

发光细菌

一、发光细菌方法简介

近年来，水污染问题日益严重，与此同时也开发出许多灵敏、有效的环境监测方法，这些方法可以划分为两类：分析技术和生物监测。其中分析技术常常用于废水常规指标的测试，但不能反应水质综合毒性的大小。传统的生物监测以水蚤、藻类或鱼类为受试对象，虽然能反映毒物对生物的直接影响，但是这些方法的最大缺点是实验周期长，实验过程比较繁琐。针对传统生物毒性检测方法的不足，研究和开发新型生物毒性监测技术——发光细菌法。该方法以简便的操作方式、测量结果一目了然，受到了科研单位和企业的青睐。

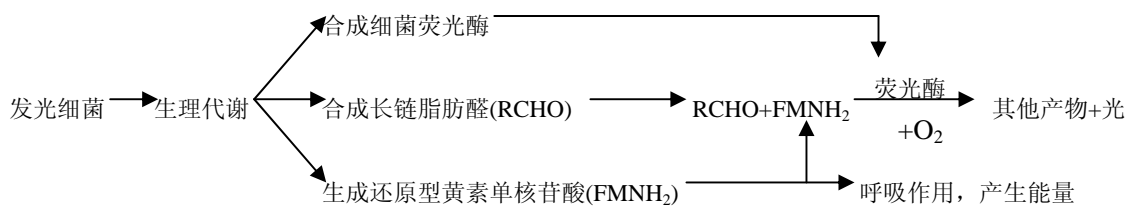
自 1672 年 R. Boyle 观察到发光的菌体所发出的光易被化学物质抑制后，许多科学家相继对细菌的发光效应进行了大量的研究。本世纪 70 年代至 80 年代初，国外科学家首次从海鱼体表分离和筛选出对人体无害，对环境敏感的发光细菌，用于检测水体生物毒性，现已成为一种简单、快速的生物毒性检测手段。80 年代初我国引进了这项技术，并先后分离出海水型和淡水型（青海弧菌）的发光细菌，用以检测环境污染物的急性生物毒性。

一般发光细菌长约 1.5-3 μm （微米），宽度 0.5-0.8 μm ，因此肉眼根本看不到，要用显微镜放大至 1 千倍时方可以分辨它们的体形。而它们的发光，也要在特定的条件中才能看得见。青海弧菌是目前唯一的非致病型淡水发光菌，所以专利产品青海弧菌冻干粉在运输、使用过程中安全可靠，对废弃的菌液也不用进行特殊处理，不会引起二次污染。

二、检测原理及操作

发光细菌最特别的生理代谢特征是在其生长的一定时间内，能够发射可见光，发光的原理与萤火虫的发光有点类似，但并不相同。简单来说，细菌发光可概括如下：

细菌身体内可以合成一种酶，它可以催化还原型的黄素单核苷酸（FMNH₂）和长链脂肪醛（RCHO，至少含 8 个 C）并在 O₂ 的参与下发生氧化反应而放出光子，这种氧化反应并不放热，故而发光细菌在发光时并不伴随发热，是典型的“冷”光。



发光波长在 490nm 左右。这种发光过程极易受到外界条件的影响，凡是干扰或损害细菌呼吸或生理过程的任何因素都能使细菌发光强度发生变化。当有毒有害物质与发光菌接触时，发光强度立即改变，并随着毒物浓度的增加而发光减弱。这种发光强度的变化，可用精密测量仪，即北京滨松光子技术股份有限公司研制开发的 BHP9511 型水质毒性快速检测仪进行测量。

主要操作流程图如下：



三、毒性的表示方法

(1) 用苯酚浓度表示:

当未经稀释的样品（即样品稀释度为 100%）的抑光率在 5%~95% 时，也即相对发光强度在 95%~5% 范围内，可以用相同抑光率时苯酚的浓度来表示样品的毒性。大多数水样均在此范围内。

(2) 用 EC_{50} 值表示:

EC_{50} 值是指受试物对发光菌作用后，发光强度下降为对照组的 50% 时（即相对发光强度或抑光率为 50% 时）的受试物浓度。 EC_{50} 值是评价化合物生态毒性的重要参数，也是评价有机污染物对生物体毒理学效应的常用参数，常用于表征化合物对发光菌的作用结果。 EC_{50} 值越小表明受试物的毒性越大。

(3) 毒性表达方法还应注明样品与发光菌作用的时间，因为作用时间也影响数值大小。发光菌作用时间 10min 和作用 15min 的数值是不同的，有时差异还很大，故必须表明作用的时间。一般可在数值表达后用括号加注作用时间，例如： $EC_{50}=0.10\%(15min)$ ，或抑光率 45% (15min)，表明是 15min 时实测数据。

四、发光细菌法的应用

根据发光细菌法的原理和方法，凡能干扰或破坏发光细菌呼吸、生长、新陈代谢等生理过程的环境因子，例如有毒有害的物质等都可以运用发光细菌法检测生物毒性。其主要应用包括：

1、在教学领域的应用：配合《水和废水监测分析方法》（第四版）中关于发光菌应用方面的实验，同济大学已率先开设了此项实验；

2、在受污染现场的应用：因泄漏事故、环境污染，以及人为破坏而造成的饮用水污染，能够快速的初筛、监测、为控制污染扩散提供参考数据；

3、对污水处理中的进出水、食品加工用水、地表水、沉淀物毒性的检测；

4、对油污染物毒性、工业用水中的生物杀减剂的测试与监测；

以下为我公司产品实际应用数据图表：

仪器：BHP9511 型水质毒性快速检测仪

试剂：淡水型青海弧菌（Q67）

样品：氟乙酰胺

地点：上海市公安局

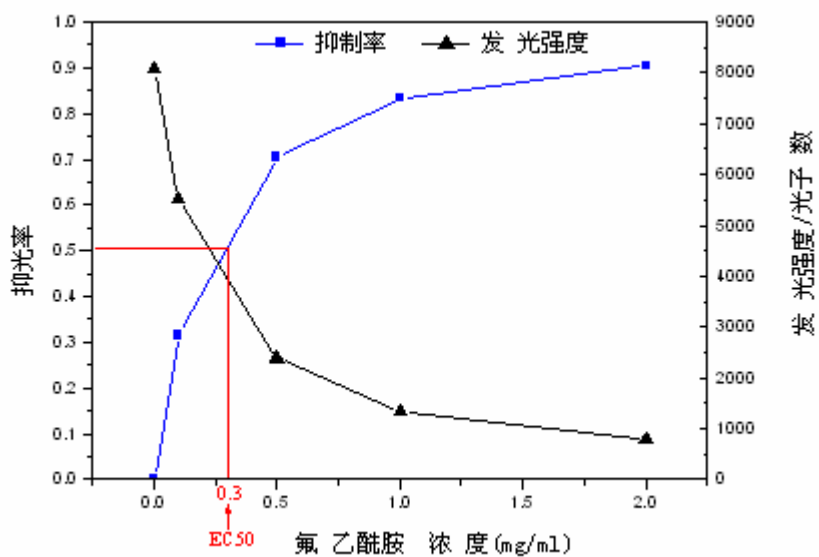


图1 氟乙酰胺与Q₆₇作用 5min

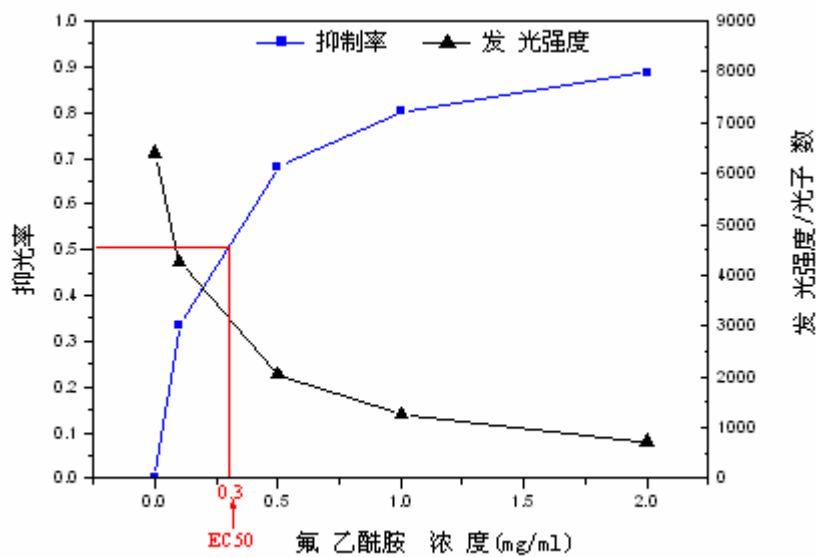


图3 氟乙酰胺与Q₆₇作用 15min

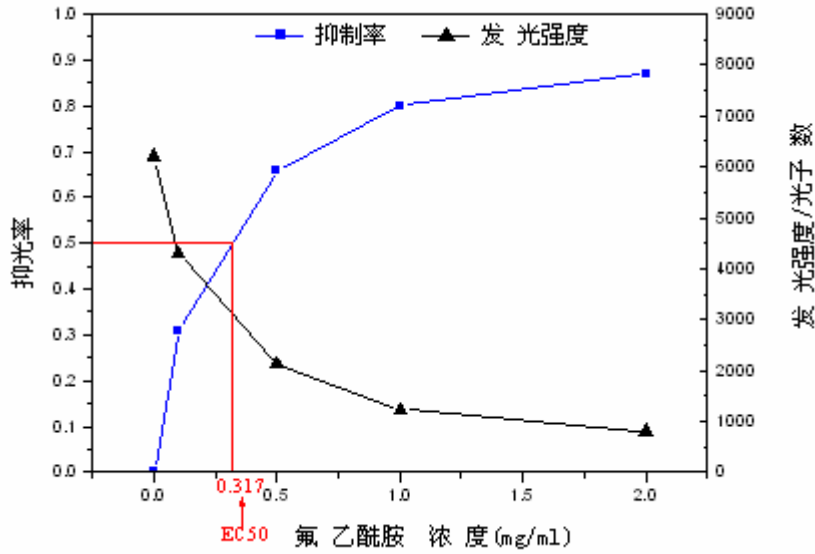


图4 氟乙酰胺与Q₆₇作用 20min

结果分析：样品对青海弧菌的发光抑制作用非常明显，在 20min内发光强度基本保持稳定，且所测得的EC₅₀值也能保持稳定，表明青海弧菌在 5min内就能得出一个稳定的结果，反应时间的经验值为 15min；由图可见，氟乙酰胺对青海弧菌的EC₅₀=0.3mg/ml，灵敏度较高。

现行标准：

美国 ASTM 标准 (D-5660) 《通过对海洋发光细菌进行毒性试验而对遭化学污染的水和土壤进行微生物解毒予以评估的标准试验方法》

美国环保局(EPA)饮用水毒性测试协议(WET)认可

欧盟 ISO11348-3: 《水质测定——水样对于发光细菌的抑制效应测定》

中国国标 GB/T15441-1995 《水质急性毒性的测定 发光细菌法》