

发光细菌生物活性的调控方法*

郑小燕¹ 蔡强³ 彭惠民^{1,2**} 盛建武³ 彭方毅⁴ 刘锐³ 陈吕军³

(¹重庆医科大学基础医学院 重庆 400016)

(²重庆医科大学基础医学实验教学中心 重庆 400016)

(³浙江清华长三角研究院生态环境研究所 嘉兴 314006)

(⁴重庆理工大学药学与生物工程学院 重庆 400050)

摘要 为维持发光细菌发光强度的稳定性,推进发光细菌毒性测试技术应用于在线监测和分析,以明亮发光杆菌和鳀鱼发光杆菌为对象,通过添加各种保护剂,将培养至对数生长期的菌液离心,重新悬浮于脱脂牛奶溶液冷藏(5℃),比较脱脂牛奶菌悬液冷藏、冻干粉复苏后即时冷藏以及新鲜菌液直接冷藏3种方法的调控效果。结果表明,脱脂牛奶菌悬液冷藏7 d后复苏,相对发光率达到93%。该方法明显提高了发光细菌生物活性的稳定性,对于提高在线毒性监测仪连续运行时间有参考价值。图3 表3 参15

关键词 发光细菌; 保护剂; 冷冻干燥法; 在线毒性监测仪

CLC X832

Control of the Survival and Activity of Luminescent Bacteria*

ZHENG Xiaoyan¹, CAI Qiang³, PENG Huimin^{1,2**}, SHENG Jianwu³, PENG Fangyi⁴, LIU Rui³ & CHEN Lüjun³

(¹Faculty of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

(²The Experimental Teaching Center of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

(³Department of Environmental Technology and Ecology, Yangtze Delta Region Institute of Tsinghua University, Jiaxing 314006, Zhejiang, China)

(⁴School of Chemistry and Bioengineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400050, China)

Abstract Luminescent bacteria toxicity test has attracted considerable attention in the past ten years. However, maintaining the stabilization of the activity of luminescent bacteria is a demanding task, which seriously limits the application of such diagnostics in on-line determination and analysis. In this study, a control method of maintaining the stabilization of the intensities of *Photobacterium phosphoreum* and *P. leiognathi* was investigated by adding various cryoprotectants. In this method, the bacteria in the exponential growth phase was centrifuged, re-suspended in the cold skimmed milk solution and stored at 5 °C. Three cold storage methods were studied and compared, and they were the skimmed milk-bacteria suspension, freeze-dried bacteria suspension made by rehydrating freeze-dried bacteria powder and fresh bacteria solution being stored at 5 °C. The results indicated that the storage life using skimmed milk bacteria suspension could reach 7 days, with relative luminosity 93%. This method could significantly improve the stabilization of the luminescent bacteria, and it could be applied in on-line toxicity monitor to improve continuous operation time. Fig 3, Tab 3, Ref 15

Keywords luminescent bacterium; cryoprotectant; freeze-drying; on-line toxicity monitor

CLC X832

发光细菌毒性测试技术是环境样品毒性检测的生物测试技术。国际标准化组织在1998年颁布了发光细菌检测水质急性毒性的标准(ISO11348-1~3-1998)^[1-3]。1995年,该技术被列为国家标准《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》(GB/T15441-1995),并于1995年8月实施^[4]。发光细菌因其独特的生理特性,能够在短时间内反映水质的综合毒性状况。该技术与现代光电子技术的结合能更加灵活、方便地应用于现场检测,这正是我国科研工作者研究重点之一^[5-7]。在线毒性监测仪可以提供实时连续的样品信息^[8],是目前非常有效的急性毒性的监测报警方法,它可以对水体中有毒物质的综合毒性进行检测并报警,及时有效地发现有毒污染物的泄露或排放,采取相应的应急措施。

在线水质毒性监测仪的连续运行要求发光细菌保持稳定的生物活性。虽然已有基于发光细菌的在线水质毒性监测仪的报道^[9-10],但是在线毒性检测仪运用的发光细菌保藏方法,实践表明目前还不能很好地维持细胞处于休眠状态并保持其活性^[11]。在常规方法中,以发光细菌真空冷冻干燥法进行保存。然而,冻干粉复苏后置4℃冷藏,细菌的发光强度迅速下降^[12],造成在线检测仪器使用过程中检测结果不可靠,维护周期过短。

我们通过一系列实验探究一种更有效的用于在线毒性监测仪的发光细菌生物活性稳定保持的方法,即脱脂牛奶菌悬液冷藏法,克服了菌体活性保持的问题,改善了菌体细胞发光的稳定性,使在线毒性监测仪的自动连续运行得以实现。

收稿日期: 2010-06-26 接受日期: 2010-07-20

*国家“863”目标导向项目(No. 2007AA06Z419)和浙江省重大科技项目(No. 2007C13010)资助 Supported by the National High-tech Research and Development Program of China (“863” Program) (No. 2007AA06Z419), and the Key Sci & Tech Project of Zhejiang, China (No. 2007C13010)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: phm614@qq.com)

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

菌种: 明亮发光杆菌T3小种冻干粉, 购买于中国科学院南京土壤研究所。鳀鱼发光杆菌冻干粉, 由北京金达清创提

供. 脱脂奶粉、蔗糖为食品级. 其于试剂均为分析纯.

明亮发光杆菌培养基^[13]: 胰蛋白胨5 g, 酵母浸出汁5 g, 氯化钠30 g, 磷酸氢二钠5 g, 磷酸二氢钾1 g, 甘油3 g, 去离子水1 000 mL, pH 6.5.

鳕鱼发光杆菌培养基: 胰蛋白胨2 g, 酵母膏浸出液0.5 g, 甘油1.9 g, 人工海水75 mL, 蒸馏水25 mL, pH 7.0. 人工海水配方: 氯化钠28 g, 氯化钾0.08 g, 二水合氯化钙1.6 g, 六水氯化镁4.8 g, 碳酸氢钠0.02 g, 七水硫酸镁3.5 g, 去离子水1 000 mL.

立式压力蒸汽灭菌器 (LDZX-50FA, 上海申安医疗器械厂), 生化培养箱 (SHP-150型, 上海精宏实验设备有限公司), 水浴恒温振荡器 (THZ-82A, 荣华仪器制造有限公司), 水质毒性快速检测仪 (BHP9511, 北京滨松光子技术股份有限公司), 真空冷冻干燥机 (FD-1-50, 北京博医康实验仪器有限公司), 台式高速冷冻离心机 (TCL-20M, 湘仪离心机仪器有限公司).

1.2 冻干粉制备

发光细菌接入液体培养基中, 20 ℃振荡培养至对数生长期, 在暗室可见发射蓝绿色荧光, 于4 ℃, 5 000 r/min, 离心10 min, 弃去上清液, 收集菌体, 将菌体重新悬浮于含一定浓度NaCl和脱脂牛奶、蔗糖等保护剂的溶液中, 分装于小玻璃瓶中, 每瓶0.5 mL, 于-70 ℃预冻3 h, 冷冻真空干燥24 h后置于-20 ℃冰箱保藏.

1.3 冻干粉菌悬液制备

取发光细菌冷冻干燥制剂瓶, 加入0.5 mL的5 ℃冷藏的一定浓度的NaCl溶液摇匀, 保藏于5 ℃冰箱中.

1.4 脱脂牛奶冷藏液制备

发光细菌接入液体培养基中, 20 ℃振荡培养至对数生长期, 在暗室可见发射蓝绿色荧光, 同上4 ℃离心收集菌体, 将菌体重新悬浮于含3%的NaCl和脱脂牛奶的溶液中, 分装后保藏于5 ℃冰箱待测.

1.5 新鲜菌液冷藏

取1 mL 20 ℃振荡培养至对数生长期、发光明亮的菌液保藏于5 ℃待测.

1.6 测定方法

冻干粉: 从-20 ℃取出发光细菌冷冻干燥制剂, 加入0.5 mL的5 ℃冷藏的一定浓度的NaCl溶液, 20 ℃的室温自然溶解, 平衡10 min至恢复发光, 用3%的NaCl溶液稀释后, 取10 μL于测试管, 加入2 mL 3%的NaCl溶液, 15 min后利用水质毒性快速检测仪测发光强度 (每个样品测3个平行样).

冻干粉菌悬液冷藏复苏: 从5 ℃取出冷藏管, 取100 μL于小试管中, 20 ℃平衡10 min, 取10 μL于测试管, 加入2 mL 3%的NaCl溶液, 15 min后测发光强度.

新鲜菌液冷藏复苏测试方法及脱脂牛奶菌悬液冷藏复苏测试方法同上. 每次作3个平行样, 利用水质毒性快速检测仪测发光强度.

测定结果以相对发光率 (%) 表示, 即复苏后的发光强度与初始发光强度之比.

2 结果与讨论

2.1 冻干粉保护剂溶液配方的确定

保护剂对微生物菌株冷冻干燥保藏的存活率有较大的

影响, 选择适当的保护剂是提高微生物冷冻干燥保藏存活率、延长菌种保藏期的关键因素. 本研究通过尝试配制不同种类和不同浓度的保护剂, 确定明亮发光杆菌和鳕鱼发光杆菌真空冷冻干燥保护剂的配制.

因为实验采用的是海洋发光细菌, 其对NaCl浓度有一定的要求. 在正常条件下, 3%的NaCl浓度有利于发光细菌发光. 但是在冷冻干燥过程中, 随着水的升华, 菌液中NaCl不断被浓缩, 冻干过程中过高浓度的NaCl会造成发光细菌生物活性的丧失. 由表1可见, 1%NaCl浓度更有利于明亮发光杆菌和鳕鱼发光杆菌的发光.

脱脂牛奶为一种基础保护剂, 可以促进冻干样品的升华, 形成耐热骨架阻断热传导和热辐射, 并易取得均质产品, 扩大细胞相互间的距离, 通过包裹形式保护菌体^[14]. 由表2可以看出, 当脱脂牛奶浓度为10%时, 明亮发光杆菌和鳕鱼发光杆菌存活率和生物活性较低. 这表明脱脂牛奶浓度偏低时, 不能包裹所有的菌体及扩大细胞间的距离, 造成部分细胞受损. 当浓度为15%时, 两种菌的存活率都较高, 相对发光率分别为69%和68%, 此时, 脱脂牛奶浓度对细菌的包裹保护作用达到饱和状态, 进一步提高脱脂牛奶的浓度, 单位体积的细菌数减少, 等体积的冻干粉菌溶液的相对发光率反而有所下降. 因此, 选择浓度为15%的脱脂牛奶为较佳浓度.

由于以脱脂牛奶为保护剂时, 细菌的相对发光率总体仍然较低, 因此, 还应增加糖醇类物质来保护发光细菌. 这是因为糖醇类物质分子中含有羟基, 在冷冻或干燥过程中, 可与菌体细胞膜磷脂中的磷酸基团或菌体蛋白质极性基团形成氢键, 使细胞表面形成一层“水合层”, 保持细胞膜和蛋白质结构与功能的完整性, 同时糖醇类物质也有利于细胞较

表1 NaCl浓度对发光细菌冻干粉制剂发光的影响
Table 1 Effect of NaCl concentration on light emission of freeze-dried luminescent bacteria

脱脂牛奶 Skimmed milk (w/%)	NaCl (w/%)	相对发光率 Relative luminosity (r/%)	
		明亮发光杆菌 <i>P. phosphoreum</i>	鳕鱼发光杆菌 <i>P. leiognathi</i>
20	0.5	58	52
20	1.0	68	66
20	1.5	63	61

表2 脱脂牛奶对发光细菌冻干粉制剂发光的影响
Table 2 Effect of skimmed milk on light emission of freeze-dried luminescent bacteria

NaCl (w/%)	脱脂牛奶 Skimmed milk (w/%)	相对发光率 Relative luminosity (r/%)	
		明亮发光杆菌 <i>P. phosphoreum</i>	鳕鱼发光杆菌 <i>P. leiognathi</i>
1.0	10	60	62
1.0	15	69	68
1.0	20	63	57

表3 蔗糖对发光细菌冻干粉制剂发光的影响
Table 3 Effect of sucrose on light emission of freeze-dried luminescent bacteria

NaCl (w/%)	脱脂牛奶 Skimmed milk (w/%)	蔗糖 Sucrose (w/%)	相对发光率 Relative luminosity (r/%)	
			明亮发光杆菌 <i>P. phosphoreum</i>	鳕鱼发光杆菌 <i>P. leiognathi</i>
1.0	15	0	65	68
1.0	15	3	85	93
1.0	15	6	95	97
1.0	15	9	92	95

恢复水或修复受损细胞^[15]。本研究选择蔗糖为糖醇类保护剂,能显著提高菌体的存活率。结果见表3,当蔗糖浓度为6%时,明亮发光杆菌和鳕鱼发光杆菌的相对发光率较高,与没有添加蔗糖相比发光强度分别提高30%和29%。蔗糖浓度偏低时,没有足够的羟基与菌体细胞膜磷脂中的磷酸基团或菌体蛋白质极性基团形成氢键,形成足够的水合层围绕菌体;蔗糖浓度偏高会增加溶液的稠度,影响冷冻剂中水的升华,使细胞的结构受损,细菌的存活数和生物活性会下降。所以,蔗糖保护剂浓度以6%较佳。

长期储存试验表明以1%的氯化钠、15%的脱脂牛奶、6%的蔗糖配制的保护剂溶液制作的明亮发光杆菌冻干粉和鳕鱼发光杆菌冻干粉,2 mo后复苏相对发光率分别为95%和97%,说明该保护剂能长期稳定地保持发光细菌的生物活性。

2.2 不同冷藏方式的发光细菌生物活性比较

2.2.1 3种冷藏方式的发光细菌生物活性比较 在线毒性检测应用中,需要在现场冷藏菌液,以便于连续取用、复苏并检测。处于不同状态的发光细菌或不同方式制作的发光细菌冷藏液,其生物活性的保持能力是不一样的。本研究对明亮发光杆菌和鳕鱼发光杆菌试验了3种冷藏液:①新鲜菌液冷藏,②冻干粉菌悬液冷藏,③脱脂牛奶菌悬液冷藏,结果见图1和图2。

由图1、图2可见,取对数生长期的明亮发光杆菌菌液和鳕鱼发光杆菌菌液直接冷藏,菌液复苏后发光强度较快下降,4 d后复苏,相对发光率分别小于60%和65%,菌活性的保持时间也较短,不适用于在线毒性检测仪长时间运行。明

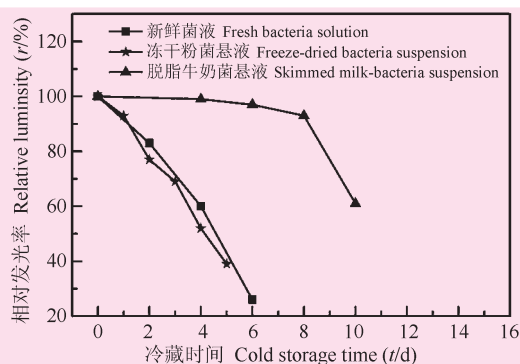


图1 明亮发光杆菌冷藏液发光强度变化

Fig. 1 Bioluminescent tendency variation of *P. phosphoreum* at 5 °C

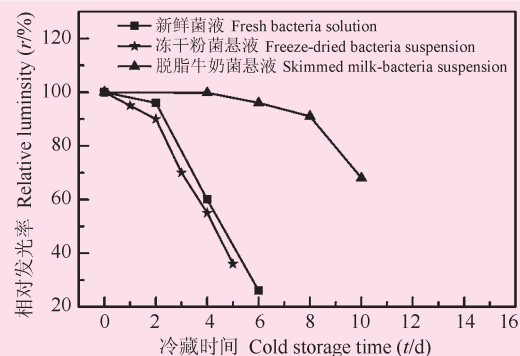


图2 鳕鱼发光杆菌冷藏液发光强度变化

Fig. 2 Bioluminescent tendency variation of *P. leiognathi* at 5 °C

亮发光杆菌和鳕鱼发光杆菌冻干粉菌悬液冷藏复苏,在1 d内发光强度变化不明显,发光率在90%以上,1 d后其发光率明显下降,冷藏4 d后复苏发光率也小于60%。而脱脂牛奶菌悬液冷藏10 d,7 d内发光率没有明显变化,d 8相对发光率分别为93%和95%,d 10相对发光率分别为61%和68%,d 8相对发光率才开始较明显下降,可见其菌体生物活性可以长时间地保持不变。

对第2种方法来说,在冷冻干燥过程中,微生物将经历冷冻和干燥两个过程。冷冻和干燥过程中会有部分菌体细胞损伤、死亡及某些蛋白酶分子钝化。通过添加保护剂可以改变生物样品冷冻干燥时的物理、化学环境,减轻冷冻干燥或复水的损害,但这并没有消除冷冻干燥和复水的损害^[15]。本实验采用的脱脂牛奶菌悬液冷藏复苏未经过冷冻和干燥,菌细胞就不会受到冷冻干燥和复水操作过程的损害,从而其生物活性比冻干粉复苏后冷藏的生物活性高。

脱脂牛奶菌悬液长时间冷藏能够维持菌体活性稳定是因为脱脂牛奶为一种胶体颗粒,属于动力学稳定系,沉降速度小,包裹菌体细胞可保持相当长的时间不致发生沉淀;且具有一定的粘度,扩散速度小,穿透率低而不能穿透半透膜,对菌体细胞内渗透压影响小,而保护了菌体细胞结构和功能的完整性。

2.2.2 脱脂牛奶对发光细菌冷藏复苏的影响 以冷藏7 d的发光细菌冷藏液复苏,比较不同浓度的脱脂牛奶对发光细菌冷藏液的影响,结果见图3。

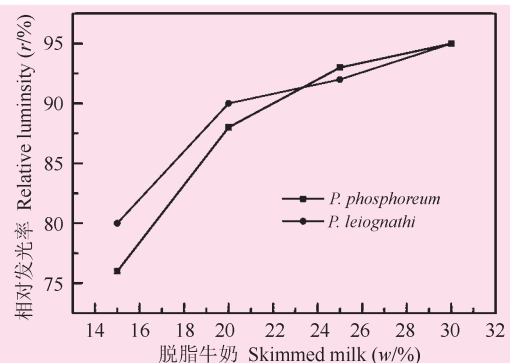


图3 脱脂牛奶浓度对发光细菌冷藏液的影响

Fig. 3 Effect of skimmed milk concentration on light emission of luminescent bacteria at 5 °C

由图3可见,脱脂牛奶浓度在15%~25%时,明亮发光杆菌和鳕鱼发光杆菌的发光强度随着脱脂牛奶的浓度的升高而明显增加,当脱脂牛奶浓度大于25%,发光强度增加不明显。因为随着脱脂牛奶浓度的增加,菌悬液的粘稠度也增加,造成光散射和增加分析仪中输运阻力等问题,产生较大检测误差。所以选择25%的脱脂牛奶作为明亮发光杆菌和鳕鱼发光杆菌的保护剂。

3 结论

发光细菌的活性稳定性是影响发光细菌检测毒性(尤其是在线检测应用)技术的重要环节。对于长期保存而言,冻干粉是一种有效菌种保藏方法。本文结果表明,冻干过程中应加入脱脂牛奶、蔗糖两类保护剂,才能达到较高的存活

率和生物活性. 对于在线检测需实时冷藏发光细菌, 菌制剂以菌液形式存在. 但不同冷藏液制备方法会影响到复苏后发光细菌的活性. 结果表明, 新鲜菌液冷藏, 4 d后复苏相对发光率小于60%, 细菌活性下降迅速; 冻干粉菌悬液冷藏, 发光强度也下降迅速, 4 d后复苏相对发光率小于60%; 脱脂牛奶菌悬液冷藏1 wk后, 相对发光率仍能达到93%. 说明脱脂牛奶菌悬液活性保持最好. 另外, 脱脂牛奶保护剂剂量应在25%左右, 较适合于在线毒性检测仪运行.

References

- 1 ISO/TC 147. ISO 11348-1-1998. Water quality - determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (luminescent bacteria test) - part 1: Method using freshly prepared bacteria. Switzerland, 1998
- 2 ISO/TC 147. ISO 11348-2-1998. Water quality - determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (luminescent bacteria test) - part 2: Method using liquid-dried bacteria. Switzerland, 1998
- 3 ISO/TC 147. ISO 11348-3-1998. Water quality - determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (luminescent bacteria test) - part 3: Method using freeze-dried bacteria. Switzerland, 1998
- 4 SBTS. GB/T 15441-1995. Water quality - Determination of the Acute Toxicity-luminescent Bacteria Test. Beijing, China: Standards Press of China (北京: 中国标准出版社), 1995
- 5 Yan P (闫鹏), Li BX (李百祥), Wang DC (王德才), Song JP (宋建平). The study on using the bacterium luminescent biosensors to detect the acute toxicity of pollutants. *Chin J Public Health Engin* (中国卫生工程学), 2002, **1** (2): 65~68
- 6 Liu W (刘伟). Study on the microbiosensor technology responding to the attack of chemicals and microbial: [Doctoral dissertation]. Shanghai, China: East China Normal University (上海: 华东师范大学出版社), 2007
- 7 Zhang D (张迪). Acute toxicity determination device based on photoelectric detection technology. *Instrum Tech & Sens* (仪器技术与传感器), 2008 (7): 75~77
- 8 Hulanicki A, Glab S, Ingman F. Chemical sensors definition and classification. *Pure & Appl Chem*, 1991, **63** (9): 1247~1250
- 9 Chun UH, Simonov N, Chen YP, Britz ML. Continuous monitoring using *Photobacterium phosphoreum*. *Conserv & Recycl*, 1996, **18**: 25~40
- 10 Ahn JM, Kim CB, Gu MB. Characterization of *gltA::luxCDABE* fusion in *Escherichia coli* as a toxicity biosensor. *Biotechnol & Bioproc Engin*, 2006, **11**: 516~521
- 11 Bjerketorp J, Hakansson S, Belkin S, Jansson JK. Advances in preservation methods: Keeping biosensor microorganisms alive and active. *Curr Opin Biotechnol*, 2006, **17** (17): 43~49
- 12 Wu ZR (吴自荣). 发光细菌冷冻干燥制剂的制备及其在环境监测中的应用. *Environ Monit China* (中国环境监测), 1993, **9** (3): 21~22
- 13 Zhu WJ (朱文杰), Zheng TL (郑天凌), Li WM (李伟民). Luminous Bacteria and Environmental Monitoring. Beijing, China: China Light Industry Press (北京: 中国轻工业出版社), 2009
- 14 Palmfeld J, Radstrom P, Hahn-Hagerdal B. Optimisation of initial cell concentration enhances freeze-drying tolerance of *Pseudomonas chlororaphis*. *Cryobiology*, 2003, **47** (1): 21~29
- 15 Yang JP (杨甲平), Li ZX (李志西), Jiang XZ (姜晓芝), Feng XY (冯歆轶), Li HR (李红蕊), Zhao XY (赵晓野). Study on freeze drying condition of acetic acid bacteria. *China Brew* (中国酿造), 2008, **20** (197): 49~52