

发光细菌的生理特性及其在环境监测中的应用*

黄 正 王家玲

(同济医科大学环境医学研究所, 武汉 430030)

摘要 就发光细菌的生理特性、发光细菌毒性试验在环境监测中的应用及该技术的新进展 3 个方面进行了较为全面的概述; 评价了发光细菌毒性试验的特点, 提出了该技术今后的发展方向; 可以预见它将成为环境监测的重要手段。

关键词 发光细菌, 发光细菌毒性试验, 环境监测。

随着现代工业的不断发展, 当今世界面临日益严重的环境问题。数量、种类日益增多的环境污染物质迫切需要进行毒性鉴定, 而传统的分析手段已难以对此作出迅速、有效、全面的回答。因此发展新的快速、准确评价各类污染物毒性的有效方法显得非常迫切、必要。在急性毒性分析方面, 新的检测手段在不断建立, 其指示生物包括细菌^[1]、藻类^[2]、底栖软体动物^[3]、浮游生物^[4]和鱼^[5]等, 其中发光细菌因其独特的生理特性、与现代光电检测手段完美匹配的特点而备受关注, 由此而发展起来的发光

细菌毒性测试 (Luminescent bacteria toxicity test, L. B. T) 技术^[6]引人注目。本文综述了目前对发光细菌生理特性的认识, 介绍了 L. B. T 技术的特点及其在世界范围内的应用。并对今后的发展作了展望。

1 发光细菌的生理特性

1.1 发光细菌的分类

目前普遍采用的是美国学者 P. Baumann 的分类方法^[7-9], 见表 1。

发光细菌属革兰氏阴性、兼性厌氧菌, 大

表 1 发光细菌的分类

属	DNA 的 G+C(%)	栖息地	发光细菌名称
弧菌属 <i>Vibrio</i>	45—48	海洋	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i> 美丽弧菌 I 型 <i>V. splendidus</i> 1 费氏弧菌 <i>V. fischeri</i> 火神弧菌 <i>V. logei</i> 霍氏弧菌易北变种 <i>V. cholerae</i> var <i>albenis</i>
发光杆菌属 <i>Photobacterium</i>	39—44	非海洋 海洋	明亮发光杆菌 <i>P. phosphoreum</i> 鲷鱼发光杆菌 <i>P. leiognathi</i> 曼达帕姆发光杆菌 <i>P. mandapamensis</i>
异短杆菌属 <i>Xenorhabdus</i>	43—44	非海洋	发光异短杆菌 <i>X. luminescens</i>

小约 0.4—1.0×1.0—2.5 μm。无孢子、荚膜, 有端生鞭毛一根或数根, 最适温度 20—30℃, pH6—9, NaCl 浓度 3%, 0.3% 的甘油对发光反应很有利。

在 L. B. T 技术中应用较多的是明亮发光杆

菌和鲷鱼发光杆菌。

1.2 发光细菌的发光反应模式

* 国家自然科学基金项目
收稿日期: 1994-10-29

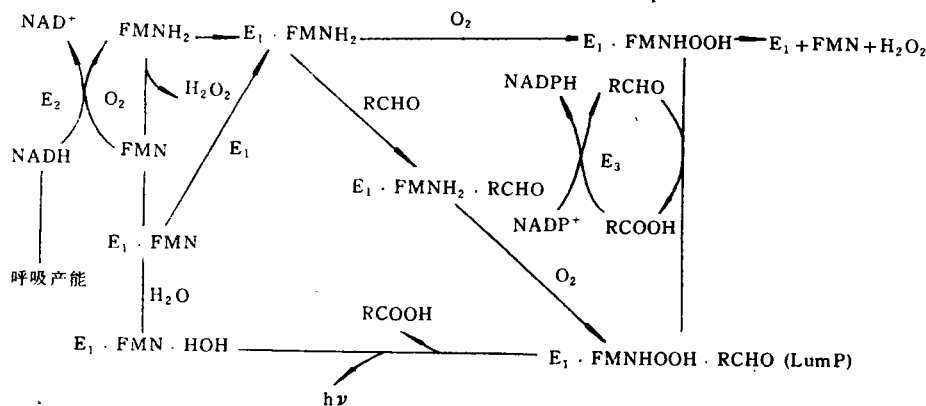


图 1 发光细菌的发光反应途径

Hasting 等^[70-12]提出发光细菌细胞内的发光反应模式如图 1。

E₁: 细菌荧光素酶, 由 α 、 β 2 个亚基组成, α 为 40000—42000 D, β 为 37000—39000 D。单独 α 、 β 亚基均无发光活性, 只有 α 、 β 共存时才有活性。

E₂: NADH: FMN 氧化还原酶, 分子量为 3000 D, 对 FMN 有高度特异性。

E₃: 脂肪酸还原酶。化学反应释放出足够的自由能时,可使反应的最后产物进入激发态,并释放出光子。图 1 中的 LumP(即 Lumazine Protein, 2, 4-二氧四氢蝶啶蛋白,因含 Lumazine 的衍生物,即 6,7-二甲基-8-核糖醇基-2,4-二氧四氢蝶啶而得名)即为光子的发射者,对其分子特征已有多方面的研究^[13-14]。

1.3 光谱特征及发光调控

发光细菌的光谱范围约 420—670 nm, $\lambda_{\max}$ 在 475—485 nm 左右, 为单一发射峰, $\lambda_{\max}$ 和半高宽有种属差异。

发光细菌生长初期发光很弱,对数生长期发光强度达到高峰,稳定期时发光强度下降。研究发现细菌细胞合成的“自诱导物”(autoinducer)在对数中期大量积累导致发光迅速增强^[15]。

近来对细菌发光的调控研究已深入到基因水平。通过基因定位^[16-17]、基因分析^[18-19]、基因产物鉴定^[20]、缺失突变^[21]、基因转导^[22]等方面的研究发现细菌发光现象是细胞内的发光基

因(luxgene)及其操纵子表达与调控的结果。已知的操纵子有 2 个。即 Operon L 和 Operon R, 它们从中间调节区开始向 2 个方面转录。L 操纵子含 lux R 基因, 编码一种调节蛋白。R 操纵子含 lux I、C、D、A、B、E 等基因, lux I 编码合成“自诱导物”的酶类, lux A、B 编码细菌荧光素酶的 α 、 β 亚基, lux C、D、E 编码脂肪酸还原酶。L 操纵子在转录水平受 cAMP、CRP (cAMP 受体蛋白) 的正反馈调节^[22], 在转录及翻译水平又受“自诱导物”、lux R 基因产物、lux I 基因产物的负反馈调节^[23]。

2 L. B. T 技术在环境监测中的应用

2.1 L. B. T 技术的原理和特点

发光细菌的发光现象是其正常的代谢活动，在一定实验条件下发光强度是恒定的。与外来受试物(无机、有机毒物、抑菌、杀菌物等)接触后，其发光强度即有所改变，变化的大小与受试物的浓度呈相关关系，同时与该物质的毒性大小有关。

Thomulk^[24]认为外来受试物通过下面 2 个途径抑制细菌发光: 直接抑制参与发光反应的酶类活性; 抑制细胞内与发光反应有关的代谢过程(如细胞呼吸等)。

目前主要用细菌冻干粉或菌悬液接触受试样品,发光强度的变化在由光电倍增管及放大器组成的测试仪上记录下来,自从 80 年代初美国 Beckman 公司推出功能完备的生物发光光度计

“Microtox”以后,这一急性毒性测试技术在世界范围内迅速推广,因此人们也将 L. B. T 技术称为 Microtox 技术,它具有如下特点:

(1) 应用范围广 对空气^[25]、土壤^[26]、水^[27]样品均可进行分析。

(2) 灵敏度高 Greene 对 10 种毒物比较分析后指出, Microtox 技术比刃天青还原试验(re-sazurin reduction test)和溶解氧消耗试验(dissolved oxygen depletion test)更为灵敏、可靠^[28]。

(3) 相关性好 L. B. T 试验的结果与传统的鱼类毒性试验有良好的相关性^[29]。

(4) 反应速度快 一般可在 15 min 内得出结果。

(5) 自动化程度高 人为错误少,现在的 Microtox 测定仪均配有计算机处理系统,可将毒物测定程序设定,结果计算、作图等一次完成,避免了许多生物毒性试验中人为主观判定的偏差。

2.2 L. B. T 技术在环境监测中的应用

(1) 空气 吴自荣等^[25]利用 L. B. T 技术快速分析大气污染,发现汽车尾气、香烟烟雾、氨气等对细菌发光有不同程度的抑制作用,时间效应、剂量效应明显。

(2) 土壤 Winger 等^[26]对美国乔治亚州氯碱厂污染土壤进行 L. B. T 技术分析,发现其中主要毒性来自甲基汞和多氯联苯。

(3) 水 顾宗谦^[27]的研究表明随着离排污口距离的不断增加,津杭运河水中污染物毒性相应下降,细菌发光随之恢复。Thomulk 等^[24]对水源中 20 余种化合物进行毒性分析,表明明亮发光杆菌是水中低浓度有机毒物的有效指示生物。

2.3 L. B. T 技术在环境评价方面的应用

目前 L. B. T 技术作为一种新的分析手段正越来越多地应用于环境质量评价之中。Robert 等^[30]对美国威斯康星州福克斯河流域的调查分析表明该地区土壤及底泥中主要毒物为 Cu、Zn、氨等。Dutka 等^[31]应用 L. B. T 技术对加拿大 Saint John 河流域 38 个区段进行了调查,指出了重点污染区域。

2.4 L. B. T 技术在其他毒物监测中的应用

L. B. T 技术除了在空气、土壤、水的监测中发挥越来越重要的作用外,还被用于其他污染物的分析。Yates 等^[32]对黄曲霉毒素 B₁、桔霉素等 8 种霉菌毒素进行了 L. B. T 分析,结果发现 8 种毒素的毒性次序与哺乳动物细胞毒性试验结果一致。Mantel 等^[33]应用⁶⁰Co 及 X 射线照射明亮发光杆菌,发现细菌发光强度随照射时间的延长、照射强度的增加而下降,提出将发光细菌作为一种衡量放射生物效应的指标生物。

3 L. B. T 技术发展的新动向

3.1 L. B. T 技术与其他分析技术联合应用

为了全面对污染物的各类毒性进行分析, L. B. T 技术正与其他生物测试手段及化学分析方法结合起来。Calleja 等^[34]将 L. B. T 技术与其他 5 种生物毒性试验法结合起来评价 50 种优先污染物的毒性。黄正等^[35]将 L. B. T 技术与 Ames 致突变试验、色谱/质谱分析方法结合起来,分析了武汉市工业废水的急性毒性、遗传毒性和主要毒物。

3.2 L. B. T 技术应用于遗传毒性检测

L. B. T 技术除了应用于上述各类污染物的急性毒性分析外,对发光细菌进行特殊处理后, L. B. T 技术还发展了检测污染物遗传毒性的功能。原理是发光细菌经过各种理化方法诱变处理后失去发光的能力,称为暗变异株(K. variant)。在接触致突变物后,暗变异株可恢复一定强度的发光能力(通常可使暗变异株的发光强度增加 1000 倍左右)。这是由于致突变物使调节基因突变,不能产生或产生无活性的抑制物质,也可能由于 DNA 双链构象改变,使抑制物不能与之结合而失去抑制效应^[36]。利用暗变异株恢复发光的现象,可对各种遗传毒物进行筛选、检测,此法与其他微生物学方法(如 Ames 试验)相比有灵敏、简便、快速、无须严格无菌操作等特点。

Levi^[37]和 Steinberg^[38]分别利用鳟鱼发光杆菌的暗变异株 SD-18 和 RC-93 对 16 种胍类化合物及 19 种抗肿瘤药物进行了遗传毒性检测,

得到了满意的结果。Ulitzur^[39]利用费氏弧菌的暗变异株 Pf-13 对 20 种化合物进行了遗传毒性分析,证实这一方法有很高的灵敏度,与 Ames 试验结果吻合^[40]。

3.3 L. B. T 技术未来的发展方向

尽管 L. B. T 技术已在各种污染物的急性毒性、遗传毒性检测中发挥了巨大的作用,人们仍在不断发掘它的潜在功能。最新的研究^[41]表明在由特殊成分组成的培养液中,发光细菌的发光强度可在相当长时间内(24 h)保持相对稳定,在此期间内细菌细胞已增殖一代以上,因此可用于污染物的慢性毒性分析,这一方法已很好地区分了苯酚和铬离子的急性毒性和慢性毒性。因此将来 L. B. T 技术将发展成为一种可同时分析污染物急性毒性、慢性毒性和遗传毒性的多功能检测手段。

为了使 L. B. T 技术更加灵活、方便地用于现场分析检测,将 L. B. T 技术与新的光电子技术(如光纤技术、传感器技术)相结合也是未来的发展方向之一,我国的科研工作者正在为此而努力。

总之,L. B. T 技术建立至今不过十几年,但其发展十分迅速。由于其独特的优点,世界各国正逐步将其列为环境监测的标准方法,相信这一技术在我国的环境保护事业将发挥越来越大的作用。

参考文献

- Liu D Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1981, 26:1451
- Van D et al. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1977, 17, 662
- Wong P T et al. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1979, 23:487
- Honig R A et al. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1980, 25, 169
- Sastry K V et al. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1979, 22:38
- Bulich A A et al. J. Biolumin Chemilumin. 1990, 5:71
- Bauman P et al. Curr. Microbio. 1980, 4:127
- Bauman P et al. Ann. Rev. Microbio. 1977, 31:39
- Bauman P et al. Ann. Rev. Microbio. 1983, 37:369
- Frank M R et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1989, 164:1137
- Nealson K H et al. Microbiol. Rev. 1979, 43:496
- Hasting J W et al. Ann. Rev Microbio. 1977, 31:549
- Lee J et al. Biochemistry. 1985, 24:1476
- Lee J et al. Photochem. Photobiol. 1982, 36:689
- Kaplan H B et al. J. Bacteriol. 1985, 163:1210
- Edward F D. Gene. 1987, 54:203
- Joanne E et al. Nucl. Acids. Res. 1987, 15:10455
- Sylvie G et al. J. Bacteriol. 1989, 170:5601
- David R F et al. Nucl. Acids. Res. 1988, 16:777
- Joanne E et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1984, 81:4154
- Paul V D. J. Bacteriol. 1989, 171:1199
- Paul V D et al. J. Bacteriol. 1985, 164:45
- Paul V D. J. Bacteriol. 1989, 171:3549
- Thomulk K W et al. Bull. Environ. Contam. toxicol. 1993, 51:538
- 吴自荣. 中国环境科学. 1988, 8(1): 59
- Winger P V et al. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 1993, 25:371
- 顾宗廉. 环境科学. 1983, 4(5):30
- Greene J C. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 1985, 14: 659
- Mcfters G A. Water Res. 1983, 17(12): 1757
- Robert A H et al. Ecotoxicol. Environ. Saf. 1992, 23: 343
- Dutka D J et al. Water Res. 1988, 22(4): 503
- Yates L E et al. Appl. Environ. Microbio. 1982, 44(5): 1072
- Mantel J et al. Phys. Med. Biol. 1983, 28(5): 599
- Calleja M C et al. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 1994, 26:69
- 黄正. 环境科学. 1994, 15(6): 71-71
- Ulitzur S et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1981, 78:3338
- Levi B Z et al. Mutation Res. 1986, 173:233
- Steinberg D et al. J. Antibiotics. 1985, X X X V ■:1401
- Ulitzur S et al. J. Biolumin. Chemilumin. 1988, 2:95
- Ulitzur S. Methods Enzymol. 1986, 133:264
- Zieseniss K et al. J. Biolumin. Chemilumin. 1994, 9:299

With the rapid development of economy, surface and ground waters in Beijing area have been polluted much more seriously in recent years, causing the situation of shortage in water resources to be steadily deteriorated and the sustainable development of economy in Beijing to be restricted greatly. Based on the socio-economic conditions and water environment in 1991 in Beijing, direct sewage discharge coefficient, complete sewage discharge coefficient, direct COD discharge coefficient and complete COD discharge coefficient were used to comprehensively analyse the current status of sewage discharge from Beijing. Appropriate measures have been suggested for improving the water environment condition.

Key words: sewage discharge coefficient, COD coefficient, water pollution, water diversion.

Direct Thermochemical Liquefaction Technology for Treatment of Municipal Sewage Sludge. He Pinjing et al. (School of Environ. Eng., Tongji Univ., Shanghai 200092); *Chin. J. Environ. Sci.*, **16**(3), 1995, pp. 75–78

The direct thermochemical liquefaction technology developed in the 1980s was used in the treatment of sewage sludge and resource recovery. Over 40% of organic matter in sewage sludge were converted into a fuel oil with a caloric power of ≥ 33 MJ/kg while TOC being converted at a rate of up to about 90%. The whole process was found to be a net energy exporting process. A review was also given on the development, current status and prospect of this process.

Key words: sludge treatment, direct thermochemical liquefaction, conversion of sludge to fuel oil.

Nonlinear Theory in Environmental Sciences and It's Implication. Ye Changming (Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085); *Chin. J. Environ. Sci.*, **16**(3), 1995, pp. 79–82

A nonlinear theory in environmental science was suggested with an integrated analysis and theoretical judgement based on previous work. The implication of nonlinear theory for environmental

scientific research and pollution control was discussed by taking several examples.

Key words: multimedia environment, nonlinear theory, interface effect, pollution control.

Mechanism of Wastewater Treatment in Constructed Wetlands. Wu Xiaolei (Dept. of Environ. Eng., Tsinghua Univ., Beijing 100084);

Chin. J. Environ. Sci., **16**(3), 1995, pp. 83–86

A detailed investigation was made on the configuration and mechanism of constructed wetlands. It was concluded that the high efficiencies of removing nitrogen, phosphorus and organics are mainly due to the synchronization of physical, chemical and biological processes, and due to the alteration of aerobic, anoxic and anaerobic conditions. For municipal wastewater containing less COD, BOD₅ and COD removal rates are greater than 80%, and BOD₅ in effluent is around 10 mg/L. The removal rates of total nitrogen and total phosphorus are greater than 60% and 90%.

Key words: constructed wetlands, wastewater treatment, organics, nitrogen removal, phosphorus removal.

Physiological Properties of Luminescent Bacteria and Its Application in Environmental Monitoring.

Huang Zheng and Wang Jialing (Institute of Environmental Medicine, Tongji Medical Univ., Wuhan 430030); *Chin. J. Environ. Sci.*, **16**(3), 1995, pp. 87–90

A review was made on the following three respects: the physiological properties of luminescent bacteria, the utilization of luminescent bacteria toxicity test (L. B. T test) in environmental monitoring and the new progress of this technique. The advantages of L. B. T test were evaluated and its trends of future were suggested. It was predicated that L. B. T test would become an important method in environmental monitoring.

Key words: luminescent bacteria, toxicity test, environmental monitoring.