

# 发光细菌法在环渤海污水样品遗传 毒性检测中的应用\*

崔志松<sup>1,2</sup> 栾晓<sup>2</sup> 高伟<sup>2</sup> 李倩<sup>2</sup> 杨官品<sup>1</sup> 郑立<sup>2</sup>

(1. 中国海洋大学海洋生命学院 青岛 266003; 2. 国家海洋局第一海洋研究所海洋生态研究中心 青岛 266061)

**摘要** 建立了以经过遗传改造的发光细菌 *Acinetobacter* sp. RecA 为受试物种的环境污染物遗传毒性快速检测方法, 该方法最快可在 3h 内得到毒性评价结果。采用该方法评价了环渤海排污口 12 份污水样品的遗传毒性。环渤海 12 个排污口的污水样品均表现出了不同水平的遗传毒性, 并呈现出一定的分布特征。其中, 高毒水质集中出现在山东半岛污水样品中, 中毒水质集中出现在辽东半岛地区, 而低毒水质主要集中于京津冀地区。综上, 在环渤海的污水样品遗传毒性检测中, 这种新型发光细菌法具有快速、灵敏、简便等优点, 可为以后近海环境的水质生物毒性检测提供参考依据, 具有应用于近海环境水质快速监测与评价的潜力。

**关键词** 发光细菌; 污水; 毒性检测; 渤海

**中图分类号** X55 **doi:** 10.11693/hyhz20140500146

环渤海经济圈为中国经济的第三个隆起地带(李立华, 2004), 在对环渤海经济开发的同时, 一些工业废水、生活污水的排放造成环渤海的生态环境恶化, 受污染的水质严重威胁人类健康、渔业和生态系统安全。人类向环渤海的海域中排放了大量具有遗传毒性的“三致”(郑相宇等, 2004)污染物, 危害人类的健康, 对渤海水质的遗传毒性进行快速、有效的监测, 可为降低生态健康风险提供技术支撑。传统的化学分析方法虽然数据准确可靠, 但是对于恶化的水质中的有机混合物, 检测过程费力费时而且昂贵, 对于一些突发意外事故, 例如兰州饮用水苯超标事件, 化学检测法面临着挑战。生物传感器在这方面是一个补充, 检测方法操作简便、成本低, 适于现场快速和高通量应用, 且能反映样品中毒性物质间的拮抗、加合和协同作用(Sorensen *et al.*, 2006)。

发光细菌法(luminescence bacteria test, LBT)常被用作早期预警系统。其中国家标准 GB/T 15411-1995 提出了用明亮发光杆菌 T3 小种作为水质急性毒性的

检测方法。还有重金属污染土壤的检测方法(李彬等, 2001), 那广水等(2010)采用发光细菌检测排污口的总有机污染物的急性毒性等, 都是使用 T3 作为供试菌种。ADPWH\_ALK 发光细菌被应用于检测大连溢油的生物毒性检测(Zhang *et al.*, 2013), 越来越多的发光细菌作为生物传感器检测水质、土壤等受污染的状况。

经遗传改造的不动杆菌 RecA 菌株(*Acinetobacter* sp. RecA)的染色体上具有 recA 基因(毛裕民等, 1989)与发光基因 *luxCDABE* 基因(茆婷等, 2009)的融合结构。*luxCDABE* 基因最初由土壤微生物 *Photobacterium luminescens* 中发现并分离得到(何文杰等, 2007), *luxCDABE* 不含启动子, 转录受其上游的 recA 基因控制, *luxCDABE* 基因编码荧光素酶, 在荧光素酶作用下, FMNH<sub>2</sub> 和 RCHO 被 O<sub>2</sub> 氧化, 产生的能量并不被生物体储存, 而是通过光的形式释放出来。丝裂霉素 C (Mitomycin C, 以下简称 MMC)是一种常见的遗传毒物。当细胞暴露于遗传毒物引起 DNA 受损时, recA 基因与 DNA 损伤修复相关。虽然不动杆菌的

\* 科技部科技基础性工作专项, 2012FY130300 号; 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金, 2014G12 号。崔志松, 博士, 副研究员, E-mail: czs@fio.org.cn

通讯作者: 郑立, 研究员, E-mail: zhengli@fio.org.cn

收稿日期: 2014-05-18, 收修改稿日期: 2014-09-17

recA 基因的作用机制尚不清晰, 但有研究表明其具有与大肠杆菌中 recA 基因类似的功能(Greggijolly *et al*, 1994; Hare *et al*, 2006), 因此 recA 基因的表达将引起 *luxCDABE* 基因大量表达荧光素酶, 通过仪器测量其光强, 即实现生物传感功能。

环渤海受污染的水质中, 重金属、石油烃等污染物含量不尽相同, 所具有的总遗传毒性也不相同, 本文采用经过遗传改造的不动杆菌 RecA(宋一之等, 2010)对环渤海的 12 个排污口污水样品的遗传毒性进行快速检测和评价, 为今后近海海洋环境的监测提供技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 仪器设备** 单管式化学发光检测仪(德国 Berthold 公司, Lumat LB9507), 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司, SW-CJ-1FD), 恒温培养摇床(上海一恒科学仪器公司, THZ-100 bluepard), 分光光度计(尤尼柯上海仪器有限公司, Unico WFJ2000), 自动灭菌锅(日本 Tomy SS-325), pH 计(梅特勒-托利多仪器有限公司, FE20), 盐度计(EUTECH

instruments)。

**1.1.2 供试菌种** 采用经遗传改造的不动杆菌 RecA 菌株(*Acinetobacter* sp. RecA)作为发光细菌对环渤海污水样品进行生物毒性检测。

**1.1.3 发光细菌培养基** LB\_K 培养基, Tryptone (Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England) 10g, Yeast (Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England) 5g, NaCl (沪试, AR) 10g, pH 7.0, 121°C 灭菌后添加卡那霉素(北京方程, Sigma 试剂)至终浓度 10  $\mu$ g/mL。

**1.1.4 环渤海排污口样品** 污水样品采自环渤海排污口的 12 个站点, 分别是受污染较为严重的河道、锌厂、造纸厂等, 其地理位置见图 1。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 水样的采集和前处理** 采用 500mL 棕色瓶采集污水样品, 低温运输到实验室后立即进行生物毒性测试。采用纯净水作为现场空白样。

**1.2.2 发光细菌的准备** 采用接种环将甘油冻存的发光细菌 RecA 在 LB\_K 平板上划线, 经培养后从平板上挑取 RecA 单菌落接种到 50mL LB\_K 液体培养基中, 于恒温摇床中 30°C、150r/min 振荡培养 16h, 所得菌液保存于 4°C, 此液为种子液。

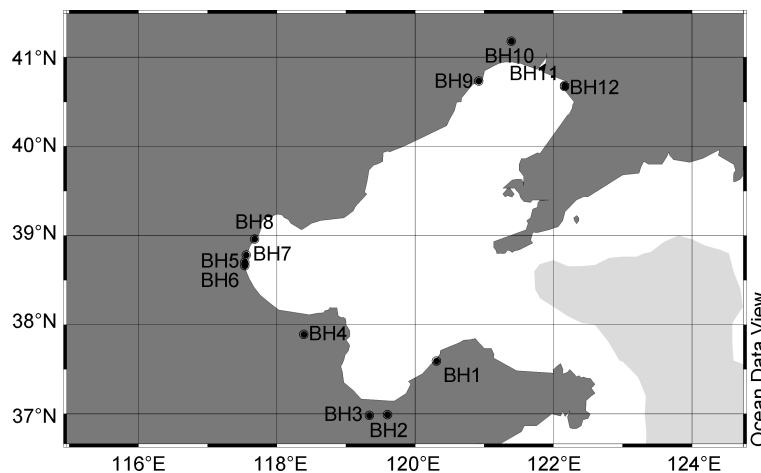


图 1 采样站位区域分布图

Fig.1 Distribution of the sampling sites in the Bohai Sea

取 1mL 种子液接种到 50mL LB\_K 中, 于恒温摇床中 30°C、150r/min 振荡培养 16h, 测定 OD<sub>600</sub> 值, 以确定达到平台期。所得菌液及时使用, 此为检测污染物生物毒性实验用的菌液。

**1.2.3 遗传毒性测试体系** 采用无菌水作为遗传毒性检测过程中的阴性对照样品。分别采用 0.02、0.1、0.2、1、2mg/L 的 MMC 作为遗传毒性检测过程中的

阳性对照样品。前期研究表明, RecA 在稀释 100 倍时, 对 MMC 的响应最明显。

RecA 进行遗传毒性检测的体系为: 10 $\mu$ L 重悬菌液 + 990  $\mu$ L 污水样品(或阳性对照、阴性对照)。

所有检测污水样品及对照样品均设置 3 个平行。

**1.2.4 盐度对 RecA 发光曲线的影响** RecA 发光细菌对盐度敏感, 过大或者过小的盐度对发光会造

成明显影响,在污水样品测试过程中,不但需要维持阴性对照、阳性标准以及污水样品的盐度统一,还要选取适当的盐度,使得 RecA 的发光变化表现最明显。

盐度的调整使用 NaCl,每个阴性、阳性对照以及样品的盐度均调整为 35。

**1.2.5 污水样品遗传毒性的检测** 根据污水样品对菌株 RecA 在 3h 后的发光诱导率。

平均相对发光率(LR) = 样品或阳性对照平均相对发光量(RLU) / 空白对照平均相对发光量(RLU)

相对发光诱导率(IR) = LR - 1

得到回归线性方程,并查相关系数显著水平  $P$  值表,检验所求  $r$  值的显著水平  $P < 0.01$ ,所求的方程成立,反之不成立。根据回归方程计算污水样品中有毒污染物等效应的 MMC 浓度,并根据其等效浓度值确定遗传水平的大小。毒性分级情况详见表 1。

表 1 水质遗传毒性的分级

Tab.1 The genotoxicity classification of water quality

诱导率(IR)	等效应的 MMC 浓度(mg/L)	毒性分级
IR < 10	$C_{MMC} < 0.02$	低毒
10 < IR < 50	$0.02 < C_{MMC} < 0.2$	中毒
50 < IR < 200	$0.2 < C_{MMC} < 2$	高毒
IR > 200	$C_{MMC} > 2$	剧毒

## 2 结果与讨论

### 2.1 盐度确定实验

**2.1.1 盐度对 RecA 发光强度的影响** RecA 对于测试环境中的盐度有比较大的反应,每个样品的盐度不一样,势必会造成发光细菌的发光产生变化,应维持阳性对照以及样品中盐度的统一。如图 2 所示,盐度越低,RecA 随时间的发光值就会变得越大,

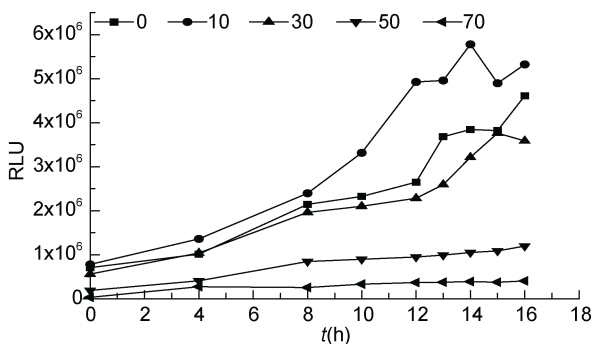


图 2 不同盐度下 RecA 发光细菌随时间的发光变化  
Fig.2 Luminescence changes in RecA luminous bacteria in different salinities over time

50、70 的盐度对 RecA 发光的影响虽然近似平稳,但是数值太低,实验中会出现较大的误差,0、5、10 盐度数值升高的幅度很大,但是发光并不稳定,发光快速升高的情况有可能抵消 RecA 被污染物质影响发光下降的情况。因此在遗传毒性检测的时候,选取 30 附近的盐度,发光趋于平稳,并且数值较大,可以反映遗传毒性的大小。

**2.1.2 污水样品的盐度测定结果** 使用盐度计测试污水样品的盐度,发现大部分站点的盐度偏低,如表 2 所示,仅有 BH5 和 BH10 两个站点的盐度接近 10,没有达到发光细菌表现的最适盐度,所以需要添加 NaCl 将污水样品组的盐度调整到 35,阳性对照组的盐度也是 35,从而实现相同盐度条件下发光细菌对阳性对照以及对样品的测定。

### 2.2 遗传毒性评价

**2.2.1 MMC 的阳性标准曲线** 不同浓度 MMC 的 IR 如图 3 所示。随着 MMC 浓度的增加,RecA 的发光增强呈现出明显的正相关关系,在 3h 时,通过公

表 2 12 个排污口的测定盐度和调整后的盐度  
Tab.2 The salinity measured and adjusted for all 12 outfalls

排污口	测定盐度	调整后盐度
BH1	2.2	35
BH2	3.3	35
BH3	2.7	35
BH4	0.6	35
BH5	9.6	35
BH6	1.6	35
BH7	4.9	35
BH8	5.2	35
BH9	3.5	35
BH10	12.4	35
BH11	0.7	35
BH12	1.3	35

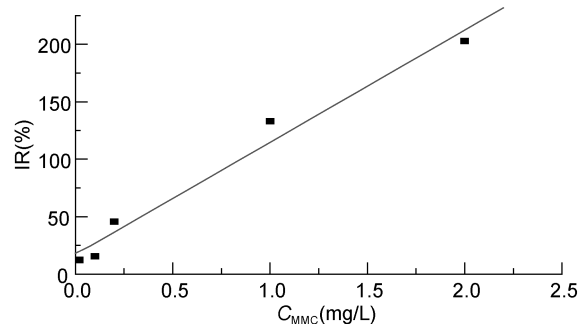


图 3 不同浓度下 MMC 的诱导率 IR  
Fig.3 The IR at different concentrations of MMC

式计算发光诱导率。  $y = 97.67x + 17.052$ ,  $R^2 = 0.9755$ , 实验所求的  $r$  值的显著水平  $P=0.0016 < 0.01$ , 所求的方程成立。可以采用此方程计算样品对发光细菌产生的发光诱导率, 并对遗传毒性进行评价。

**2.2.2 实验样品对 RecA 的发光影响** 样品中, 根据污染物化学检测结果, 每个站点具有遗传毒性的重金属、VOCs、石油烃以及 PAHs 含量各不相同。对于发光细菌的影响也不相同, 根据 1.2.5 中的相对发光诱导率的公式, 计算阳性对照以及样品的相对发光诱导率, 具体的相对发光诱导率大小如图 4 所示。

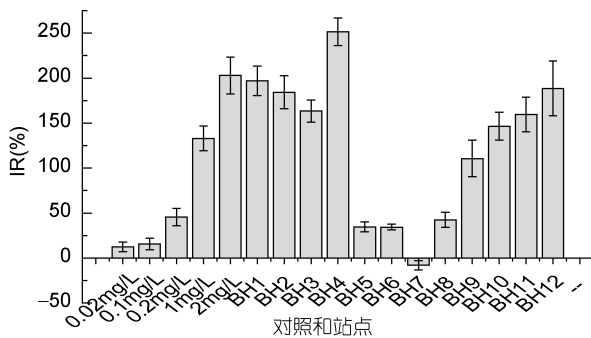


图 4 阳性对照以及每个排污口站点的诱导率

Fig.4 The IR of the positive control and every outfall site

实验中, BH1、BH2、BH3、BH4 对于 RecA 的诱导作用十分明显, 表现出明显的遗传毒性, 有的站点例如 BH5、BH6、BH7、BH8 对 RecA 的诱导作用不明显, 相应的遗传毒性也不明显, 剩余的一部分 BH9、BH10、BH11、BH12 对 RecA 的诱导属于中等, 表现出的遗传毒性也是中等。

**2.2.3 遗传毒性分析** 等效应的 MMC 浓度计算, 根据 2.2.1 的相对发光诱导率的公式, 根据相对发光诱导率的大小计算所对应的  $x$  值即等效应的 MMC 浓度, 如表 3 所示。

从毒性分级的对比情况看, 每个站点的遗传毒性具有显著差异, 并且低毒、中毒、高毒、剧毒都有表现, 如图 5 所示, 排污口中的水受到不同污染物(例如重金属、VOCs、PAHs 和石油烃)的污染, 其遗传毒性的总和在 RecA 发光细菌中得到了表现, 一些大理石切割厂、造纸厂、化工厂以及锌厂排放的污水中, 遗传毒性属于高毒和剧毒, 此处站点水样颜色发红发黑, 水质大多恶臭, 很难有生物生存。

从取水样的地理位置看, 山东半岛临近环渤海地区取样 4 个站点中, 毒性属于高毒以上, BH4 站点的遗传毒性甚至居于剧毒, 此处站点化工厂较多, 排

表 3 每个排污口的相对发光诱导率、等效应 MMC 浓度以及毒性分级

Tab.3 The IR, equivalent MMC concentration, and toxicity evaluation at each outfall

排污口	相对发光诱导率 IR(%)	等效应的 MMC 浓度(mg/L)	毒性分级
BH1	196	1.85	高毒
BH2	184	1.72	高毒
BH3	163	1.50	高毒
BH4	251	2.41	剧毒
BH5	34.6	0.181	中毒
BH6	34.3	0.178	中毒
BH7	-8.02	-0.258	低毒
BH8	42.3	0.260	高毒
BH9	110	0.964	高毒
BH10	146	1.33	高毒
BH11	159	1.46	高毒
BH12	188	1.76	高毒

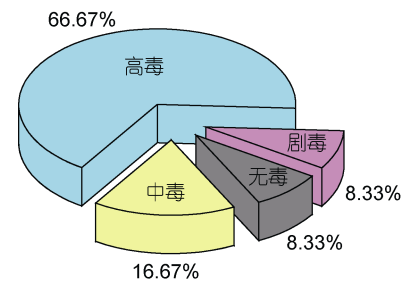


图 5 不同毒性分级所占比例

Fig.5 The proportion of different toxicity grades

放的污染物质也居多。辽东半岛的 4 个站点毒性总体比山东半岛低一些, 但也属于高毒区域, 造成此站点遗传毒性居高的原因中, 一些锌厂、造纸厂排放的污水起到了很大作用。毒性最小的 4 个站点属于京津冀地区, 此地区的站点排污口临近于河水, 以生活类污水为主, 总的遗传毒性明显低于山东半岛和辽东半岛的排污口。

### 3 结论

本次实验是使用遗传改造的不动杆菌对环渤海的排污口水质的遗传毒性进行的检测, 此发光细菌可以直接反应总遗传毒物的含量, 确定水质对生物体的遗传影响, 在一定范围内, 遗传毒物剂量越大、毒性越强, 菌株的发光强度越高。通过仪器测量其光强, 证明了 RecA 菌株作为一种生物传感器可快速检测环渤海排污口中受污染的水质, 实现遗传毒性的检测与评价。RecA 丧失染色体进一步同源重组的能

力, 具有较高的遗传稳定性, 在环境样品遗传毒性的高灵敏度迅速检测中具有广阔的前景。而对于单独检测水体中重金属、石油烃、PAHs 甚至是富营养物质来确定水质毒性, 发光细菌具有更加直观简便的特点。

随着检测体系的完善, 发光细菌法将和电子技术以及光电技术相结合(王兆群等, 2009), 逐步发展为在线监测系统, 为水质分析提供更加快速的测试手段。另一发展方向就是与先进的化学分析方法(方战强等, 2003)相结合, 为环境监测提供更加全面和细微的毒性分析。

### 参 考 文 献

- 王兆群, 司皖甦, 严 刚, 2009. 发光细菌法在环境检测中的应用. 环境监控与预警, 1(2): 14—17
- 毛裕民, 程海平, 卢建徽等, 1989. 大肠杆菌中整合的 F' 质粒带动细菌染色体复制需要 recA 基因. 遗传学报, 16(1): 56—66
- 方战强, 陈中豪, 胡勇等有, 2003. 发光细菌法在水质检测中的应用. 重庆环境科学, 25(2): 56—58
- 那广水, 张月梅, 陈 彤等, 2010. 发光细菌法评价排污口污水中总有机污染物的毒性. 中国环境监测, 26(5): 61—64
- 李 彬, 李培军, 王 晶等, 2001. 重金属污染土壤毒性的发光菌法诊断. 应用生态学报, 12(3): 443—446
- 李立华, 2004. 环渤海经济圈发展战略研究. 宏观经济研究, 12: 38—42
- 何文杰, 顾金辉, 康 华等, 2007. 混凝-超滤工艺处理滦河水的中试研究. 中国给水排水, 23(9): 73—76
- 宋一之, 黄 巍, 张 旭等, 2010. 遗传毒性检测生物传感细胞的灵敏度及稳定性研究. 清华大学学报, 50(11): 1880—1884, 1889
- 茆 婷, 何 伟, 钟文辉等, 2009. 报告基因技术及其在土壤质量检测中的应用. 生态学报, 29(12): 6733—6740
- 郑相宇, 张太平, 刘志强等, 2004. 水体污染物“三致”效应的生物监测研究进展. 生态学杂志, 23(4): 140—145
- Greggijolly A, Omston N, 1994. Properties of *Acinetobacter calcoaceticus* recA and its contribution to intracellular gene conversion. Molecular Microbiology, 12(6): 985—992
- Hare M, Perkins N, Greggijolly A, 2006. A constitutively expressed, truncated umuDC operon regulates the recA-dependent DNA damage induction of a gene in *Acinetobacter baylyi* strain ADP1. Applied and Environmental Microbiology, 72(6): 4036—4043
- Sorensen S J, Burmolle M, Hansen L H, 2006. Making biosense of toxicity: New developments in whole-cell biosensors. Current Opinion in Biotechnology, 17(1): 11—16
- Zhang Dayi, Ding Aizhong, Cui Shuangchao *et al*, 2013. Whole cell bioreporter application for rapid detection and evaluation of crude oil spill in seawater caused by Dalian oil tank explosion. Water Research, 47: 1191—1200

## USING LUMINESCENT BACTERIA TO DETECT GENOTOXICITY OF SEWAGE IN OUTFALL OF THE BOHAI SEA

CUI Zhi-Song<sup>1,2</sup>, LUAN Xiao<sup>2</sup>, GAO Wei<sup>2</sup>, LI Qian<sup>2</sup>, YANG Guan-Pin<sup>1</sup>, ZHENG Li<sup>2</sup>

(1. College of Marine Life, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Marine Ecology Research Center, First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao 266061, China)

**Abstract** We established a fast 3-hour genotoxicity detection method to environmental pollutants using genetically-modified bioluminescent bacteria *Acinetobacter* sp. RecA. The method was applied to evaluate the genotoxicity of sewage at 12 outfalls in the Bohai Sea rim. Results show that the genetic toxicity of samples at each sewage outfall was different. The genotoxicity of the northern side of the Shandong Peninsula was high as reflected by the outfalls into Laizhou Bay, followed by the Liaodong Peninsula (outfalls into Liaodong Bay), the intermediate, and the Beijing-Tianjin-Hebei area (outfall into Bohai Bay), the least. The genetic toxicity testing with the luminescent bacteria in water sample in this study has been approved a rapid, sensitive, and simple method; it shall provide a reference in biological toxicity testing for potential applications in monitoring and evaluation of water quality on coastal environment.

**Key words** Luminescent bacteria; sewage water; toxicity test; Bohai Sea