

· 监测技术 ·

发光细菌法在环境监测中的应用

王兆群¹, 司皖甦¹, 严刚²

(1. 淮安市环境监测中心站, 江苏 淮安 223001; 2. 江苏省环境监测中心, 江苏 南京 210036)

摘要:阐述了发光细菌的生理特性及其应用原理, 重点评述了发光细菌法在工业废水、水域水质毒性及其他相关领域监测中的应用。与其他生物监测方法相比, 具有快速、简便、灵敏等特点, 测试结果与传统的鱼类毒性试验具有良好的相关性, 实际应用方便可行。同时, 结合现代电子技术和化学分析技术, 对发光细菌法的发展进行了展望。

关键词:发光细菌; 综合毒性; 环境监测; 测试

中图分类号: X835

文献标识码: A

文章编号: 1674-6732(2009)02-0014-04

Application of Luminescent Bacteria Techniques to Environmental Monitoring

WANG Zhao-qun¹, SI Wan-su¹, YAN Gang²

(1. Huaian Environmental Monitoring Central Station, Huaian, Jiangsu 223001, China; 2. Jiangsu Environmental Monitoring Center, Nanjing, Jiangsu 210036, China)

ABSTRACT: The physical characteristics of luminescent bacteria and application principles were elaborated. Application of luminous bacteria to industrial wastewater monitoring, water quality and toxicity and to other related areas were reviewed. Luminous bacteria technique provides simpler, more rapid and sensitive monitoring, compared with traditional biological monitoring techniques and testing data showed a good correlation with that from traditional fish toxicity tests. The prospect of luminous bacteria technique was explored in conjunction of modern electronic and chemical analysis technologies.

KEY WORDS: luminescent bacteria; comprehensive toxicity; environmental monitoring; test

传统的环境监测方法大体分为理化分析技术和生物监测技术两类。理化分析技术常用于单一理化指标的测试, 但不能反应污染物毒性的大小; 传统的生物监测虽能反映毒物对生物的直接影响, 但实验周期长、实验过程繁琐。针对这些不足, 一种新型生物毒性监测技术——发光细菌法应运而生。

1 发光细菌的生理特性及应用原理

1.1 发光细菌的生化反应模式

发光细菌属革兰氏阴性、兼性厌氧菌。无孢子、荚膜, 有端生鞭毛一根或数根, 最适生长条件为: 温度 20~30℃, pH 6~9, NaCl 体积分数 3%, 体积分数 0.3% 的甘油对发光反应很有利。

一般而言, 在所有的生物发光细菌系统中, 分子态的氧直接或间接地参与其生物化学反应。在细菌发光体中, 分子态的氧化 FMNH (还原态的黄素单核苷酸) 和长链脂肪醛, 反应生成的能量不是用来进行质子梯度的建立、渗透反应以及 ATP 的合成, 而是直接以光的形式释放出来。反应模式见

图 1。反应模式中 3 种酶参与, 分别为 FMN 还原酶, 荧光素酶和脂肪酸还原酶。在这些特殊的氧化反应过程中能够产生 115 kJ/mol 的自由能, 这些足够的自由能够使最后的产物处于激发态, 从而能够产生 490 nm 的光子, 大约折合能量为 59 kJ/mol。发光细菌生长初期发光很弱, 对数生长期中期发光强度达到高峰, 稳定时期发光强度下降。

1.2 发光细菌法的原理

发光细菌法是利用灵敏的光电测量系统测定毒物对发光细菌发光强度的影响^[1]。毒物的毒性可以用 EC₅₀ 表示, 即发光细菌发光强度降低 50% 时毒物的浓度。发光细菌含有荧光素、荧光酶、ATP 等发光要素, 在有氧条件下通过细胞内生化反应而产生微弱荧光。当细胞活性升高, 处于积极分裂状态时, 其 ATP 含量高, 发光强度增强。发光细菌在毒物作用下, 细胞活性下降, ATP 含量水平下

收稿日期: 2008-10-15; 修订日期: 2008-11-13

作者简介: 王兆群(1968—), 男, 江苏南京人, 高级工程师, 本科, 从事生物监测工作。

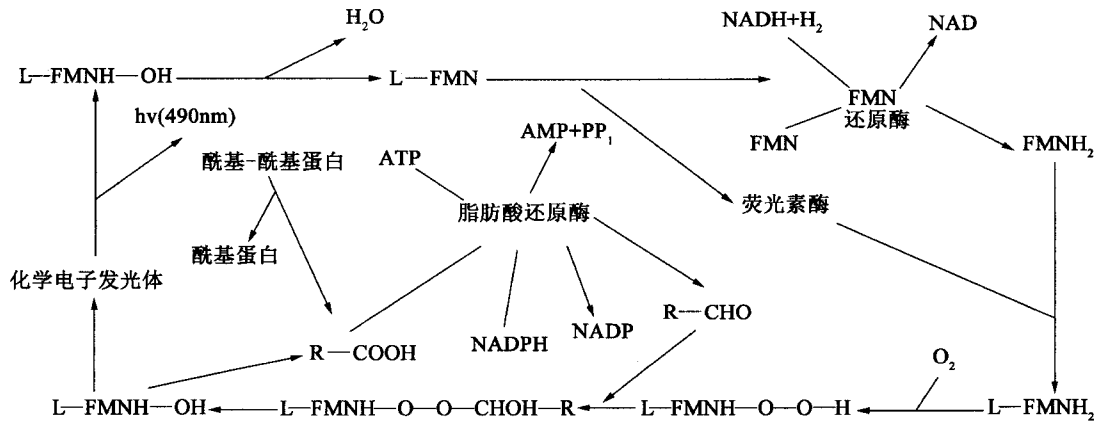


图 1 发光细菌的发光生化反应模式

降,导致发光细菌发光强度的降低。试验显示,毒物浓度与菌体发光强度呈线性负相关,因而,可以根据发光细菌发光强度判断毒物毒性大小,用发光度表征毒物所在环境的急性毒性。此法是 20 世纪 70 年代后期提出的一种微生物监测环境水质毒性的新方法,其灵敏程度可与鱼类 96 h 急性毒性试验相媲美,因其快速、简便、费用低而独具特色。发光细菌法除被用来测定水和土壤毒性外,还可用于测定微生物诱变剂和致癌剂的毒性、噬菌作用、抗菌素和血清的杀菌活性以及化合物毒性的初筛等。

2 应用概况

随着人们环保意识的增强,原有污染物排放标准的常规污染指标已不能全面说明污染物对生存环境造成的危害程度。常规的化学分析方法难以判断废水的毒性,无法反映出有毒化合物相互作用的影响,发光细菌法则不然,既可以测定废水的综合毒性,也可以测定单一污染成分的毒性。

2.1 工业废水毒性测定

工业废水是水体污染的重要因素之一,当受纳水体的污染物达到一定浓度时,会引起生物中毒反应,使之行为异常,生理功能紊乱,组织细胞病变,甚至死亡。国外在 20 世纪 70 年代末和 80 年代做过大量用发光细菌法测定废水综合毒性的研究。Bolich 根据采用发光细菌方法和采用鱼类、蚤类测定工业废水的急性毒性的试验结果,提出了 3 个毒性比较方法标准:①有毒/无毒,②百分数等级,③对数等级^[2]。其百分数等级划分标准为国内多数科研人员所采用,见表 1。

表 1 发光细菌试验百分数法等级划分

EC ₅₀ 或 LC ₅₀	毒性级别	等级
< 25%	强毒	I
25% ~ 75%	毒	II
75% ~ 100%	微毒	III
> 100% 或求不出 EC ₅₀	无毒	IV

赵毅红采用百分数等级标准对造纸废水进行研究,发现制浆废水对发光细菌有较强的抑制作用,毒性等级为 II 级,漂白废水多为 I 或 II 级。试验的过程和结果表明,发光细菌法可用于造纸工业废水的毒性监测,并可使其操作自动化,进行连续监测^[3]。华东师范大学杨颐康等人的研究表明,用发光细菌法所做的试验结果与以鱼类、无脊椎动物作为指示生物测定工业废水的试验结果有很好的相关性,并根据相对抑光率的不同将工业废水分为相当于汞离子体积分数为 $0.8 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-4}$ (较毒)、 $0.6 \times 10^{-4} \sim 0.8 \times 10^{-4}$ (毒)和 $0.1 \times 10^{-4} \sim 0.6 \times 10^{-4}$ (微毒)3 个等级,对各种废水的毒性提供了一个较为直观化的微量分级的客观标准。

美国的 Delistraty 等人用发光细菌法测定了合成燃料过程中排放废水的生物毒性,从油页岩、煤和焦油砂沉积物中回收燃料的过程排放大量具有生物毒性的废水,不可能对每种有毒化合物做单个分析,而且由于污染物之间的加和及拮抗作用,各个污染物的毒性之和并不代表这种废水的综合毒性。因此,用发光细菌法测定其综合毒性就显得比较优越^[4]。董玉瑛等人研究了不同行业废水的生物毒性,认为不同行业废水的生物毒性与其 TOC 值之间不存在相关性,只有将理化方法与生物方法相结合,

才能正确反映工业废水的污染负荷与生物学效应的关系,综合评价废水的毒性和水体污染状况。

Chiu - Yang Chen 等人采用 Microtox 方法测定了台湾几家石化工业废水的毒性,结果表明,废水中的醛类对废水毒性的贡献较大,废水中的有机污染负荷与毒性呈正相关^[5]。Barry K 等人采用 Microtox、虹鳟鱼和水蚤测定造纸厂废水的毒性,结果表明,发光细菌法的测试结果与虹鳟鱼的测试结果具有很好的相关性($r > 0.9$),与水蚤的测试结果相关系数 $r > 0.8$,总体而言,发光细菌法的灵敏性高于虹鳟鱼,而低于水蚤^[6]。厉以强等人将发光细菌毒性试验应用于项目竣工环保验收,结果表明,达标排放的废水对生物的急性毒性为低毒,试验结果与常规验收监测结果有可比性,发光细菌毒性试验可用于必须公示的敏感项目竣工环境保护验收监测^[7]。童中华等人利用淡水发光菌评估电化学处理模拟印染废水的效果,测定了14种染料化合物对发光菌的 EC_{50} 值,结果显示,还原直接染料毒性最大,酸性染料毒性次之,活性染料毒性最小^[8]。乔鸿泽等人用发光细菌法估算了淮阴、淮安两市城市污水对河道水体的分担率,评价了工厂排放污水的毒性,并据此确定污染源监督管理中应优先治理的工业废水^[9]。

2.2 特定水域毒性测定

水体中的污染物比较复杂,难以用单一的理化指标来表示其污染程度,通过生物毒性试验,则可以更好地反映水体的污染负荷与生物学效应的关系,以便综合评价水体污染现状和污染物的毒性。吴伟等人以明亮发光杆菌作为指示物,对渔业水域污染物的急性毒性进行监测,同时研究了 pH 值、温度对试验结果的影响。研究表明,在温度 20 ~ 30 °C, pH 6 ~ 9 条件下进行的测试结果可以与鱼类毒性试验互相替代^[10]。乔鸿泽等人用发光细菌法测定了污水对鱼类的综合毒性并利用发光细菌法对死鱼事故进行调查后指出:死鱼事故是由于工业废水大量排放所致^[11]。

采用生物毒性测试方法对污染物构成复杂的工业污水以及对受纳水体的总毒性的监测评价,可以较好地指示污水中各种污染物相互作用后的毒性水平,真实客观地反映水体的实际污染程度。Adela Femadez 等人采用发光细菌法对西班牙 Tormes 河进行了毒性研究,河流的毒性随着两岸工业废水流入的水流方向逐渐增强,且已超过河流的

自净能力,水体中还含有一些具有蓄积能力的三致物质^[12]。马梅等人采用发光细菌法对乐安江水进行毒性研究指出:乐安江河水毒性是德兴铜矿和洳水河两者排放的共同结果,一定程度的毒性可能和水环境条件变化下沉积相污染物二次释放有关^[13]。

2.3 有机化合物毒性测定

苏丽敏等人用 QSAR 模型预测苯酚类化合物对发光菌的联合毒性,采用相加指数法对联合毒性进行了评价,结果表明,苯酚和取代苯酚的二元混合物对发光菌的联合作用以相加作用为主,并根据 12 种苯酚类化合物的单一毒性建立了 QSAR 方程对混合物中取代苯酚的毒性进行了预测,预测值与实测值相吻合^[14]。刘新会等人应用比较分子场分析方法 (CoMFA) 对 56 种苯酚基乙酸酯类化合物的发光菌急性毒性进行了研究,获得了 6 组分三维定量结构 - 活性相关模型 (3D - QSAR),模型分析表明:该类化合物发光菌急性毒性效应与化合物分子的空间场和静电场具有显著关系^[15]。袁星等人研究了硝基苯、苯酚衍生物对发光菌毒性定量构效关系,测定了 14 种硝基苯、苯酚衍生物对发光菌的毒性,采用疏水性参数 ($\lg P$) 和电性参数 (E_{LUMO} 、 S_{α}^N) 进行定量构效关系 (QSAR) 研究,探讨了两类化合物对发光菌的毒性机制,为硝基苯、苯酚衍生物环境危险性评价提供了依据^[16]。莫凌云等人测定了苯酚与苯胺衍生物对发光菌的联合毒性,并应用剂量加和模型 (DA) 与独立作用 (IA) 模型由单一毒物的剂量 - 效应参数来预测混合物联合毒性的方法,结果表明:在实验浓度范围内各混合物的毒性均能用 DA 模型精确预测^[17]。林志芬等人测定了羟基乙腈与醛类化合物和对苯二甲醛与系列腈类化合物对发光菌的联合毒性,探讨了腈醛混合化合物对发光菌的联合毒性机制,并尝试提出腈醛混合化合物对发光菌联合毒性的 QSAR 模型,结果表明,不同的腈醛混合化合物对发光菌联合毒性不同,联合毒性的大小与腈类化合物和醛类化合物之间的化学作用密切相关^[18]。

2.4 其他应用

袁东星等人研究了蔬菜中有机磷农药甲胺磷、水胺硫磷、氧化乐果等对发光菌的毒性作用,检测了空心菜中甲胺磷和敌敌畏的残留^[19]。

刘赞等人利用发光菌对苏州河底泥生物毒性进行检测:苏州河各河段底泥和河水对淡水发光细

菌呈现出程度不等的急性毒性,市区河段毒性高于市郊河段,夏季高于冬季,底泥高于河水^[20]。

刘清等人研究了 Cu、Zn、Cd、Hg 对发光菌的联合毒性作用,由毒性加强指数 TEI (toxicity enhancement index) 来评价联合作用方式,发现:当两种金属作用时,Zn 和 Cd 为拮抗作用,Cu 和 Zn 为相加作用,Cu 和 Cd、Cu 和 Hg、Zn 和 Hg、Cd 和 Hg 均为协同作用,而当 3 种或 4 种金属同时作用时,联合作用趋向于相加作用^[21]。

张亚旦等人采用淡水发光细菌毒性测试技术,对 93#汽油、E10 乙醇汽油和 M50 甲醇汽油的毒性进行了研究,结果表明:93#汽油的毒性最强,E10 乙醇汽油次之,M50 甲醇汽油最弱。经对汽油中添加剂的生物毒性测试,初步分析认为 M50 甲醇汽油和 E10 乙醇汽油的毒性主要是由汽油毒性所引起^[22]。

此外,发光细菌法还可用于土壤、大气、固体废物塑料包装材料等的环境生物毒性监测。

3 展望

发光细菌法已在水质、土壤(沉积物)、环境评价、环保验收以及生态规划中得到了广泛的应用。随着科学技术的发展,还将与电子技术、光电技术相结合,逐步发展成为在线监测系统,为水质分析提供更加快速的测试手段。另一发展方向就是和先进的化学分析方法相结合,为环境监测提供更加全面和细微的毒性分析。

发光细菌法与其他生物监测方法相比具有快速、简便、灵敏等特点,适用于大批量化合物和样品的初筛,在环境影响评价、环境污染控制、环境监督管理以及环境规划方面有着广泛的应用前景,对控制环境中毒物污染和强化工业污染源的管理很有裨益,为污染事故应急监测提供有效手段。这一测试方法必将在环境监测中发挥更大的作用。

[参考文献]

- [1] Thomtdka KW. Use of bioluminescent bacterium photobacterium phosphoreum to detect potentially biohazardous materials in water[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 1993,51(4):538.
- [2] Bolich A A. A practical and reliable method for monitoring the toxicity of aquatic samples[J]. Process Biochemistry, 1982,17(2):45-47.
- [3] 王敬哲,赵毅红. 发光细菌法测定造纸废水的生物毒性[J]. 环境保护,1995,4.
- [4] Delistraty D. The use of biological activities to monitor the removal of fuel contaminants - perspective for monitoring hydrocarbon[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 1984,32:613-620.
- [5] Marinel la Farré, María Jesús García, Lluís Tirapu, et al. Wastewater toxicity screening of non-ionic surfactants by toxalert and microtox bioluminescence inhibition assays[J]. Analytica Chimica Acta, 2001,427(2):181-189.
- [6] Firth B K, Backman C J. Comparison of microtox testing with rainbow trout (acute) and ceriodaphnia (chronic) bioassays in mill wastewaters[J]. TAPPI, 1990(4):169-174.
- [7] 厉以强,常卫民,郭小颖,等. 发光菌毒性试验应用于项目竣工环保验收监测中的应用[J]. 中国环境监测,2005,21(2):49-51.
- [8] 童中华,马梅,王子健,等. 利用淡水发光菌评估电化学处理模拟印染废水的效果[J]. 环境化学,1997,16(2):130-134.
- [9] 乔鸿泽,周德智,王怀权,等. 发光细菌法评价工业废水的毒性[J]. 环境监测管理与技术,1996,(6):20-23.
- [10] 吴伟,奚新伟. 发光细菌在渔业水域污染物急性毒性快速检测中的应用[J]. 湛江海洋大学学报,1998,118(2).
- [11] 乔鸿泽,于能. 利用发光细菌法测定污水对鱼类的综合毒性和对死鱼事故的预测预报[J]. 水产养殖,1991,(6):21-23.
- [12] Fernandez A, Tejedor C, Cabrera F, et al. Assessment of toxicity of river water and effluents by the bioluminescence assay using Photobacterium phosphoreum [J]. Water Research, 1995,29(5):1281-1286.
- [13] 马梅,童中华. 乐安江水和沉积物样品的生物毒性评价[J]. 环境化学,1997,16(2):167-171.
- [14] 苏丽敏,袁星,丁蕴铮. 用 QSAR 模型预测苯酚类化合物对发光菌的联合毒性[J]. 中国环境科学,2003,23(2):148-151.
- [15] 刘新会,骆文茹,王连生. 苯酚基乙酸酯类化合物发光菌毒性效应的 CoMFA 研究[J]. 环境化学,2005,24(1):36-40.
- [16] 袁星,赵晓明. 硝基苯、苯酚衍生物对发光菌毒性定量构效关系研究[J]. 中国环境科学,1997,17(5):426-428.
- [17] 莫凌云,刘树深,刘海玲. 苯酚与苯胺衍生物对发光菌的联合毒性[J]. 中国环境科学,2008,28(4):334-339.
- [18] 林志芬,孔德祥,殷克生,等. 腈醛混合化合物对发光菌联合毒性的 QSAR 研究[J]. 环境化学,2005,24(3):296-301.
- [19] 袁东星,邓永智. 蔬菜中有机磷农药残留的发光菌快速检测[J]. 环境化学,1997,16(1):76-81.
- [20] 刘赞,洪蓉,朱文杰,等. 苏州河底泥及河水生物毒性的研究[J]. 华东师范大学学报:自然科学版,2004,(1):94-98.
- [21] 刘清,马梅. Cu、Zn、Cd、Hg 对青海弧菌(Q67 菌株)联合毒性作用的研究[J]. 中国环境科学,1997,17(4):301-303.
- [22] 张亚旦,徐亚同,朱文杰. 应用发光细菌法检测三种燃油毒性的研究[J]. 上海化工,2008,5(4):15-18.