

# 菌液状态对青海弧菌 Q67 急性生物毒性测试的影响

王 娜, 王晓昌, 马晓妍

(西安建筑科技大学环境与市政工程学院, 陕西 西安 710055)

**摘要:** 为了研究菌液状态对发光细菌急性毒性测试结果重现性的影响, 实验选取  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 、三氯异氰尿酸、十二烷基苯磺酸钠四种化学物质对不同状态的青海弧菌(*Vibrio Qinghaiensis* sp.- Q67)菌悬液进行急性毒性测试. 结果表明: 利用储存时间不同的菌种培养 8.5 h 或储存时间相同的菌种分别培养 8.5 h、9.0 h、10.0 h 获得的 Q67 菌悬液进行急性生物毒性测试, 结果差异均较大. 为了进一步探讨其中的原因, 对实验所用菌悬液的 pH、相对发光值(RLU)、OD600 值(菌液密度指标)进行检测发现: 菌液的 pH 差异不大, 发光值和 OD600 值存在较大的不同. 因此, 发光值和 OD600 值是影响实验重现性的主要因素, 而菌液的 OD600 值影响其发光值. 因此, 严格控制试验菌液的 OD600 值对提高实验的重现性具有重要意义.

**关键词:** 青海弧菌; 急性生物毒性; 菌液状态; 重现性; OD600 值

**中图分类号:** X502

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1006-7930(2014)04-0583-05

青海弧菌是由中国科学家朱文杰从青海湖一种无鳞鱼-裸鲤体表分离得到的一种淡水型发光菌(*Vibrio qinghaiensis* sp. — Q67). 由于其在实验中无需额外添加盐同时灵敏度可与海洋发光细菌相媲美, 因而被广泛应用于水质毒性检测、突发性污染监测、食品的安全性监测等诸多方面<sup>[1-3]</sup>.

在发光细菌生物毒性检测方法中, 一般是利用细菌生长曲线选取对数中后期对应的时间段作为细菌的培养时间<sup>[4-6]</sup>. 由于选用的培养基不同, 已经报道的 Q67 菌液经 8~10 h<sup>[7-8]</sup>或者 16~18 h<sup>[9-11]</sup>的培养均处于对数中后期, 并可应用于毒性实验. 若仅从培养时间来确定菌液的培养终点, 实验结果会出现较大差异. 如: 不同的研究者得出的  $\text{Cd}^{2+}$  对于 Q67 的  $\text{EC}_{50}$  值有 3.9 mg/L、5.029 mg/L、8.887 mg/L<sup>[12-14]</sup>.

为了减少实验差异, 需寻找一个可标准化操作的指标来控制 Q67 测试菌液的状态. 不同的物质对于青海弧菌的作用机理不同, 因此实验选取了两种重金属:  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ , 一种常用卤素类杀菌剂: 三氯异氰尿酸(TCCA)和生活污水中常见的阴离子表面活性剂: 十二烷基苯磺酸钠(SDBS)进行生物毒性试验, 通过对实验所用菌液的相关参数的检测(pH 值、RLU 值、OD600 值)探究影响急性生物毒性实验结果的因素.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验试剂与配制

TCCA(纯度大于 97%)购于阿拉丁试剂(上海)有限公司; SDBS(分析纯)、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (分析纯)、 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ (分析纯)均购于国药集团化学试剂有限公司.

已知化学物质用超纯水配制成一定浓度的母液, 储存于 4 °C 冰箱, 储存时间不超过 3 d. 测试样品现配现用.

### 1.2 实验仪器

CentroLIA LB962 微孔板式发光检测仪(德国 Berthold Technologies 公司); 8 通道移液器(10~100 uL)、100~1 000 uL 移液枪(德国 Eppendorf 公司); TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司); PHS-3C 型精密酸度计(上海大普仪器有限公司).

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 菌液的培养

青海弧菌 Q67(购自北京滨松光子技术股份有限公司)的培养采用可以得到较高菌生物量和对菌内荧光酶含量有利的培养基. 该培养基成分为: 胰胨 0.5%; 酵母膏 0.5%; 甘油 0.3%;  $\text{MgCl}_2$  0.32%; KBr 0.02%;  $\text{CaSO}_4$  0.01%; NaCl 0.4%; KCl 0.4%; pH 为  $8.5 \pm 0.5$ , 培养温度为  $22\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ <sup>[7-8]</sup>. 将 4 °C 保存的青海弧菌 Q67 斜面菌种转接到 50 mL 液体培养基中, 放置在恒温震荡培养箱( $22\text{ °C}$ , 120 转/min)培养一定的

收稿日期: 2013-10-06 修改稿时间: 2014-07-29

基金项目: 国家自然科学基金重大国际合作项目(51021140002)

作者简介: 王娜(1981-), 女, 博士生, 主要从事生物毒性方面的研究. E-mail: wangna811221@126.com

时间.

### 1.3.2 急性生物毒性测试

将菌悬液加入一定量的超纯水缓慢稀释至RLU值约300~400万备用<sup>[15]</sup>.根据预实验得到的浓度范围,将待测样品设计为12个几何级数浓度梯度,使得其产生的发光强度抑制率在 $EC_{10} \sim EC_{90}$ 均匀分布<sup>[16]</sup>.发光检测在CentroLIA LB962微孔板式发光检测仪上进行.实验所用试液总体积为200  $\mu\text{L}$ ,在96孔板第1横排的12个孔分别加入100  $\mu\text{L}$ 空白样品(超纯水),第2排12个孔分别加入100  $\mu\text{L}$ 已知化学物质的浓度梯度样品,第3~4排为第2排样品的平行样.然后用Eppendorf 8通道移液器加入菌液100  $\mu\text{L}$ ,振荡30 s.细菌暴露于样品中15 min后,用CentroLIA LB962发光检测仪测量各孔样品发光值(每孔测定时间为0.3 s).每板重复两次.每种物质急性生物毒性试验使用不同批次菌液测试三次.三次试验结果偏差需小于10%.采用12个空白样品的发光强度平均值( $R_0$ )与检测样品3个平行样品的发光强度平均值( $R$ )计算样品的发光抑制率 $I$ .计算公式如等式(1):

$$I = [(R_0 - R) / R_0] \times 100 \% \quad (1)$$

以发光抑制率为50%时的样品浓度,即半效应浓度 $EC_{50}$ 值,作为衡量化学物质生物毒性大小的指标. $EC_{50}$ 值通过物质的浓度-抑制率关系曲线方程计算得到.

### 1.3.3 菌液各相关参数测定

pH值的测定采用PHS-3C型精密酸度计.发光值(RLU):用Eppendorf 8通道移液器分别添加100  $\mu\text{L}$  Q67菌液至96孔板的12个孔中,利用CentroLIA LB962发光检测仪测定菌液发光值.单孔曝光的时间为0.3 s.用12个单孔发光值的平均值作为菌液的发光值.菌密度的测定采用紫外分光光度计检测Q67菌液在600 nm处的吸光值,以超纯水为空白对照.

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同储存时间急性生物毒性测试结果

采用储存前期(第7 d、8 d、9 d)和储存后期(第20 d、21 d、22 d)的Q67菌种接种于培养基中震荡培养8.5 h得到的菌悬液进行急性

生物毒性测试.如图1所示,储存时间不同的菌种经过相同时间的培养后,用其测定四种物质急性生物毒性的结果差异均很大.经过8.5 h的培养,储存前期的菌种对于四种物质的急性生物毒性反映更灵敏.不同物质反映出来的毒性大小的差异不尽相同,其中 $\text{Zn}^{2+}$ 差异最大.用储存前期与后期的菌种测定 $\text{Zn}^{2+}$ 的 $EC_{50}$ 值分别为 $0.46 \pm 0.02 \text{ mg/L}$ 、 $2.63 \pm 0.13 \text{ mg/L}$ ,后者为前者的5.4倍.差异较小的为氟硅唑,利用储存前期与后期的菌种测定氟硅唑的 $EC_{50}$ 值分别为 $22.15 \pm 1.55 \text{ mg/L}$ 、 $28.49 \pm 1.99 \text{ mg/L}$ .采用储存后期的菌种得到的菌悬液测定氟硅唑的 $EC_{50}$ 值比前期的高29%.这可能是由于菌种随着储存时间的增长细胞活性降低<sup>[17-18]</sup>,因此存储时间不同的菌种经相同时间的培养获得的菌液的状态不同,

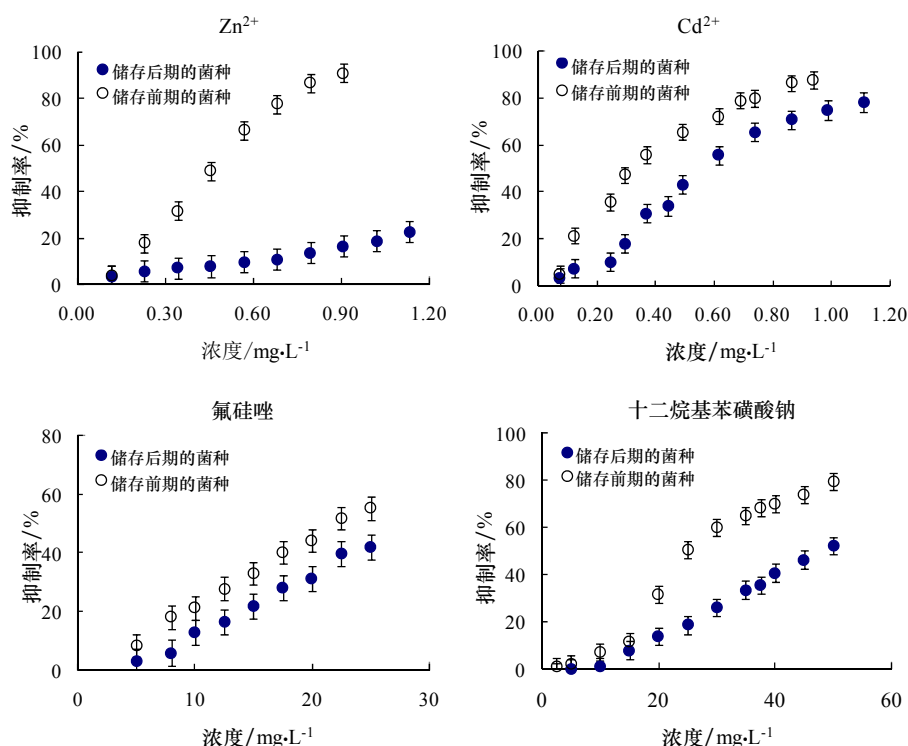


图1 两种储存时间Q67培养菌液的剂量效应关系

Fig.1 The concentration-response curves of four chemicals using Q67 bacterium suspension with two storage time

无法获得重现性良好的生物毒性结果. 这里的状态主要指细菌在生长周期内所处的阶段和培养基中剩余营养物质的量.

## 2.2 不同培养时间急性生物毒性测试结果

采用储存后期(第20 d、21 d、22 d)的Q67菌种接种于培养基内分别培养8.5 h、9.0 h、10.0 h(均处于对数中后期)得到的菌悬液进行急性生物毒性测试. 如图2所示, 利用储存时间相同的菌种经过不同时间的培养获得的Q67菌液进

行急性生物毒性测试, 结果差异仍很大. 随着培养时间的增加, 菌液的急性生物毒性灵敏性增强. 当培养时间由8.5 h增加至9.0 h, 菌液对四种物质表现出来的毒性差异显著, 尤其是 $Zn^{2+}$ . 使用培养8.5 h、9.0 h的菌液测定 $Zn^{2+}$ 的 $EC_{50}$ 值分别为 $2.634 \pm 0.132$  mg/L、 $0.898 \pm 0.045$  mg/L, 前者为后者的2.9倍. 差异最小的为氟硅唑. 使用培养8.5 h、9.0 h的菌液测定氟硅唑的 $EC_{50}$ 值分别为 $28.489 \pm 1.994$  mg/L、 $24.979 \pm 1.749$  mg/L, 两者相差14%. 当培养时间由9.0 h增加至10.0 h时, 生物毒性结果仍然

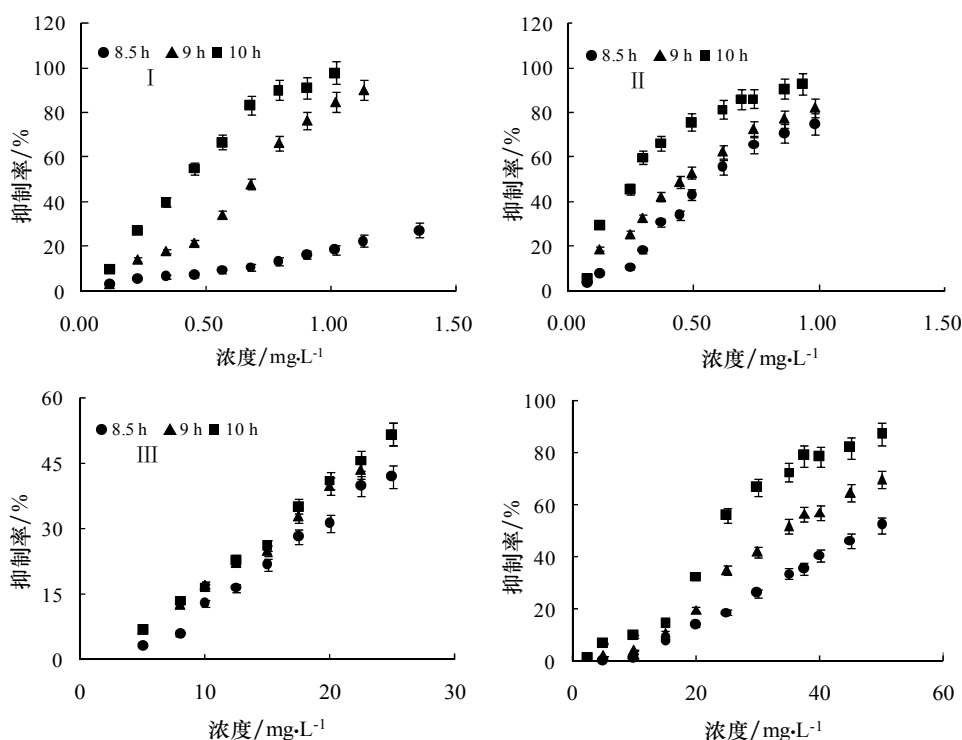
存在较大差异. 以十二烷基苯磺酸钠为例: 培养9.0 h、10.0 h的菌液测定其 $EC_{50}$ 分别为 $35.720 \pm 2.143$  mg/L、 $24.815 \pm 1.489$  mg/L, 两者相差44%. 由上可知: 在菌种储存时间一定的情况下, 培养时间对菌液的状态有很大影响.

综上所述, 利用培养时间来界定Q67培养终点, 很难保证每次实验菌液状态相同, 无法获得重现性良好的急性生物毒性测试结果.

## 2.3 Q67菌液状态特性参数比较

Q67菌悬液作为急性生物毒性实验的受试体, 其状态会对实验结果产生重要影响. 为了探明上述实验结果出现重大差异的原因, 对实验所用菌悬液的特性参数进行了同步检测. 结果如表1所示. 其中, A、B系列为图1对应菌悬液的参数, B、C、D系列为图2对应菌悬液的参数.

由表1可以看出: A、B、C、D四系列菌液的pH值在7.20~7.35之间波动, 变化不大, 因此, pH值不是影响实验结果的主要因素. 四个系列菌液的RLU和OD600存在较大的差异. 由B、C两系列可以看出, 两种菌液的RLU值在同一数量级上, 但图2表现出来的急性生物毒性结果差异很大. A、D两系列菌液的发光值均为大于 $2.0 \times 10^9$ , 已超过仪器的检测限, 结合图1、图2可知, 两者的急性生态毒性测验的结果仍然是存在一定差异的. 另外, 以OD600值表示的菌密度和RLU具有一定的正相关性<sup>[19]</sup>. 发光细菌通过释放的自诱导物 $\beta$ -己酮高丝氨酸内酯感知菌群密度水平<sup>[20]</sup>, 当发光细菌生长密度到达一定水平时, 经过一系列诱导途径, 维持菌液发光<sup>[21]</sup>. 因此OD600可以影响菌液的发光情况, 表现为RLU值的变化. A、B、C、D四系列菌密度存在明显的不同, 是引起实验结果差异的主要因素. 菌密度与培养时间具有一定的函数关系即为菌液的生长曲线, 它在一定程度上反映了菌液的生长状态<sup>[22]</sup>. 由A、D系列可知: 储存时间较长的菌种虽然



注: 图 I、II、III、IV 分别为  $Zn^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$ 、氟硅唑和十二烷基苯磺酸钠的剂量效应图

图2 3种培养时间条件下Q67培养菌液的剂量效应关系

Fig.2 The concentration-response curves of four chemicals using bacteria with three culture time

生长速度较慢,但经过一段时间的培养仍然可以达到与储存时间较短的菌种同样的生长状态.控制了菌密度即可控制菌液的生长状态,每次实验的菌液的性质才能相对稳定,从而可减小实验的差异.因此用菌密度代替培养时间作为控制新鲜培养Q67菌液生长终点的指标是可行的.

表 1 不同条件下 Q67 菌液的特性参数比较  
Tab.1 The comparison of characteristic parameters of Q67 bacterium suspension under different conditions

类别	组别	菌种储存时间/d	培养时间/h	pH	RLU( $\times 10^9$ )	菌密度(OD600)
A 系列	1	7	8.5	7.24	>2.0	2.534
	2	8		7.20	>2.0	2.546
	3	9		7.25	>2.0	2.494
B 系列	1	20	8.5	7.30	0.13	1.521
	2	21		7.25	0.13	1.500
	3	22		7.23	0.13	1.535
C 系列	1	20	9.0	7.32	0.21	1.834
	2	21		7.35	0.21	1.856
	3	22		7.29	0.21	1.820
D 系列	1	20	10.0	7.28	>2.0	2.350
	2	21		7.30	>2.0	2.328
	3	22		7.26	>2.0	2.276

注: CentroLIA LB962 发光检测仪对于发光值的检测限为  $2.0 \times 10^9$ .

3 结论

- (1)斜面保存的 Q67 菌种的活性受保存时间的影响很大,储存前期和后期的菌种在相同的培养时间下获得的急性生物毒性结果差异很大.
- (2)储存时间相同的菌种经不同时间的培养在进行急性生物毒性检测时,实验结果差异仍很大.
- (3)菌液的菌密度及发光是影响实验重现性的主要因素.菌密度影响菌液的发光情况.
- (4)在发光细菌急性生物毒性检测方法中,采用 OD600 值代替培养时间作为确定 Q67 菌液培养终点的控制指标,其操作将更加标准化、简便化,有利于减少不同实验人员间检测结果的差异.

参考文献 References

[1] 朱文杰, 徐亚同, 张秋卓, 等. 发光细菌法在环境污染物监测中的进展与应用[J]. 净水技术, 2010, 29(04): 54-59.  
ZHU Wenjie, XU Yatong, ZHANG Qiuzhuo, et al. Application and development of monitoring with luminous bacteria for environmental pollutants[J]. Water Purification Technology, 2010, 29(04): 54-59.

[2] 阎鹏, 孙礼. 利用发光菌快速检测环境污染物急性毒性的研究概况[J]. 环境与健康杂志, 2001, 18(04): 250-252.  
YAN Peng, SUN Li. Survey of study on rapid determination of acute toxicity of environmental pollutants by luminescent bacteria[J]. Journal of Environment and Health, 2001, 18(04): 250-252.

[3] 马勇, 黄燕, 贾玉玲, 等. 发光细菌急性毒性测试方法的优化研究[J]. 环境污染与防治, 2010, 32(11): 48-52.  
MA Yong, HUANG Yan, JIA Yuling, et al. Improved acute toxicity test method for luminescent bacteria[J]. Environmental pollution & control, 2010, 32(11): 48-52.

[4] ZHU Xiangwei, LIU Shushen, Ge Huilin, et al. Comparison between the short-term and the long-term toxicity of six triazine herbicides on photobacteria Q67[J]. Water Research, 2009, 43(6): 1731-1739.

[5] ZHOU Xuefei, SANG Wenjing, LIU Shushen, et al. Modeling and prediction for the acute toxicity of pesticide mixtures to the freshwater luminescent bacterium vibrio qinghaiensis sp.-Q67[J]. Journal of Environmental Sciences, 2010, 22(3): 433-440.

[6] ZHANG Yahui, LIU Shushen, SONG Xiaoqing, et al. Prediction for the mixture toxicity of six organophosphorus pesticides to the luminescent bacterium Q67[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2008, 71(3): 880-888.

[7] MA X Y, WANG X C, LIU Y J. Study of the variation of ecotoxicity at different stages of domestic wastewater treatment using Vibrio-qinghaiensis sp.-Q67[J]. Journal of Hazardous Materials, 2011, 190(1/3): 100-105.

[8] MA X Y, WANG X C, LIU Y J. Cytotoxicity and genotoxicity evaluation of urban surface waters using freshwater luminescent bacteria Vibrio-qinghaiensis sp.-Q67 and Vicia faba root tip[J]. Journal of Environmental Sciences, 2012, 24(10): 1861-1866.

[9] ZHANG Jin, LIU Shushen, DOU Rongni, et al. Evaluation on the toxicity of ionic liquid mixture with antagonism and synergism to Vibrio qinghaiensis sp.-Q67[J]. Chemosphere, 2011, 82(7): 1024-1029.

[10] ZHANG Jin, LIU Shushen, LIU Hailing, et al. A novel method dependent only on the mixture information (MIM) for evaluating the toxicity of mixture[J]. Environmental Pollution, 2011, 159(7): 1941-1947.

[11] ZHU Xiangwei, LIU Shushen, QIN Litang, et al. Modeling non-monotonic dose-response relationships: Model evaluation and hormetic quantities exploration[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2013, 89(1): 130-136.

[12] 邓辅财, 刘树深, 莫凌云. 部分重金属化合物对淡水发光菌的毒性研究[J]. 生态毒理学报, 2007, 2(4): 402-408.  
DENG Fucui, LIU Shushen, MO Lingyun. Toxicities of selected heavy metal compounds and their mixtures to photobacteria(Vibrio-qinghaiensis sp.-Q67) [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2007, 2(4): 402-408.

[13] 宋晓青, 刘树深, 刘海玲, 等. 部分除草剂与重金属混合物对发光菌的毒性[J]. 生态毒理学报, 2008, 3(3): 237-243.

- SONG Xiaoqing, LIU Shushen, LIU Hailing, et al. Mixture Toxicity of Herbicides and Heavy Metal Compounds to Photobacteria (*Vibrio qinghaiensis* sp.-Q67) [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2008, 3(3): 237-243.
- [14] 熊蔚蔚, 吴淑杭, 徐亚同, 等. 等毒性配比法研究镉、铬和铅对淡水发光细菌的联合毒性[J]. 生态环境, 2007, 16(4): 1085-1087.
- XIONG Weiwei, WU Shuhang, XU Yatang, et al. The joint toxicity effects of cadmium, chromium and lead on luminescent bacteria [J]. Journal of Ecology and Environment, 2007, 16(4): 1085-1087.
- [15] 马梅, 童中华, 王子健, 等. 新型淡水发光菌(*Vibrio qinghaiensis* sp. — Q67)应用于环境样品毒性测试的初步研究[J]. 环境科学学报, 1998, 18(1): 88-93.
- MA Mei, TONG Zhonghua, WANG Zijian, et al. Application of new type of fresh water Luminescent bacterium (*Vibrio qinghaiensis* sp. — Q67) for toxicity bioassay [J]. Acta scientiae circumstantiae, 1998, 18(1): 88-93
- [16] ZHANG J, LIU, S S, LIU H L. Effect of ionic liquid on the toxicity of pesticide to *Vibrio-qinghaiensis* sp.-Q67. [J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 170(2/3): 920-927.
- [17] 孟翔, 胡俊杰, 冀卫荣, 等. 万寿菊根乙酸乙酯粗提物对枣缩果病的抑菌稳定性研究[J]. 植物保护, 2013, 39(2): 72-76.
- MENG Xiang, HU Junjie, JI Weirong, et al. Studies on the stability of the extract from the roots of tagetes erecta on fruit shrivel disease of Ziziphus jujuba[J]. Journal of Plant Protection, 2013, 39(2): 72-76.
- [18] 潘峰, 刘鹏鹏, 时蕾, 等. UMU 试验菌种保存条件优化研究[J]. 环境污染与防治, 2008, 30(10): 48-50+54.
- PAN Feng, LIU Kunpeng, SHI Lei, et al. Optimization of the preservation condition of umu test strain [J]. Environmental Pollution & Control, 2008, 30(10): 48-50+54.
- [19] 郑敬民, 赵曙霞, 朱文杰, 等. 环境因子对青海弧菌生长和发光的影响[J]. 华东师范大学学报:自然科学版, 1999(1): 99-103.
- ZHENG Jingmin, ZHAO Shuxia, ZHU Wenjie, et al. The Influence of environmental factors on the growth and luminescence of vibrio qinghaiensis sp. Nov. [J]. Journal of East China Normal University (Natural Science Edition) 1999(1): 99-103.
- [20] HOUDT R V, MOONS P, AERTSEN A, et al. Characterization of a luxI/luxR-type quorum sensing system and N-acyl homoserine lactone-dependent regulation of exo-enzyme and antibacterial component production in *Serratia plymuthica* RVH1[J]. Research in Microbiology, 2007, 158(2): 150-158.
- [21] 周世明, 舒为群, 赵清. 发光菌在水环境污染检测中的应用研究进展[J]. 环境与健康杂志, 2007, 24(10): 837-839.
- ZHOU Shiming, SHU Weiqun, ZHAO Qing. Advances in luminescent bacteria toxicity test of pollutants in aqueous environment[J]. Journal of Environment and Health, 2007, 24(10): 837-839.
- [22] 马勇, 季祥, 蔡禄. 2种测定产油酵母菌生长曲线方法的比较[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(14): 8202-8203+8233.
- MA Yong, JI Xiang, CAI Lu. Comparison on the two determination methods of growth curve of oleaginous yeast[J]. Journal of Anhui Agriculture and Science, 2011, 39(14): 8202-8203, 8233.

## The influence of the state of bacterium suspension on the acute toxicity test using fresh luminescent bacterium *Vibrio Qinghaiensis* sp.-Q67

WANG Na, WANG Xiaochang, MA Xiaoyan

(School of Environmental and Municipal Engineering, Xi'an Univ. of Arch. & Tech., Xi'an 710055, China)

**Abstract:**  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ , trichloroisocyanuric acid and sodium dodecyl benzene sulfonate were selected to detect the impact about the state of bacterium suspension on the reproducibility of acute toxicity tests with luminescent bacterium *Vibrio Qinghaiensis* sp.-Q67 as test bacterium. The great variations of the toxicity of the four chemicals on Q67 were observed, using either the bacterium suspension which was cultivated for 8.5 h with different storage time of strains or the same storage time of strains which was cultivated for 8.5, 9.0 and 10 hrs respectively. The parameters of Q67 suspension, such as pH, relative light unit (RLU) and bacterial density (OD600), were detected to discuss the reasons of the great variations obtained in the results. It showed that there was slight distinction in the pH of bacterium suspension at different growth stage but significant changes of the OD600 value and RLU value which showed their significant influence on the reproducibility of the tests. Since the OD600 could affect the RLU value of bacterium suspension, it is necessary to identify the OD600 of Q67 bacterium suspension in order to obtain the good reproducibility of acute toxicity test.

**Key words:** *vibrio Qinghaiensis* sp.-Q67; acute toxicity; the state of bacterium suspension; reproducibility; OD600

(本文编辑 沈波)