

发光细菌在水环境生物毒性检测中应用的研究进展

吴泳标^{1,2} 张国霞¹ 许玫英¹ 张家强^{1,2} 孙国萍^{1*}

(1. 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)

(2. 广东工业大学环境科学与工程学院 广东 广州 510090)

摘要: 发光细菌是一类自身含发光基因且能够发出可见光的细菌, 其分布非常广泛。由于具备了日常毒性检测所要求的快速灵敏以及再现性好的特点, 发光细菌法愈来愈受到关注, 且因其快速和低成本的特点常被用作早期预警系统。基因操作技术的介入更使得发光细菌试验具有了分辨各种毒性的功能。本文综述了发光细菌在环境毒性检测中的进展, 重点介绍了基于发光细菌的毒性试验方法, 以及在水质检测中的应用。

关键词: 发光细菌, 水体毒性, 检测

Advance in the Application of Luminescent Bacteria on Inspecting Ecotoxicity in Water

WU Yong-Biao^{1,2} ZHANG Guo-Xia¹ XU Mei-Ying¹ ZHANG Jia-Qiang^{1,2}
SUN Guo-Ping^{1*}

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

(2. *Faculty of Environmental Science and Engineering, Guangdong University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510090, China*)

Abstract: Luminescent bacteria are those ubiquitously distributed microorganisms that emit visible light due to their naturally existed light-production genes: *lux*. A bioluminescent test, which offers benefits of rapidity, sensitivity and reproducibility for routine toxicity monitoring, gained growing attention these years, and it is usually chosen as an effective tool for early warning system based on its quick response and low cost. Genetic manipulation involvement equips the bioluminescent assays using several specific responsive strains with the ability of toxicity classification. This paper reviews the latest progress in luminescent bacteria for environmental toxicity testing. Description of the luminescent bacteria assays including natural luminescent bacteria test, light-emitting genetically modified bacteria test, as well as the recent research of the utilization of the bioluminescent assay for determination of water quality are all reviewed in this article.

基金项目: 广东省科技攻关项目(No. 2007A032400003, 2008B030302043); 国家 863 科技项目(No. 2006106Z3063); 广东省基金团队项目(No. 9351007002000001); 国家水体污染控制与治理重大科技专项(No. 2008ZX07011-007, 2008ZX07011-009)

* 通讯作者: Tel: 86-20-87684471; Fax: 86-20-87684587; ✉: guopings@im.ac.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>
收稿日期: 2010-01-04; 接受日期: 2010-06-10

Keywords: Luminescent bacteria, Water toxicity, Detection

随着人类社会发展与进步, 水污染亦日趋严重, 严重威胁人类生命健康, 日渐成为世界性的环境治理难题。近年来, 研究者们提出了许多适于水体监测和评价的生物测试方法, 其中发光细菌法由于反应快速、灵敏度高、成本低廉等优点得到广泛关注。20世纪70年代末, 国外科学家从海鱼体表分离出了发光细菌, 用于检测水体的生物毒性, 现已成为一种简单、快速的生物毒性检测手段。本文综述了近年来国内外基于发光细菌的毒性检测法及其应用的研究进展。

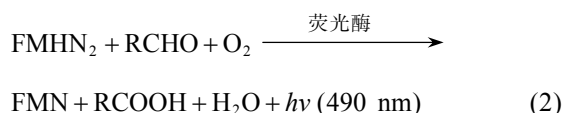
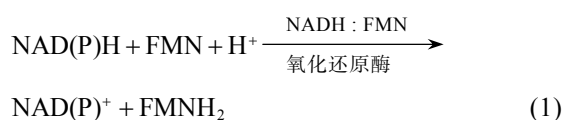
1 发光细菌

1.1 发光细菌的种类

发光细菌为革兰氏阴性, 兼性好氧化能自养型细菌。目前已发现的发光细菌分别属于 γ -变形菌纲 (*Gammaproteobacteria*) 的弧菌属 (*Vibrio*), 发光杆菌属 (*Photobacterium*), 希瓦氏菌属 (*Shewanella*) 以及致病杆菌属 (*Xenorhabdus*)^[1]。其中发光杆菌属、希瓦氏菌属以及弧菌属中的大多数发光细菌均为海洋细菌, 而霍乱弧菌 (*Vibrio cholera*) 则是少数被发现的淡水发光细菌之一。我国学者朱文杰也从青海湖中分离得到一个淡水发光细菌新种并命名为青海弧菌。

1.2 细菌发光机理

细菌发光反应主要参与的物质包括荧光酶、FMN、NAD(P)H、长链脂肪醛(RCHO)、分子氧等。在荧光酶的作用下, FMNH₂ 和 RCHO 被 O₂ 氧化, 产生的能量并不被生物体储存, 而是通过光的形式释放出来, 其反应式如下:



细菌荧光酶对于 FMNH₂ 具有高度底物专一性, 对其他黄素化合物仅有很低的活性。八碳以上的脂肪醛方可被该酶利用。

细菌生物发光基因(*lux*)可以分成 3 部分: 核心元件、附属元件以及调节元件^[1]。核心元件包括有

lux C、*D*、*A*、*B*、*E*, 其中 *luxA luxB* 分别编码荧光酶的 α (40 kD) 和 β (37 kD) 亚基, 形成的异二聚体即为具有产光能力的细菌荧光酶。而 *luxCDE* 分别编码依赖 NADPH 的醛蛋白还原酶(54 kD)、酰基转移酶(33 kD)和 ATP 合成酶(42 kD), 三者共同构成脂肪酸还原酶复合体, 产生长链脂肪醛作为发光反应的电子供体。

2 发光细菌用于毒性检测

应用发光细菌进行毒性测试可以有以下几个方面: 利用野生型发光细菌进行毒性测试, 细菌发光强度与毒性物质浓度成负相关(称为 Light-off), 以发光抑制率反映综合毒性大小, 这种方法已被广泛接受; 应用重组 DNA 技术构建重组发光细菌 (Recombinant luminescent bacteria, 以下简称 RLB), 分为组成型和诱导型两种, 其中诱导型须在特定的诱导物存在时荧光酶才得以表达, 在毒物亚致死浓度范围内, 其剂量效应关系为正相关关系(表现为 Light-on); 还有就是利用荧光酶系统进行毒性试验。

2.1 野生型发光细菌毒性试验

野生型发光细菌在接触有毒有害物质时发光会受到抑制, 于是早在 1979 年就有人提出用它来检测环境水样品的毒性。对于天然存在的发光细菌, 其发光现象是一项正常的生理代谢活动。当毒物存在时, 由于荧光酶活性受到抑制或与发光相关代谢途径受阻, 发光程度有所下降甚至完全消失。利用毒物浓度与细菌发光程度这种负相关关系, 配上灵敏的光电转换检测系统, 即可从电流强度判断环境样品的毒性大小。现在, 基于野生型发光细菌的生物毒性试验已广泛应用于各类有机的和无机污染物毒性检测。

常用于毒性测试的发光细菌主要有 *Vibrio fischeri*, *Photobacterium phosphoreum* 等海洋细菌, 因此使用时须加入 3% 的 NaCl 溶液以保证菌体正常活性。由于加入 NaCl 可能引起某些物质的毒性变化而影响测试结果, 有学者改用淡水发光细菌进行试验, 也能得到很好的结果^[2]。另外, 在检测有色样品时其色度会引起仪器的附加读数, 干扰检测结果, 需要相应的方法予以修正^[3]。

2.2 重组型发光细菌毒性试验

传统的发光细菌法只能检测综合毒性,而成分日趋复杂的城市污水和工业废水要求日常环境监测中不仅要反映水体总毒性,更要提供不同类型毒性物质的信息。于是重组发光细菌开始进入人们的视野。

lux 操纵子作为编码和调控细菌生物发光的基因,其表达的直接结果非常直观并且便于仪器检测,因此在分子生物学研究中被广泛地用作报告基因以研究基因的表达与调控。基于 *lux* 这些特点,于上世纪 90 年代就开始有学者提出构建重组发光细菌来检测环境中特定毒性物质的方法。重组发光细菌和天然发光细菌相比,对外源化学物质具有选择性,故可用以检测各种细胞损伤,或环境中某类特定化合物。近十几年,随着人们对 RLB 的关注,越来越多具有不同功能的 RLB 不断涌现。

RLB 可分为组成型和诱导型,其中诱导型又可根据启动子的类型分为应激型和化学特异型。将 *lux* 置于控制各种应激系统的启动子之后,即可构成各种应激型 RLB。它们能够对造成各种效应如遗传损伤、蛋白质损伤、氧化损伤和膜损伤的细胞毒性物质做出发光反应,从而推测会导致何种损伤,甚至可区分同种损伤的不同损伤机理,有利于用于毒性机理研究。如同样是氧化损伤应激型的 DS1(*sodA::luxCDABE*)和 DK1(*katG::luxCDABE*),DS1 只对超氧自由基产生的损伤敏感,而后者则仅对羟自由基敏感^[4],利用以上两菌株检测银纳米颗粒的毒性发现 DS1 的发光强度有明显变化,而 DK1 则没有,表明没有羟自由基的产生,推测可能产生了游离 Ag^+ 继而导致大量超氧自由基生成。Ahn^[5]等利用 7 种不同的 DNA 损伤敏感 RLB 组成一组生物传感器,可根据它们对基因毒性的特异性反应将其分为 3 组:DNA 损伤级联反应、SOS 或 DNA 修复以及烷基化导致的 DNA 损伤,因此该传感器能对不同的基因毒性作用做出反应。

某些细菌含有针对特殊化学物质的抗性基因或诱导基因,将这些基因启动子与 *lux* 融合就构成了化学特异型 RLB,能根据物质的化学结构识别不同类的物质,包括重金属^[4,6]、各种有机化合物^[7-8]等。Lee 等^[9]分析了在一个连续监测系统中 DNT5(*nagR-nagAa::luxCDABE*)对苯甲酸及其衍生物的发光反应变化。NagR 蛋白能够与水杨酸结合并

结合在 *nagAa* 区域而引起后续基因的表达。Lee 发现受试物质的化学结构在诱导 *lux* 基因表达中起着重要作用,含羧基的水杨酸和苯甲酸及其衍生物已被 NagR 蛋白识别而导致 *lux* 基因大量表达,而缺少此基团的物质如苯、酚和萘却不能引起任何发光现象。TBT3 是株对有机锡化合物中的三丁基锡(TBT)和二丁基锡(DBT)敏感的 RLB,而对其它有机锡或别的金属有机物无发光反应^[10]。Gueuné^[11]等利用 TBT3 的这个特点设计了仪器对船壳漆中的有机锡含量进行监控,在 3 h 之内即可得到反馈。

3 发光细菌法在水质监测与评价中的应用

近年来,应用发光细菌法在水质评价方面,包括对工业废水、生活污水、地表地下水和饮用水等方面都取得了较大的进展^[12],还出现了不少生物发光传感器和相关试剂盒。

在废水方面,最常见的是直接应用到各类废水以获得毒性数据,研究某些处理过程中的毒性变化等。王宾香等^[13]采用了 Microtox 技术监测柠檬酸杆菌降解印染废水中蒽醌染料和偶氮染料的过程中蒽醌染料和偶氮染料及其降解产物的生物毒性反应。在发光细菌对活性污泥法系统中的 104 种化合物毒性数据的基础上,Katritzky^[14]等用多重线性回归建立了一组持久性有机污染物与其浓度的定量构效关系。Mekki 等^[15]分别用 LUMISTox 技术以及细菌生长抑制试验评价未处理的和处理后的橄榄油磨坊废水,通过比较 *V. fischeri* 的发光抑制率 I 及 *B. megaterium*, *P. fluorescens* 和 *E. coli* 的生长抑制率,证明了比起生长抑制试验,LUMISTox 是一种较为灵敏的、具有更广底物谱的毒性试验。Somensi^[16]用发光细菌监测表明,原印染废水的毒性要高于经臭氧处理过的印染废水。

以上所述的研究多是用 *V. fischeri* 等野生型海洋细菌,大多生活在天然低毒或无毒环境中,对浓度高、成分复杂的废水耐受性差,容易失活甚至死亡。基于废水有机负荷高,对受试生物灵敏度的要求,用基因工程技术构建高耐受性 RLB 成为一种水质检测的新手段。Shk1 就是这样一株 RLB,其受细菌为一株从活性污泥中分离得到的细菌(后来证明为 *Pseudomonas fluorescens*)。Ren^[17]比较了 Shk1 和 *V. fischeri* 在 7 种重金属和 25 种废水中常见有机物

作用下的发光反应,发现对于这些物质 Shk1 比 *V. fischeri* 灵敏度要低,更接近于用污泥呼吸计量法所测得的结果,表明在生理毒理特性方面 Shk1 比起 *V. fischeri* 更能代表活性污泥中的微生物,给人们研究废水对活性污泥的毒性提供了很好的工具。

地表水和地下水中的毒物浓度通常较低,需要较为灵敏的试验,故分离新的淡水发光细菌用基因技术构造新菌将是发展趋势。Trang^[18]构造了亚砷酸盐敏感的 RLB——*E. coli* DH5 α (pJAMA-arsR),然后用 *E. coli* DH5 α 和原子吸收光谱法(AAS)分别分析采自红河和湄公河三角洲地区的 194 个地下水水样的 As 含量,比较结果发现生物发光灵敏度达到 7 $\mu\text{g As/L}$ (WHO 规定的地下水 As 检出限为 10 $\mu\text{g/L}$),且光信号与 As 浓度在 10–100 $\mu\text{g As/L}$ 的范围内有很好的线性相关性($r^2 = 0.997$)。Eltzov^[19]将 RLB 固定在光纤上制成水中毒性污染物在线监测仪,用以检测自来水和地表水中的遗传毒性物质,对前者的监测试验证明其连续工作时间可以达 24 h,不过在后者试验时出现菌株功能缺失的现象。

此外,发光细菌法在饮用水评价方面也有应用。Haddix 等^[20]介绍了一种全新的利用生物发光法检测饮用水 AOC 的方法,通过将 *lux* 整合到饮用水 AOC 标准测试菌 *P. fluorescens* P-17 和 *Spirillum* NOX 的染色体上,经筛选获得两株能在 AOC 试验平板上生长的发光菌 P-17 I5 和 NOX I3。事实证明,基于生物发光的 AOC 试验与传统的 van der Kooij 菌落计数法所得结果非常吻合,而菌落计数要 8 天以上,生物发光法 2 至 3 d 便可得到结果,所花费的时间更短,便于监测。

现市场上已出现了多种发光细菌相关的检测技术与试剂盒产品。Microtox 是现今使用最为广泛的用于水质毒性检测的生物检测技术之一。Microtox 利用 *V. fischeri* 作为受试生物,制成冻干粉保存于 -20°C ,使用前复苏,整个试验过程只需要 30 min,十分方便快捷。Mutatox 是自 Microtox 面世后又一商业化产品,它利用从环境中分离得到的一株 *V. fischeri* 暗变种 M169,在碱基置换剂、移码剂等物质的作用下发生回复突变恢复发光能力而达到检测环境样品中基因毒性的目的。而由 CheckLight 开发的 ToxScreen 使用了两种不同的前处理缓冲液,增强受试菌对毒物的灵敏性,使其能有效地对水中的重金属阳离子、PAHs 和卤代烃等做出反应。

近年来,生物传感器对于连续监测了解水质变化具有重要作用,因此生物发光传感器的构建也是研究热门之一^[21]。Gu 等最先建立了一个两步迷你生物传感器,其中第 1 个反应区实现细胞增殖并不断补充给第 2 反应区,第 2 个反应区将试样与新鲜的细胞培养物充分混合并完成毒性测定,事实证明此反应器足以胜任长期的实时毒性监测。将 RLB 引进到此反应系统中并发展为多室反应器,系统便具有毒性分类的功能。在此基础上, Lee 等将整个反应系统微型化,在圆柱体的四道反应器里,每道配备一种压力敏感型 RLB (分别是 EBHJ2、DP1、DK1 及 DPD2794,其中 EBHJ2 和 DP1 对超氧化物敏感,DK1 对过氧化氢敏感,DPD2794 对 DNA 损伤敏感),里面的两个反应室分列于垂直方向上,分别只有 1 mL 和 2 mL 的容量,该传感器体积更小反应更快,易于现场测试应用和操作^[22–23]。Cho^[24]等建立了一个作为生物预警系统的全自动工作站,该系统采用由比 *V. fischeri* 更为灵敏的 RLB *Janthinobacterium lividum* YH9-RC,并将其冻干在 384 孔板小孔中,再配上生物发光测定仪以及监测软件两部分即组成整个工作系统。用连续的苯酚溶液和废水测试时发现,细菌暴露于水样后发光强度急速下降,1 min 就降到仪器可检测范围以下。该系统配备了 12 块 384 孔板,连续运行能力良好,若设定测试时间间隔为十分钟则可以满足一个月全自动运行的要求。

4 展望

发光细菌法用于环境样品毒性试验已有多年历史。实践证明它是环境毒性检测的一种有效的方法。不过,作为一种原核生物试验方法,由于原核生物自身特点也不可避免的含有一些缺陷,比如原核细胞对毒性物质的耐受性较真核细胞高,某些化合物表现毒性须经过真核生物体内复杂的代谢活化,而原核生物则缺少这些代谢系统。尽管这样也丝毫不影响发光细菌在环境预警系统中的作用,其快速反应的特点足以保证第一时间获取环境的信息,为进一步的高级动物毒性试验和化学分析提供依据。而基因操作技术的引入,更是大大拓宽了发光细菌法的应用范围与灵活性,各种类型的生物发光传感器也不断涌现。此外,荧光酶的应用是发光细菌法的一个新的发展领域。由于缺少了细胞膜的保护作用,荧光酶直接感受外界冲击,使得体外发光酶系统具

有更高的灵敏性。将荧光酶与 NADH:FMN 氧化还原酶耦合其他酶促反应组成新的发光体系^[25], 成为一种新的研究方法。随着科学研究技术的不断进步, 发光细菌法在不久的将来将有更广泛的发展。

目前, 研究人员和检测单位使用的还多数是较早期而成熟的产品, 如 Microtox。如果能改进发光细菌的适应性、重组发光菌的稳定性、活化保存技术和菌体的固定化技术等问题, 基于发光细菌的应用产品将大量出现。

参 考 文 献

- [1] Dunlap PV, Tsukamoto KK. Luminous Bacteria. *Prokaryotes*, 2006(2): 863–892.
- [2] 熊蔚蔚, 吴淑杭, 徐亚同, 等. 毒性配比法研究铜、铬和铅对淡水发光细菌的联合毒性. *生态环境*, 2007, **16**(4): 1085–1087.
- [3] 瞿臻琰, 王广鹤, 卢湘岳. 发光细菌法中用发光二极管修正色度干扰的研究. *环境科学与技术*, 2009, **32**(2): 102–105.
- [4] Hwang ET, Lee JH, Chae YJ, *et al.* Analysis of the toxic mode of action of silver nanoparticles using stress-specific bioluminescent bacteria. *Small*, 2008, **4**(6): 746–750.
- [5] Ahn JM, Hwang ET, Youn CH. Prediction and classification of the modes of genotoxic actions using bacterial biosensors specific for DNA damages. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, **25**(4): 767–772.
- [6] Golding GR, Kelly CA, Sparling R, *et al.* Evaluation of mercury toxicity as a predictor of mercury bioavailability. *Environ Sci Technol*, 2007, **41**(16): 5685–5692.
- [7] Li YF, Li FY, Ho CL, *et al.* Construction and comparison of fluorescence and bioluminescence bacterial biosensors for the detection of bioavailable toluene and related compounds. *Environmental Pollution*, 2008, **52**(1): 123–129.
- [8] Leedj  r  v A, Ivask A, Virta M, *et al.* Analysis of bioavailable phenols from natural samples by recombinant luminescent bacterial sensors. *Chemosphere*, 2006, **64**(11): 1910–1919.
- [9] Lee JH, Mitchell RJ, Gu MB. Chemical-specific continuous biomonitoring using a recombinant bioluminescent bacterium DNT5 (nagR-nagAa::luxCDABE). *Journal of Biotechnology*, 2007, **131**(3): 330–334.
- [10] Gueun   H, Durand MJ, Thouand G, *et al.* The *ygaVP* genes of *Escherichia coli* form a tributyltin-inducible operon. *Appl Environ Microbiol*, 2008, **74**(6): 1954–1958.
- [11] Gueun   H, Thouand G, Durand MJ, *et al.* A new bioassay for the inspection and identification of TBT-containing antifouling paint. *Marine Pollution Bulletin*, 2009, **58**(11): 1734–1738.
- [12] Girotti S, Ferri EN, Fumo MG, *et al.* Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria. *Analytica Chimica Acta*, 2008, **608**(1): 2–29.
- [13] 王宾香, 王慧, 郑天凌. Microtox 技术在印染废水污染监测中的应用研究. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2008, **47**(6): 869–873.
- [14] Katritzky AR, Kasemets K, Slavov S, *et al.* Estimating the toxicities of organic chemicals in activated sludge process. *Water Research*, 2010, doi:10.1016/j.watres.2010.01.009.
- [15] Mekki A, Dhoubi A, Feki F, *et al.* Assessment of toxicity of the untreated and treated olive mill wastewaters and soil irrigated by using microbiotests. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2008, **69**(3): 488–495.
- [16] 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. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, **175**(1/3): 235–240.
- [17] Ren S, Frymier PD. Toxicity of metals and organic chemicals evaluated with bioluminescence assays. *Chemosphere*, 2005, **58**(5): 543–550.
- [18] Trang PTK, Berg M, Viet PH, *et al.* Bacterial bioassay for rapid and accurate analysis of arsenic in highly variable groundwater samples. *Environ Sci Technol*, 2005, **39**(19): 7625–7630.
- [19] Eltzov E, Marks RS, Voost S, *et al.* Flow-through real time bacterial biosensor for toxic compounds in water. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2009, **142**(1): 11–18.
- [20] Haddix PL, Shaw NJ, LeChevallier MW. Characterization of bioluminescent derivatives of assimilable organic carbon test bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**(2): 850–854.
- [21] Farr   M, Barcel   D. Biosensors for aquatic toxicology evaluation. *Handbook of Environmental Chemistry*, 2009(5J): 115–160.
- [22] Lee JH, Gu MB. An integrated mini biosensor system for continuous water toxicity monitoring. *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, **20**(9): 1744–1749.
- [23] Lee JH, Youn CH, Kim BC, *et al.* An oxidative stress-specific bacterial cell array chip for toxicity analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, **22**(9/10): 2223–2229.
- [24] Cho J, Park K, Ihm HS, *et al.* A novel continuous toxicity test system using a luminously modified freshwater bacterium. *Biosensors and Bioelectronics*, 2004, **20**(2): 338–344.
- [25] Vetrova E, Esimbekova E, Rimmel N, *et al.* A bioluminescent signal system: detection of chemical toxicants in water. *Luminescence*, 2007, **22**(3): 206–214.