

发光菌生物毒性测试方法的改进

林志芬, 于红霞, 许士奋, 王连生* (南京大学环境学院国家污染控制与资源化重点实验室, 南京 210093)

摘要: 针对发光菌发光强度本底差异较大, 检测期间发光变化幅度宽的问题, 在传统发光菌生物毒性测试实验中, 引入校正因子 ($P_{\text{丙酮}}^I$), 研究了磁力搅拌时间、培养时间、培养代数和培养温度等条件对 EC_{50} 测定值的影响。结果表明改进后的方法实验重现性好, 相对标准偏差 (RSD) 在 2.1 % ~ 13.1 % 之间。发光菌生物毒性测试方法的改进, 为获得可靠的毒性实验数据, 进行多组分有机化合物定量结构-活性相关 (QSARs) 的研究奠定了一定的实验基础。

关键词: 发光菌; 生物毒性测试方法; 校正因子; 实验重复性

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2001)02-04-0114

Modification of the *Photobacterium phosphoreum* Toxicity Test Method

Lin Zhifen, Yu Hongxia, Xu Shifen, Wang Liansheng* (State Key Laboratory of Pollution Control and Resources Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: In order to reduce the variation of *Photobacterium phosphoreum* luminous intensity during testing, the *Photobacterium phosphoreum* toxicity test was modified by a correction factor, P_{acetone}^I , in this paper. The effects of magnetic stirring time, culture time, culture generation and culture temperature on the measured results were discussed. The modified method had good laboratory repeatability and the relative standard deviation (RSD) was between 2.1 % and 13.1 %. Reliable data could be obtained using the modified method. It would be beneficial to the development of the quantitative structure-activity relationships on multicomponent organic compounds.

Key words: *Photobacterium phosphoreum*; toxicity test; correction factor; laboratory repeatability

采用现代光电检测手段(生物发光光度计)的发光菌生物毒性实验是毒理学中生物测定的方法之一。该方法快速、简便、灵敏、廉价, 在有毒物质的筛选、环境污染生物学评价等方面有重要的意义, 因而备受各国有关研究者的关注。但该方法存在细胞发光强度本底差异大, 检测期间发光变化幅度宽等问题^[1], 实验重现性大约在 $\pm 13\% \sim \pm 26\%$ 之间^[2]。Dukta B J 等^[3]采用 MICROTOX 仪法测定五氯酚钠, 30 个平行样 15 min 读数的 EC_{50} 值范围在 $0.28 \sim 0.43 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 由此他也认为明亮发光杆菌毒性实验再现性欠佳。这就使得以单一化合物实验结果为基础的联合毒性实验更加难以重复。为了提高实验重现性, 本文引入校正因子 $P_{\text{丙酮}}^I$, 研究了磁力搅拌时间、培养时间、培养代数和培养温度等条件对发光菌生物毒性实验的影响。

1 实验部分

1.1 仪器

DXY-2 型生物毒性测试仪(中国科学院南京土壤研究所制), 恒温震荡器, 恒温搅拌器, 灭菌设备及常规玻璃仪器。

1.2 试剂

苯、氯苯、对二氯苯、1,2,3-三氯苯均为分析纯, 使用时用 3 % 氯化钠溶液配制。

1.3 菌种的培养

明亮发光杆菌 (*Photobacterium phosphoreum*), 购自中科院南京土壤所微生物室。

培养基配方和菌种培养方法见文献^[4]。

1.4 发光菌半数有效浓度 EC_{50} 的测定^[5]

基金项目: 国家自然科学基金 (29837180; 29977008); 博士点基金; 重点大学基金和日本科学振兴会资助项目

作者简介: 林志芬 (1972 ~), 女, 博士研究生, 主要从事多组分有机化合物定量结构-活性相关 (QSARs) 研究。

收稿日期: 2000-06-07

* 通信联系人

将待测化合物配成 5 个浓度梯度,各取 1.5 ml 加入具塞磨口比色管(ϕ 1.2 cm, h 5 cm),以 1.5 ml 3 % NaCl 溶液作为空白对比,同时以加有 0.020 ml 丙酮的 1.5 ml 3 % NaCl 溶液的比色管作为校正因子管,将培养好的 2 ml 菌液用适量 3 % NaCl 溶液稀释(控制空白对比管发光强度读数 700 ~ 800),磁力搅拌均匀后,取 0.5 ml 于各比色管中,加塞上下振荡 10 次,去塞,15 min 时用生物毒性测试仪测定发光强度。

样品管与对比管发光度的比值即为相对发光率,将化合物浓度对数和相对发光率线性回归,用直线内插法求出相对发光率为 50 %时所对应的化合物浓度,即为 EC_{50}^I 。同时,校正因子管与对比管发光强度的比值即为校正相对发光率($P_{丙酮}^I$),将化合物的 EC_{50}^I 与其对应的 $P_{丙酮}^I$ 线性回归,用直线内插法求出 $P_{丙酮}^I$ 为 50 % 时化合物浓度,即为 EC_{50} 。

所有数据均用 SPSS 8.0 软件处理。

2 结果与讨论

传统实验采用 T_3 菌种,培养时间为 12 h(指数生长期中期),实验温度控制 15 $^{\circ}C$ ~ 25 $^{\circ}C$ 。本实验则研究了不同磁力搅拌时间,不同培养温度,不同培养时间,不同培养代数发光菌对苯,氯苯,对二氯苯,1,2,3-三氯苯的 EC_{50} 测定值的影响。

2.1 磁力搅拌时间的影响

为了较好观察磁力搅拌时间对传统 EC_{50} 测定值,相对发光率 P %和发光强度 I 的影响,磁力搅拌时间设置为 30 min ~ 190 min。结果分别见图 1、图 2 和图 3。

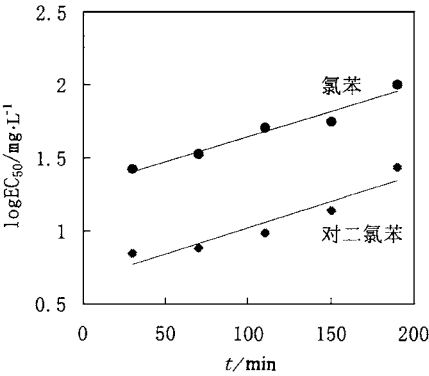


图 1 磁力搅拌时间 t 对传统 EC_{50} 测定值的影响

从图 1 可以看出,氯苯和对二氯苯的传统 EC_{50} 实验值都与磁力搅拌时间呈正相关:

$$\lg EC_{50}^{\text{氯苯}} = 0.003446t + 1.302 \quad (1)$$
$$n = 5, R^2 = 0.960, SE = 0.05$$

$$\lg EC_{50}^{\text{对二氯苯}} = 0.003604t + 0.660 \quad (2)$$
$$n = 5, R^2 = 0.893, SE = 0.09$$

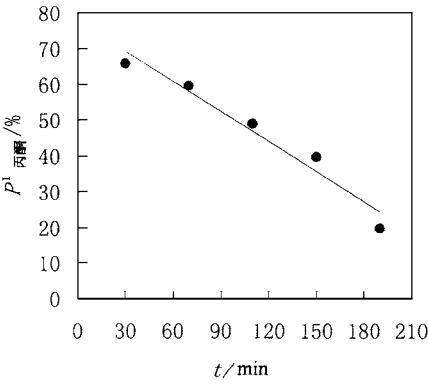


图 2 0.020 ml 丙酮对发光菌的相对发光率 $P_{丙酮}^I$ 与磁力搅拌时间 t 的关系

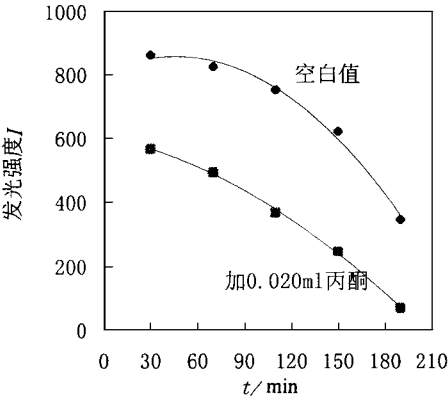


图 3 磁力搅拌时间 t 对等量发光菌发光强度 I 的影响

从图 2 可以看出,0.020 ml 丙酮对发光菌的相对发光率 $P_{丙酮}^I$ 与磁力搅拌时间呈负相关:

$$P_{丙酮}^I = -0.280t + 77.538 \quad (3)$$
$$n = 5, R^2 = 0.957, SE = 4.356$$

从图 3 可以看出,在无外加待测物时,等量发光菌的发光强度(空白值)随时间的推移下降,这表明体系营养有限,随着磁力搅拌时间的延长,生物体生理活性下降,代谢减缓,单位发光菌发光强度降低,从而维持等量发光强度本底所需的生物个数增多,但传统实验假设生物个数及个体发光强度不变,因而同一毒物的 EC_{50} 实测值势必增大(如图 1);另一方面生物体处于不良生存环境,可产生“应激”作用^[6],如细胞壁增厚等使生物个体本身的抗性增强,需要更大量的化合物才能抑制等量发光强度,即 EC_{50} 增大(如图 1);或等量的

化合物对等量的发光强度的抑制越弱,即 $P\%$ 减小(如图 2).从图 3 还可以看出,当加 0.020 ml 丙酮时,发光菌的发光强度随着搅拌时间的推移也有所下降,但相对于空白值较慢,在搅拌时间 $t \geq 110 \text{ min}$ 后,此现象尤为明显,因而 EC_{50} 实测值也有所增大.可见,磁力搅拌能使发光菌在检测期间发光强度有一定幅度的波动,这是传统 EC_{50} 的测定结果重现性较差的一个原因.

综合图 1,图 2 可以看出,同一化合物的 EC_{50}^I 与 $P_{\text{丙酮}}^I$ 均与磁力搅拌时间呈线性相关,那么 EC_{50}^I 与其对应的 $P_{\text{丙酮}}^I$ 也必定存在某种线性关系:

$$\lg EC_{50}^{\text{氯苯}} = -0.0122 P_{\text{丙酮}}^I + 2.249 \quad (4)$$

$$n = 5, R^2 = 0.980, SE = 0.04$$

$$\lg EC_{50}^{\text{对二氯苯}} = -0.0132 P_{\text{丙酮}}^I + 1.672$$

$$n = 5, R^2 = 0.981, SE = 0.04 \quad (5)$$

基于上述结论,尝试以在本实验条件下 0.020 ml 丙酮对发光菌的相对发光率 $P_{\text{丙酮}}^I$ 作校正因子,扩展传统二维数组[X 为化合物浓度 c_i , Y 为相对发光率 P_i]为三维数组[X 为化合物浓度 c_i , Y 为相对发光率 P_i , Z 为校正因子 $P_{\text{丙酮}}^I$],并且假设当 $P_{\text{丙酮}}^I$ 和 P_i 均为 50 % 时所测得的化合物浓度为 EC_{50} .

2.2 培养时间的影响

在分批培养过程中,细胞生物体一般要经历延滞期,指数生长期,衰减增长阶段,稳定阶段和内源呼吸阶段.实验测得发光菌的指数生长期为 6.5 h ~ 15.5 h.因此,以培养时间分别为 9 h、12 h、15 h 的 T_3 发光菌测定苯、氯苯、对二氯苯、1,2,3-三氯苯的 EC_{50} 结果见表 1.

表 1 培养时间对化合物 EC_{50} 的影响¹⁾ / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

时间/h	苯	氯苯	对二氯苯	1,2,3-三氯苯
9	192.1	45.26	10.79	7.47
12	216.7	43.79	9.47	7.56
15	199.5	42.22	9.09	8.33
平均值	202.8	43.76	9.78	7.79
RSD/ %	6.2	3.5	9.1	6.1

1) 所用发光菌培养温度为 $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$,培养代数为 T_3 .

由表 1 可知,改进后的方法不仅可采用培养时间为 9 ~ 15 h 发光菌,而且测得的 EC_{50} 相对标准偏差在 3.5 % ~ 9.1 %.传统实验要求采用培养时间 12 h 的发光菌.可见改进后的实验条件宽松,实验重现性好.

2.3 培养代数的影响

发光菌多代培养后,生物活性不断减弱,需要复壮处理^[4],否则就会增大生物毒性实验结果的偏差.传统

实验一般采用强壮的 T_3 ,本条件实验采用 T_3, T_8, T_{13} 的菌种.培养代数对化合物 EC_{50} 的影响结果见表 2.

表 2 培养代数对化合物 EC_{50} 的影响¹⁾ / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

代数	苯	氯苯	对二氯苯	1,2,3-三氯苯
T_3	216.7	43.79	9.47	7.56
T_8	208.5	41.90	9.96	8.79
T_{13}	216.0	45.20	10.65	6.79
平均值	213.7	43.63	10.03	7.71
RSD/ %	2.1	3.8	5.9	13.1

1) 所用发光菌培养温度为 $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$,培养时间为 12 h.

虽然传统方法所测得的 EC_{50} 会由于发光菌多代培养活性的减弱而增大,但从表 2 可以看出,经丙酮校正因子校正后, T_8, T_{13} 仍能得到与强壮菌种 T_3 大致相当的 EC_{50} ,相对标准偏差在 2.1 % ~ 13.1 % 之间.

2.4 培养温度的影响

细菌整个生长过程依赖于一系列的生物化学反应,温度是影响这些反应的最主要因素之一,因此温度明显地影响着细菌的生长速率^[7].温度对化合物 EC_{50} 的影响见表 3.

表 3 培养温度对化合物 EC_{50} 的影响¹⁾ / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

$t/^\circ\text{C}$	15 $\pm$ 1	20 $\pm$ 1	25 $\pm$ 1
苯	207.0	216.7	292.0
氯苯	39.28 ²⁾	42.22 ²⁾	53.68 ²⁾
对二氯苯	10.09 ²⁾	9.09 ²⁾	16.60 ²⁾
1,2,3-三氯苯	6.28	7.56	9.21

1) 所用发光菌培养代数都为 T_3 ; 2) 培养时间为 15 h,其余发光菌培养时间为 12 h.

如表 3 所示,在 $15 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C} \sim 20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$,采用本法所测得的化合物 EC_{50} 相差不大,但当温度升至 $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 时, EC_{50} 明显增高.这可能是由于不同温度时发光菌的生理代谢强弱不同,从而影响荧光素酶促反应,最后导致了 EC_{50} 测定值的偏差.

明亮发光杆菌属低温菌种,生长温度为 $0 \text{ }^\circ\text{C} \sim 25 \text{ }^\circ\text{C}$,最适生长温度为 $18 \text{ }^\circ\text{C}$ ^[8].荧光素酶(从明亮发光杆菌中提取)在 $0 \text{ }^\circ\text{C} \sim 30 \text{ }^\circ\text{C}$ 活性最大,并且稳定, $45 \text{ }^\circ\text{C}$ 时产生不可逆失活^[9].实验温度为 $15 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C} \sim 20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 时,发光菌处于最适生长温度,细胞活性大,生物个体代谢旺盛^[10],发光反应所需辅酶(如黄素单核苷酸 FMNH₂ 等)浓度高,而且荧光素酶活性也处于最大且稳定的区间,因此,酶促反应速率快^[11],发光强度高.总之,发光菌个体强壮,符合生物毒性实验要求,所测得的 EC_{50} 值能正常反映化合物对发光菌的毒性作用.当温度一超

过发光菌最高生长温度(25℃左右),生物个体停止生长,细胞功能迅速下降,代谢缓慢^[10],发光反应所需辅酶浓度随之降低.另外,原则上 25℃的荧光素酶还保持稳定活性,但由于处于生物体内,受发光菌逐渐缓慢代谢的影响,活性有可能下降.两方面的共同作用使得荧光素酶酶促反应速率变慢^[11],单位发光菌发光强度减弱,维持等量发光强度的生物个数增多.但传统实验忽略了不同温度下发光菌生理代谢对荧光素酶酶促反应的影响,仍假设单位个体发光强度不变,造成抑制等量发光强度所需化合物量增多.同一毒物的 EC₅₀ 实测值偏大.这是传统 EC₅₀ 实验重现性差的另一个原因.在 25℃校正后的 EC₅₀ 值仍明显偏大,具体原因尚不清楚,可能与荧光素酶的最适温度随酶促反应时间的延长而降低^[12]有关.当荧光素酶的最适温度随酶促反应时间的延长而低于 25℃时,荧光素酶的变性显著,活性酶浓度大大降低^[13],酶促反应速率继续减慢,EC₅₀ 测定值进一步偏大,无法用 $P_{\text{丙酮}}$ 校正.传统实验要求实验温度为 15℃~25℃,本方法建议实验温度控制在 15±1℃~20±1℃.

3 结 论

(1) 由于磁力搅拌时间,实验温度等外界条件变化,发光菌在检测期间发光强度有一定幅度的波动,因此传统的 EC₅₀ 实验重现性较差.

(2) 同一化合物在不同的磁力搅拌时间所测的 EC₅₀^I 值与其对应的 $P_{\text{丙酮}}$ 线性相关.本文引入校正因子 $P_{\text{丙酮}}$ 改进了传统的发光菌生物毒性实验.

(3) 采用改进后的方法,控制实验温度为 15±1℃~20±1℃,培养时间为 9h~15h,分别测定苯、氯苯、对二氯苯、1,2,3-三氯苯对 T₃, T₈, T₁₃ 发光菌的 EC₅₀, 相对标准偏差为 2.1%~13.1%.可见,改进后的实验重现性较好,实验条件较宽松.

(4) 实验温度在 25℃±1℃时,校正后的 EC₅₀ 值仍明显偏大,具体原因尚不清楚,可能与荧光素酶的最适温度随酶促反应时间的延长而降低有关.传统实验要求实验温度为 15℃~25℃,本方法建议实验温度控制在 15±1℃~20±1℃.

(5) 当然这一方法只是在观察化学品毒性大小时,

通过一定假设测定出来的相对 EC₅₀ 值,但是它可以保证实验数据的重现性,为以单一化合物实验结果为基础的联合毒性实验提供可靠的数据和正确的结论,推动多组分有机化合物定量结构-活性相关(QSARs)的研究进程.

参考文献:

- 1 黄正,汪亚洲,王家玲.细菌发光传感器在快速检测污染物急性毒性中的应用.环境科学,1997,18(4):14~17.
- 2 Pearson J. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment. 5th conf., Philadelphia:ASTM;1982,179.
- 3 Dukta B J, Kwan K K. Comparison of three microbial toxicity screening tests with the microtox test. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 1981, 27:753~757.
- 4 南京大学环境生物教研室编.环境生物学实验技术与方法.南京:南京大学出版社,1989.145.
- 5 王连生,韩朔暎.有机污染化学进展.北京:化学工业出版社,1998.91.
- 6 戴华生,邱文芳.环境微生物学.南昌:江西教育出版社,1985.14.
- 7 M·J·小佩尔扎.武汉大学生物学系微生物学教研室译.微生物学.北京:科学出版社,1987.92.
- 8 Hastings J W. Methods in Enzymology, V.57 Bacterial Luciferase. Edited by Deluca M N. Y: Academic Press, 1978. 142, 157.
- 9 Takao NAKAMURA and Kenzaburo MAMATSUDA. Studies on Luciferase from *Photobacterium phosphoreum*. I. Purification and Physicochemical Properties. J. Biochem., 1971, 70:35~44.
- 10 T·D·布洛克.微生物学翻译组译.微生物生物学.北京:人民教育出版社,1980.196.
- 11 Takahide WATANABE, Takao NAKAMURA. Studies on Luciferase from *Photobacterium phosphoreum*. VIII. FMN-H₂O₂ Initiated Bioluminescence and the Thermodynamics of the Elementary Steps of the Luciferase Reaction. J. Biochem., 1976, 79:489~495.
- 12 程传焯.生物物理化学.北京:科学技术文献出版社,1998.126.
- 13 K·J·莱德勒,朱德煦译.酶作用的化学动力学.北京:科学出版社,1965.209.