

差异, 这几种保护剂是由不同种类或不同浓度的成分组成, 从它们的组成成分可以发现, 保护剂 III、IV、V 均含有海藻糖, 表明海藻糖的添加对微生物细胞有一定的保护作用。但是, 对于不同的微生物, 各保护剂的最适浓度也是不同的。许多研究表明利用海藻糖作为冷冻保护剂可以使微生物的存活率大大提高, 比其他保护剂的作用效果明显^[22-23]。关于海藻糖对微生物细胞冷冻干燥时的保护机理主要为以下两方面: 当微生物细胞脱水时, 海藻糖以氢键与细胞膜磷脂双分子层的极性部位相连, 防止冷冻干燥和复水时膜产生缺陷而渗漏, 从而提高细胞的存活率^[24-25]; 海藻糖分子的羟基替代了水分子, 同酶的酰胺基形成氢键, 并能包裹在酶分子周围, 或填充在酶蛋白分子的空间结构内, 特别是酶的活性部位附近, 形成玻璃态, 有效地防止蛋白质分子发生三维结构的变化, 从而避免了酶的失活, 使细胞存活率

提高^[26-27]。田洪涛等^[28]研究发现, 在 4 种复合保护剂中添加海藻糖对双歧杆菌细胞冻干存活率的影响极为显著($P<0.01$)。甘露醇作为一种渗透型保护剂, 在溶液中易结合水分子, 通过水合作用使溶液的粘性增加, 弱化了水的结晶过程, 从而达到了保护细胞的目的^[29]。谷氨酸钠的作用可能是其与糖类物质发生联合作用, 增加了干燥时基质的玻璃化转化温度, 降低机械损伤的发生机率。

2.2 样品加入时间对毒性检测灵敏度的影响

样品加入时间对毒性测试的灵敏度会有一定影响, 本试验选择苯酚、硫酸镉为受试毒性物质, 研究比较了在添加 LB 培养基作为复活介质, 分别培养 0、1、2、3、4 和 6 h 后, 加入测试样品进行毒性测定, 化合物毒性响应 EC_{50} 值的差异。

由图 2 可知, 样品加入时间越迟, 即冻干菌株复苏时间越长, EC_{50} 值越大, 毒性效应越不明

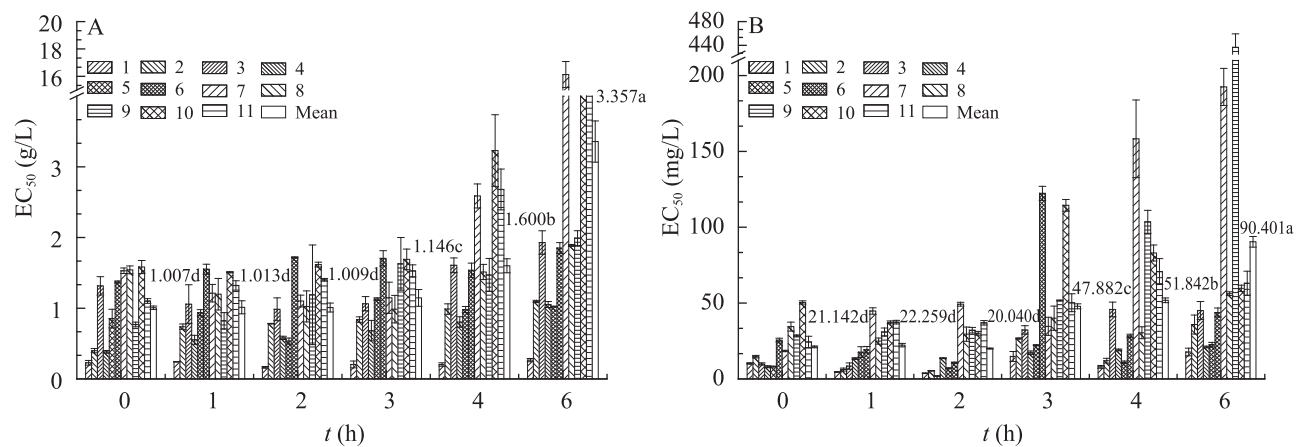


图 2 样品加入时间对化合物毒性检测 EC_{50} 值的影响

Fig. 2 Effect of time of sample addition on EC_{50} value of chemical toxicity testing

注: A: Phenol; B: Cadmium sulfate. 不同小写字母表示差异达显著水平($P < 0.05$).

Note: A: Phenol; B: Cadmium sulfate. Different small letters indicate significant differences at $P < 0.05$.

显。该方法是将微生物暴露于一系列浓度梯度的样品中,利用 2,3,5-氯化三苯基四氮唑盐作为指示剂,测定细胞脱氢酶的活性,来反映微生物细胞在毒物胁迫下的生长抑制效应,所以,当测试样品在冻干菌株进入生长期以后加入,细胞脱氢酶的活性相应提高,其背景吸光度值越高,就会造成生长抑制率下降,降低了灵敏度。结果表明,冻干板在复苏时间大于 2 h 时,添加测试样品,用于毒性检测的灵敏度显著下降,在复苏时间 2 h 内,添加测试样品,用于毒性检测的灵敏度不存在显著性差异。因此,在保证灵敏度的前提下,为缩短评价时间,选择将测试样品与复苏介质同时加入,直接进行毒性测试,这样能够在缩短测试时间的同时提高检测灵敏度。

2.3 冻干板应用于化合物毒性测试

为了考察 MTOXPlate 冻干板对无机物和有机物毒性检测的灵敏度,选择 MEIC (Multicentre evaluation of *in vitro* cytotoxicity)^[30]中的参考化学物质乙二醇、苯酚、氟化钠、硫酸锂、硝酸钡、氯化钾以及丙烯酰胺为受试毒性物质。以 EC_{50} 为评价指标,比较了新鲜菌液和冻干板的毒性测试灵敏度差异,具体结果见表 6。同时,将 MTOXPlate

方法和发光细菌法 Microtox、大型蚤试验、萼花臂尾轮虫试验、大肠杆菌抑制试验、MARA 等几种常见的毒性测试方法进行了比较,结果见表 7。

从表 6 可知,当以新鲜培养的菌悬液测试乙二醇、苯酚、氟化钠、硫酸锂、硝酸钡、氯化钾、丙烯酰胺的急性毒性, EC_{50} 分别为 58.809、1.580、

表 6 不同条件下 MTOXPlate 毒性测试结果 Table 6 The results of the MTOXPlate toxicity test in different condition		
化合物 Compound	EC_{50} (g/L)	
	新鲜菌液 Fresh bacteria suspension	冻干板 Lyophilised MTOXPlate
Ethylene glycol	58.809	52.760*
Phenol	1.580	1.007*
NaF	1.736	1.067**
Lithium sulfate	5.632	5.537
Ba(NO ₃) ₂	1.808	1.553*
KCl	28.394	20.717*
Acrylamide	1.752	1.370*

注: *: 与新鲜菌液相比差异显著($P < 0.05$); **: 与新鲜菌液相比差异极显著($P < 0.01$).

Note: *: A markedly compared difference with the fresh bacteria suspension group ($P < 0.05$); **: A highly markedly compared difference with the fresh bacteria suspension group ($P < 0.01$).

表 7 与其他毒性测试方法的比较
Table 7 Comparison between the MTOXPlate test and results from other toxicity tests

化合物 Compound	Microtox®	大型溞试验 <i>Daphnia magna</i>	轮虫试验 <i>Brachionus calycifloru</i>	大肠杆菌试验 <i>E. coli</i>	MARA	MTOXPlate	
						均值 Mean	最小值 Minimum
Ethylene glycol	167	75	ND	271	48	52.760	20.568
Phenol	0.13	0.007	1.21	2.3	1.4	1.007	0.228
NaF	9.8	0.64	0.401	11	14	1.067	0.215
Lithium sulfate	26	0.03	1.51	68	19	5.537	0.309
Ba(NO ₃) ₂	29	0.21	ND	ND	2.4	1.553	0.065
KCl	2.6	0.55	1.71	1.4	52	20.717	6.100
Acrylamide	0.026	1.46	0.14	3.59	ND	1.370	0.020

注: MRAR 试验结果以 MTC 表示, 大肠杆菌试验以 MIC 表示, 其它试验结果均以 EC₅₀ 表示, 单位为 g/L; Microtox, 大型溞试验, 轮虫试验, 大肠杆菌试验数据来自 MEIC-list^[30], MARA 试验数据来自 Gabrielson^[10]; ND 表示无参考数据。
Note: The results are given as EC₅₀ values for Microtox, *Daphnia*, *Brachionus calycifloru* and MTOXPlate, as MTC values for the MARA test, and as MIC values for *E. coli*. All values are given in g/L. The results for Microtox, *Daphnia*, *Brachionus calycifloru* and *E. coli* were collected from the MEIC-list^[30]. The results for MARA were collected from Gabrielson^[10]. ND: No data available.

1.736、5.632、1.808、28.394 和 1.752 g/L; 而采用真空冷冻干燥法将指示微生物固定在 96 孔板上, 测得的 EC₅₀ 分别为 52.760、1.007、1.067、5.537、1.553、20.717 和 1.370 g/L。与新鲜菌液相比, 除硫酸锂的毒性测试结果无显著性差异 ($P>0.05$), 其余化合物的毒性检测 EC₅₀ 显著性降低 ($P<0.05$), 表明冻干粉复苏后对毒性物质检测灵敏度有一定程度的提高。

通常认为, 微生物经历冷冻和干燥两个过程, 菌体细胞膜的磷脂双分子层的流动性、透过性和膜蛋白都会发生一定的变化^[31-32], 这都可能增强毒性物质透过细胞膜的能力以及对微生物生长过程呼吸链脱氢酶的损害作用, 从而提高了试验菌株对毒性物质的灵敏度。郝春慧等^[33]研究发现, 利用 EDTA 提高明亮发光杆菌的通透性, 可以降低检测限, 提高 Microtox 毒性检测的灵敏度, 这与本研究结果相一致。而 Robert 等^[34]使用琼脂及凝胶在 96 孔微板中固定化 12 种基因工程发光菌, 检测 10 种对细胞有害化学物质, 检测结果与其在液体培养基中相似, 检测灵敏度无显著

性变化。

从表 7 可知, MTOXPlate 方法与采用同一原理的 MARA 测试技术相比, 灵敏度更高。MARA 采用 MTC 值表示毒性的大小, Patricia 等^[35]的研究表明 MTC 值与 EC₅₀ 值具有良好的相关性, 但是 MTC 值比 EC₅₀ 值小, 有些低于 1 个数量级以上, 因此, 将 MTOXPlate 的实验结果与 MARA 相比发现, MTOXPlate 的灵敏度明显高于 MARA。

考虑到不同属的微生物具有不同的生理特征而对不同结构化合物的敏感性存在差异^[36], 因此同时将 MTOXPlate 最敏感的物种检测 EC₅₀ 与其它方法进行比较。与大肠杆菌抑制试验相比, MTOXPlate 的灵敏度高于大肠杆菌。MTOXPlate 的检测结果与 Microtox 较相近, 尽管 MTOXPlate 对某些化合物检测的 EC₅₀ 均值有些高于 Microtox, 但是其最敏感物种普遍低于 Microtox。将 MTOXPlate 和 Microtox 的测试结果进行相关性分析, 结果显示它们之间存在显著的相关性 ($r=0.897$, $P=0.006$)。与大型溞试验和萼花臂尾轮虫试验相比, 灵敏度大致低 1-2 个数量级, 这主

要与微生物试验和动物试验灵敏度本身的差异有关。

以大型蚤、萼花臂尾轮虫等为受试对象的动物试验虽然灵敏度相对来说更高, 却存在测定周期长、工作量大、指示生物保存困难等缺点, 发光细菌法反应快速却不可避免操作繁琐的弊病。MTOXPlate 操作过程更为简单便捷, 且由于 MTOXPlate 中的敏感物种随毒物不同而异, 因而相比单一物种试验能够检测更多的毒物, 具有较宽的检测谱, 同时还可以避免单个物种试验结果的片面性, 更能真实地反映测试样品的毒性。

2.4 重现性

采用同批次制备的 MTOXPlate 冻干板对化合物乙二醇、苯酚、氯化钠、硫酸锂、硝酸钡、氯化钾、丙烯酰胺分别进行 7 次平行毒性检测, 得到单个菌株毒性测试 EC_{50} 和 11 个菌株 EC_{50} 平均值的相对标准偏差 RSD 值, 绘制散点图, 如图 3 所示, RSD 值小于 20% 表示重现性较好, 反之表明重现性差。

从图 3 可以看出, 单个菌株对化合物毒性测试的相对标准偏差基本均低于 20%, MTOXPlate 冻干板对 7 种受试化合物毒性测试的相对标准偏差分别为 2.8%、2.4%、7.4%、4.9%、3.0%、7.4%

和 11.6%, 均远远低于 20% 且大部分可低至 10%, 表明该 MTOXPlate 冻干板具有良好的重现性能, 能较好地满足污染物生物毒性测试的需要。

3 讨论

采用真空冷冻干燥法将微生物细胞固定在 96 孔板上, 较使用新鲜菌液方便, 在操作程序上大大简化, 当进行生物毒性检测时, 只需添加微生物复活介质, 并同时添加样品进行测定, 这显然比传统生物试验的受试生物连续培养更为简便快捷。这样不仅有利于该技术的标准化, 而且经过冷冻干燥处理的微生物较新鲜菌液具有更高的检测灵敏度, 具有很好的实际应用前景。目前, 发光细菌在水质毒性检测方面的应用, 常常使用冷冻干燥制剂^[13], 冻干粉因保质期长、使用方便、便于运输, 可以在环境监测领域加以推广应用。然而, 在冻干板保存过程中, 菌株的存活率会随时间而下降, 细胞活性也会相应地降低, 因此, 冻干板的保存时间对于毒性检测的灵敏度具有一定的影响, 今后的工作中, 还需进一步地研究冻干板的保存时间对毒性检测灵敏度和稳定性的影响, 从而确定 MTOXPlate 冻干板的保存期。

与基于单一菌属为指示生物的方法相比, MTOXPlate 冻干板以不同种属的 11 种微生物为指示生物, 由于不同种群的微生物因其具有不同的生理特征而对不同化合物的毒性敏感性存在一定的差异, 能够对大量的化合物具有敏感性, 具有检测毒性污染物范围广的特点, 可有效克服如发光细菌等毒性分析方法中存在的单一指示菌株的局限性, 更能预测某种或某些化学物质或生活、生产废水排入环境中可能引起的环境效应, 可为环境中污染物的监测和风险评价提供可靠的信息。通过与其他毒性测试方法的比较, 发现 MTOXPlate 的灵敏度明显高于 MARA, 并且与 Microtox 的结果存在显著的相关性($r=0.897$), 发

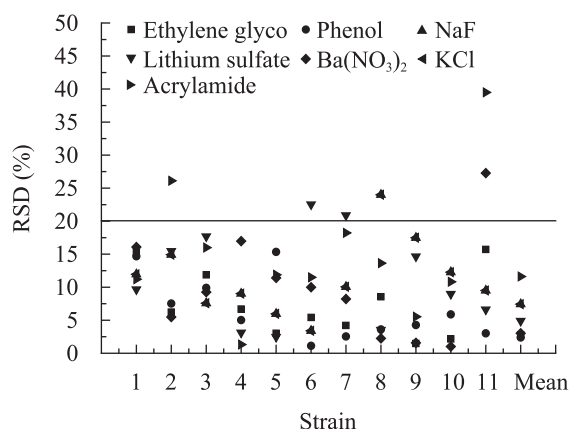


图 3 冻干板对 7 种受试化合物毒性检测的重现性
Fig. 3 Reproducibility of toxicity test for seven chemical compounds by MTOXPlate

光细菌法是目前国标推荐的水质毒性检测方法,因此, MTOXPlate 有望应用于环境监测、生态毒理检测方面。今后,还需对 MTOXPlate 冻干板在不同种类化合物和环境样品中的应用性能加以研究,从而确定该技术的使用范围,为该技术在环境监测领域的推广应用提供试验依据。

此外,与传统的生物毒性检测法相比,该 MTOXPlate 冻干板检测需要的样品量极少,并且借助于多道移液器和酶标仪等多孔道检测器,可对大量样品进行批量快速检测;高度平行化、标准化的检测条件能有效地消除样品加入和检测时间不同带来的误差。MTOXPlate 冻干板的使用大幅度降低了生物毒性检测的费用,缩短了检测时间,为实现 MTOXPlate 方法在生态毒理检测领域的推广应用奠定了良好的基础。

参考文献

- [1] Smolders R, Bervets L, Blust R. *In situ* and laboratory bioassays to evaluate the impact of effluent discharges on receiving aquatic ecosystems[J]. *Environmental Pollution*, 2004, 132(2): 231–243.
- [2] 周雯, 王连生. 水体有毒有机污染研究[J]. *中国环境监测*, 2006, 22(1): 91–95.
- [3] 冯承莲, 雷炳莉, 王子健. 中国主要河流中多环芳烃生态风险的初步评价[J]. *中国环境科学*, 2009, 29(6): 583–588.
- [4] Mekki A, Dhoub A, Feki F, et al. Assessment of toxicity of the untreated and treated olive mill wastewaters and soil irrigated by using microbiotests[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2008, 69(3): 488–495.
- [5] Somensi CA, Simionatto EL, Bertoli SL, et al. Use of ozone in a pilot-scale plant for textile wastewater pre-treatment: physico-chemical efficiency, degradation by-products identification and environmental toxicity of treated wastewater[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 175(1/3): 225–240.
- [6] Lei L, Aoyama I. Effect-directed investigation and interactive effect of organic toxicants in landfill leachates combining Microtox test with RP-HPLC fractionation and GC/MS analysis[J]. *Ecotoxicology*, 2010, 19(7): 1268–1276.
- [7] Wadhia K, Thompson KC. Low-cost ecotoxicity testing of environmental samples using microbiotests for potential implementation of the Water Framework Directive[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2007, 26(4): 300–307.
- [8] 朱丽娜, 刘瑞志, 夏建新, 等. 发光细菌法测定水质综合毒性研究进展[J]. *中央民族大学学报: 自然科学版*, 2011, 20(4): 14–20.
- [9] Campbell CG, Mascetti MM, Hoppes W, et al. Measurement reproducibility of the bioscanTM flow-through respirometer applied as a toxicity-based early warning system for water contamination[J]. *Environmental Practice*, 2007, 9(1): 42–53.
- [10] Gabrielson J, Kühn I, Colque-Navarro P, et al. Microplate-based microbial assay for risk assessment and (eco) toxic fingerprinting of chemicals[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 485(1): 121–130.
- [11] Wadhia K, Dando T, Thompson KC, et al. Intra-laboratory evaluation of microbial assay for risk assessment (MARA) for potential application in the implementation of the water framework directive (WFD)[J]. *Journal of Environmental Monitoring*, 2007, 9(9): 953–958.
- [12] 吴泳标. 一种微孔板生物毒性快速检测技术的建立[D]. 广州: 广东工业大学硕士学位论文, 2011.
- [13] 吴自荣. 发光细菌冷冻干燥制剂的制备及其在环境监测中的应用[J]. *中国环境监测*, 1993, 9(3): 20–22.
- [14] 彭方毅, 陈盛珍, 姜海蓉, 等. 发光细菌冷冻干燥条件优化研究与应用[J]. *环境污染与防治*, 2010, 32(6): 8–10.
- [15] 沈金龙, 毛爱军, 王远亮, 等. 纤维素酶在木质纤维素生物质转化中的应用研究[J]. *微生物学报*, 2004, 44(4): 507–510.
- [16] 梁鹏, 黄霞, 钱易. 利用 BacLight 染色法测定活性污泥中的活菌水平[OB/OL]. 中国科技论文在线,

- [2005-12-30]. <http://www.paper.edu.cn/index.php/default/releasepaper/content/200512-799>.
- [17] 李宝坤. 乳酸杆菌冷冻干燥生理损伤机制及保护策略的研究[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2011.
- [18] Boulos L, Prévost M, Barbeau B, et al. LIVE/DEAD® BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, 37(1): 77-86.
- [19] Rumian N, Tsvetkov TD, Angelov M. Investigation of lactobacilli strains during lyophilization[J]. *Cryobiology*, 1993, 30(5): 536-540.
- [20] Carvalho AS, Silva J, Ho P, et al. Effect of various growth media upon survival during storage of freeze-dried *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus durans*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 94(6): 947-952.
- [21] 邢蕾, 吴晖, 刘冬梅, 等. 干酪乳杆菌鼠李糖亚种冻干保护剂的研究[J]. *中国乳品工业*, 2009, 37(11): 15-17.
- [22] Gómez ZA, Tymczynszyn E, De AG, et al. Action of trehalose on the preservation of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* by heat and osmotic dehydration[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 95(6): 1315-1320.
- [23] Streeter JG. Effect of trehalose on survival of *Bradyrhizobium japonicum* during desiccation[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 95(3): 484-491.
- [24] Leslie SB, Israelie E, Lighthart B, et al. Trehulose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(10): 3592-3597.
- [25] Linders LJM, Wolkers WF, Hoekstra FA, et al. Effect of added carbohydrates on membrane phase behavior and survival of dried *Lactobacillus plantarum*[J]. *Cryobiology*, 1997, 35(1): 31-40.
- [26] Levine H, Slade L. Another view of trehalose for drying and stabilizing biological materials[J]. *Biopharm*, 1992, 5: 36-40.
- [27] 聂凌鸿, 宁正祥. 海藻糖的生物保护作用[J]. *生命的化学*, 2001, 21(3): 206-209.
- [28] 田洪涛, 张蘸, 贾英民, 等. 海藻糖在双歧杆菌冻干菌粉制备和保藏中生物保护作用的初探[J]. *河北农业大学学报*, 2000, 23(2): 62-65.
- [29] 蒲丽丽, 刘宁, 张英华, 等. 乳酸菌冻干保护剂及保护机理的研究进展[J]. *现代食品科技*, 2005, 21(1): 147-149.
- [30] Ekwall B, Barile FA, Castano A, et al. MEIC evaluation of acute systemic toxicity: part VI. The prediction of human toxicity by rodent LD₅₀ values and results from 61 *in vitro* methods[J]. *Alternatives to Laboratory Animals*, 1998, 26(Suppl2): 617-658.
- [31] 王飏, 田丰伟, 励建荣, 等. 冷冻干燥对乳酸菌细胞膜通透性的影响[J]. *微生物学通报*, 2009, 36(5): 684-688.
- [32] Castro HP, Teixeira PM, Kirby R. Evidence of membrane damage in *Lactobacillus bulgaricus* following freeze drying[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 1997, 82(1): 87-94.
- [33] 郝春慧, 石长华, 郭寅生, 等. EDTA 提高 Microtox 检测有机化合物毒性灵敏度的研究[J]. *检验检疫学刊*, 2011, 21(5): 42-48.
- [34] Mitchell RJ, Gu MB. Characterization and optimization of two methods in the immobilization of 12 bioluminescent strains[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2006, 22(2): 192-199.
- [35] Fai PB, Grant A. An assessment of the potential of the microbial assay for risk assessment (MARA) for ecotoxicological testing[J]. *Ecotoxicology*, 2010, 19(8): 1626-1633.
- [36] Delorenzo ME, Scott GI, Ross PE. Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: a review[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2001, 20(1): 84-98.