

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20240122001

郑璐, 沈忱, 张焱天, 等. 环境化学品对重组发光大肠杆菌和 502 发光细菌的急性毒性研究[J]. 生态毒理学报, 2024, 19(5): 329-338

Zheng L, Shen C, Zhang Y T, et al. Acute toxicity study of environmental chemicals to recombinant luminescent *Escherichia coli* and *Photobacterium phosphoreum* 502 [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2024, 19(5): 329-338 (in Chinese)

环境化学品对重组发光大肠杆菌和 502 发光细菌的急性毒性研究

郑璐^{1,2,3,*}, 沈忱^{1,2,3}, 张焱天^{1,2,3}, 王曰杰^{1,2,3}

1. 化学品安全全国重点实验室, 青岛 266104

2. 中石化安全工程研究院有限公司, 青岛 266104

3. 应急管理部化学品登记中心, 青岛 266104

收稿日期: 2024-01-22 录用日期: 2024-04-24

摘要: 旨在评估构建的重组发光大肠杆菌相比于 502 发光细菌对多种化学品的毒性敏感性。以环境中常见的多种化学品为目标化合物, 开展急性毒性测试实验, 分别比较 2 种菌对 3 种无机金属、4 种有机溶剂以及 5 种有机污染物的敏感度。实验结果表明, 锌、铜、镉、丙酮、乙腈、乙醇、二甲基亚砜、3,5-二氯苯酚、甲醛、邻二甲苯、间二甲苯和对二甲苯对重组发光大肠杆菌的 EC_{50} 值(0.040、0.004、0.157、0.190、0.209、1.044、0.718、 4.622×10^{-5} 、 6.62×10^{-4} 、0.451、0.360 和 0.016 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)均高于对 502 发光细菌的 EC_{50} 值(0.083、0.266、0.211、1.062、1.416、1.694、1.672、 6.49×10^{-5} 、 1.014×10^{-2} 、0.441、0.797 和 0.494 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 表明构建的重组发光大肠杆菌对受试化学品的毒性敏感性强于 502 发光细菌; 且重组发光大肠杆菌的毒性测试结果与现有研究的生物毒性测定结果显示出更好的相关性。本研究表明重组发光大肠杆菌更适合作为生态监测的测试菌种, 研究结果可为环境化学品的污染控制和生物毒性测试提供参考。

关键词: 无机金属; 有机溶剂; 有机污染物; 重组发光大肠杆菌; 502 发光细菌; 急性毒性

文章编号: 1673-5897(2024)5-329-10 **中图分类号:** X171.5 **文献标识码:** A

Acute Toxicity Study of Environmental Chemicals to Recombinant Luminescent *Escherichia coli* and *Photobacterium phosphoreum* 502

Zheng Lu^{1,2,3,*}, Shen Chen^{1,2,3}, Zhang Yantian^{1,2,3}, Wang Yuejie^{1,2,3}

1. State Key Laboratory of Chemical Safety, Qingdao 266104, China

2. SINOPEC Research Institute of Safety Engineering Co., Ltd., Qingdao 266104, China

3. National Registration Center for Chemicals, Ministry of Emergency Management, Qingdao 266104, China

Received 22 January 2024 **accepted** 24 April 2024

Abstract: The toxicity sensitivities of the constructed recombinant luminescent *Escherichia coli* compared to *Photobacterium phosphoreum* 502 to a variety of common chemicals were evaluated in this study. Acute toxicity tests were conducted using a range of chemicals, including three inorganic metals, four organic solvents, and five organic pollutants. The results showed that the EC_{50} values of zinc, copper, and acetone, ethanol, dimethyl sulfoxide,

基金项目: 中国石化科技部项目(321029); 中国石化安全工程研究院科研项目(Y-340)

第一作者: 郑璐(1993—), 女, 硕士, 工程师, 研究方向为生态毒理学, E-mail: zhengl.qday@sinopec.com

*** 通信作者** (Corresponding author), E-mail: zhengl.qday@sinopec.com

3,5-dichlorophenol, formaldehyde, o-xylene, m-xylene, and p-xylene to the recombinant luminescent *E. coli* (0.040, 0.004, 0.157, 0.190, 0.209, 1.044, 0.718, 4.622×10^{-5} , 6.62×10^{-4} , 0.451, 0.360, and $0.0016 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) were all higher than those to *P. phosphoreum* 502 (0.083, 0.266, 0.211, 1.062, 1.416, 1.694, 1.672, 6.49×10^{-5} , 1.014×10^{-2} , 0.441, 0.797, and $0.494 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), indicating that the recombinant luminescent *E. coli* was more sensitive to the toxicity of the chemicals tested in this study than *P. phosphoreum* 502. Furthermore, the toxicity test results of the recombinant luminescent *E. coli* showed better correlation with the previous toxicity assay results. This study showed that the recombinant luminescent *E. coli* is more suitable as a test organism for ecological monitoring. The results of this study could provide reference for pollution control and biotoxicity testing of environmental chemicals.

Keywords: inorganic metals; organic solvents; organic pollutants; recombinant luminescent *Escherichia coli*; *Photobacterium phosphoreum* 502; acute toxicity

现阶段,化学分析可实现对大多数污染物的定性和定量检测分析,但不能准确反映样品的毒性以及评估这些化学品暴露引发的环境风险^[1],基于微生物生命活动的生物分析因其方法简单、快速、可重复性高和成本低等优点被广泛使用^[2]。生物发光细菌是1类在生理代谢过程可以产生自发荧光的细菌,可通过发光强度的改变快速地指示环境污染物对细菌体产生的影响,体内发光是其受毒性胁迫的敏感指标,发光细菌的发光强度与环境污染物的毒性大小呈负相关,故可用发光强度来表征其毒性大小。生物发光测定与藻类、甲壳类和鱼类等毒性生物测定表现出良好的相关性,可快速揭示生态系统中的异常状况^[3-4]。

1995年,国家环境保护局(即现在的生态环境部)公布了关于采用发光细菌监测水质毒性的国家标准《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》(GB/T 15441—1995)^[5]。标准推荐使用的明亮发光杆菌为海洋细菌,需提高盐度维持海洋环境渗透压,但在高盐度下开展毒性检测,面临金属的生物利用度降低和有机化合物物质的不溶性增加的问题。为此,国内外致力于构建特异性识别环境污染物的重组发光大肠杆菌,近年来随着基因工程技术的不断进步,生物发光检测技术也受到广泛关注,无发光基因细菌可通过基因操作技术转化为发光细菌株。通过研究细菌生物发光的生理、生化和遗传,可将发光基因用作环境研究的生物传感器。*luxCDABE*基因由于其自发荧光背景低和易于检测等优点,经常用作报告基因^[6]。大肠杆菌具有繁殖速度快且成本低廉的优点,常被用作基因工程细菌,构建以大肠杆菌为宿主细胞和发光基因为报告基因的重组发光大肠杆菌,能有效检测毒性污染物,且载体在保存和运输等方面均非常稳定,其能完美地适应栖息地,对异常和危

险外来环境污染物的存在做出精确的反应^[7-10]。

本研究基于明亮发光杆菌的*luxCDABE*基因,构建了1株稳定表达生物发光的重组发光大肠杆菌。为了验证本研究中重组发光大肠杆菌在生物毒性测试中的敏感性和可靠性,同时选取重组发光大肠杆菌和502发光细菌为试验生物,采用改良的发光细菌急性毒性测试法(GB/T 15441—1995),从重金属和有机物这两大类传统的环境化学品中选择受试物开展研究,其中铜离子和镉离子作为常见的重金属污染物的代表,锌离子变异系数小且稳定性高,更适合作为阳性对照。同时选择3,5-二氯苯酚、甲醛和二甲苯等应用较为广泛的有机物为受试物,此外有机溶剂作为在生活和生产中广泛应用的一大类有机化合物,在本研究中选择了二甲亚砜(DMSO)、丙酮、乙腈和乙醇进行研究,后续也可指导实验所用溶剂的选择和添加限量。本论文旨在评价环境化学品对重组发光大肠杆菌和502发光细菌的生物毒性,利用非线性最小二乘拟合函数Logit研究其剂量-效应关系,论证重组发光大肠杆菌在生物毒性测试中的有效性,以为毒性检测技术的发展提供支撑和参考,在合理评价环境化学品对发光菌的生物毒性的同时为环境化学品的合理处置提供理论基础。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 试剂材料与仪器

Na_2HPO_4 (99%,百灵威)、 NaCl (分析纯,国药)、甘油(99%,百灵威)、琼脂粉(混合物,国药)、酵母提取粉(混合物,百灵威)、胰蛋白胨(生化试剂,国药)、LB培养基(混合物,生工)、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (分析纯,国药)、 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ (生化试剂,阿拉丁)、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (分析纯,国药)、 KH_2PO_4 (分析纯,国药)、甲醛(混合物,百灵威)、3,5-二氯苯酚(分析纯,麦克林)、邻二甲苯(分析

纯,阿拉丁)、间二甲苯(分析纯,阿拉丁)、对二甲苯(分析纯,阿拉丁)、DMSO(99.5%,Sigma)、丙酮(分析纯,国药)、乙腈(分析纯,国药)、乙醇(分析纯,国药)。

高压蒸汽灭菌器(SX-500,TOMY,日本);超净工作台(ACB-4A1,ESCO,新加坡);多功能酶标仪(VarioskanLUX,Thermo Fisher,美国);生化培养箱(IFR250,GREIRM,德国)。

1.2 供试生物

1.2.1 502 发光细菌

供试发光细菌为滨松光子502冻干粉,明亮发光杆菌(*Photobacterium phosphoreum* 502),好养菌,安瓿瓶包装,每瓶0.5 g,置于120 r·min⁻¹,20℃空气摇床复苏培养。502发光细菌的培养基pH应调节为7,且需要2%~3%的NaCl维持渗透压并调节所有待测样品。

1.2.2 重组发光大肠杆菌

稳定发光的重组发光大肠杆菌为稳转pGEN-luxCDABE低拷贝质粒的*Escherichia coli* DH5 α ,好养菌,pGEN-luxCDABE质粒携带luxCDABE报告基因,购自Addgene。

重组发光大肠杆菌对pH值的耐受范围广,经前期实验研究发现pH从4到12均可以发出明亮的光,因此在培养时基本无需调节培养基的pH值;且在测试过程中,对盐度要求较低,将污染物溶液与菌液混合时可无需加盐调节渗透压,操作步骤也较为简单。

1.3 实验方法

1.3.1 502 发光细菌急性毒性实验

改良《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》(GB/T 15441—1995)^[5],开展环境化学品对502发光细菌的急性毒性实验。复苏502发光细菌,传代培养至指数生长期备用。环境化学品分别设置5~6个不同的浓度梯度,每个浓度设置3个平行,使用灭菌的3% NaCl溶液进行梯度稀释。以白色不透明96孔微孔板为测试载体,每孔加入1 μ L 502发光细菌溶液和99 μ L待测样品,置于(25 $\pm$ 2)℃板式摇床混匀15 min,使用Thermo多功能酶标仪化学发光模块测定相对光单位。

1.3.2 重组发光大肠杆菌急性毒性实验

改良《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》(GB/T 15441—1995)^[5],复苏重组发光大肠杆菌,传代培养至指数生长期备用。环境化学品分别设置5~6个浓度梯度,每个浓度设置3个平行,使用灭菌的

0.5% NaCl溶液进行梯度稀释。同样以白色不透明96孔微孔板为测试载体,每孔加入1 μ L重组发光大肠杆菌液和99 μ L待测样品,置于(25 $\pm$ 2)℃板式摇床混匀15 min,使用Thermo多功能酶标仪化学发光模块测定相对光单位。

1.4 统计分析

本研究中相对发光强度表示为平均值 $\pm$ 标准差,使用SPSS统计分析软件对实验结果进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),* P <0.05、** P <0.01表示2组之间有显著差异。环境化学品的生物毒性剂量-效应关系选择用SPSS软件中的Probit回归分析且以Logit函数进行非线性拟合。

$$\text{相对发光强度} = \frac{\text{空白对照发光强度} - \text{样品发光强度}}{\text{空白对照发光强度}} \times 100\%$$

2 结果(Results)

2.1 重金属对502发光细菌和重组发光大肠杆菌的急性毒性

以502发光细菌和重组发光大肠杆菌作为指示生物,以发光细菌的发光强度为检测指标,并对发光细菌的相对发光强度和重金属离子浓度作图。用Logit函数对化合物浓度与发光细菌发光抑制率进行拟合,确定3种重金属离子单独作用时发光强度降低对应的半数效应浓度(EC₅₀)。依据ISO 11348-3标准方法中的实验要求,选择了稳定、易溶、价廉以及常见并对环境和人体危害小的ZnSO₄·7H₂O作为毒性参比物质。在图1中ZnSO₄·7H₂O对502发光细菌的急性毒性EC₅₀值为0.083 mmol·L⁻¹,符合美国标准方法中规定的ZnSO₄ EC₅₀值为0.077~0.185 mmol·L⁻¹[11]。锌和镉对502发光细菌和重组发光大肠杆菌具有相似的剂量效应曲线(图1和图2),即在低剂量范围内,促进发光细菌的发光,当剂量增大时,对发光细菌发光强度的抑制具有持续增强的剂量效应关系。铜对2种发光细菌的活性抑制具有持续增强的剂量效应关系,随铜浓度的增加,发光细菌的相对发光率降低,铜对发光细菌的急性毒性与其浓度呈正相关。图1结果表明,锌对502发光细菌的急性毒性最高,其次为镉和铜,EC₅₀值分别为0.211 mmol·L⁻¹和0.266 mmol·L⁻¹(具体数值详见表1)。而图2中铜、锌和镉对重组发光大肠杆菌的急性毒性强弱排序分别为:铜>锌>镉,对应的EC₅₀值分别为:0.004、0.040和0.157 mmol·L⁻¹(表1)。相对于重金属铜、锌和镉的毒性作用,重组发光大肠杆菌比502发光细菌对重金属的毒性

作用更敏感。

2.2 有机溶剂对 502 发光细菌和重组发光大肠杆菌的急性毒性

比较了 4 种常用的有机溶剂对 502 发光细菌和重组发光大肠杆菌的毒性效应,丙酮、乙腈、二甲基亚砜和乙醇对 2 种发光细菌的发光强度具有不同程

度的抑制作用,如图 3 和图 4 所示。除丙酮和乙醇在低浓度组使重组发光大肠杆菌的发光强度略有增加外,其余有机溶剂的发光强度均随暴露剂量的增加而降低。4 种有机溶剂按对 2 种发光细菌毒性作用的强弱排序均为:丙酮>乙腈>二甲基亚砜>乙醇。其中,丙酮、乙腈、二甲基亚砜和乙醇对 502 发光细

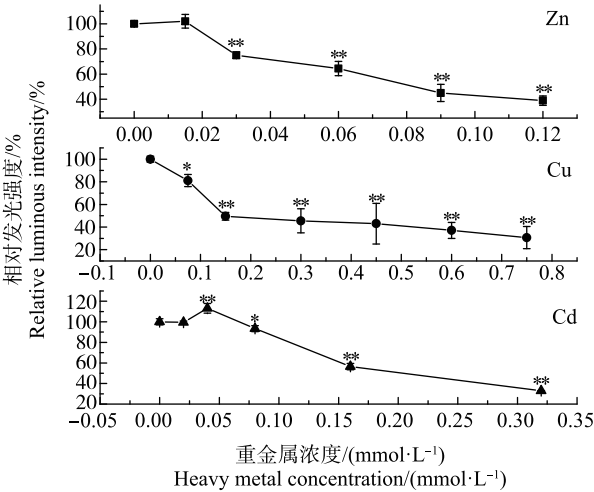


图 1 3 种重金属对 502 发光细菌的毒性作用
(* $P<0.05$ 、** $P<0.01$)

Fig. 1 Toxicity of 3 heavy metals on *Photobacterium phosphoreum* 502 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

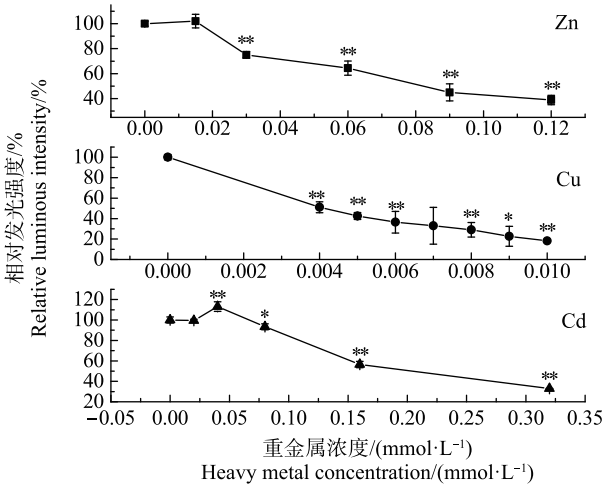


图 2 3 种重金属对重组发光大肠杆菌的毒性作用
(* $P<0.05$ 、** $P<0.01$)

Fig. 2 Toxicity of 3 heavy metals on recombinant luminescent *Escherichia coli* (* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

表 1 环境化学品对重组发光大肠杆菌和 502 发光细菌急性毒性 EC₅₀ 值
Table 1 EC₅₀ value of acute toxicity of environmental chemicals to recombinant luminescent *Escherichia coli* and *Photobacterium phosphoreum* 502

无机金属 Inorganic metals	502 发光细菌 <i>Photobacterium phosphoreum</i> /(mmol·L ⁻¹)	重组发光 大肠杆菌 Recombinant luminescent <i>Escherichia coli</i> /(mmol·L ⁻¹)	有机溶剂 Organic solvent	502 发光细菌 <i>Photobacterium phosphoreum</i> /(mol·L ⁻¹)	重组发光 大肠杆菌 Recombinant luminescent <i>Escherichia coli</i> /(mol·L ⁻¹)	有机化合物 Organic compound	502 发光细菌 <i>Photobacterium phosphoreum</i> /(mol·L ⁻¹)	重组发光 大肠杆菌 Recombinant luminescent <i>Escherichia coli</i> /(mol·L ⁻¹)
铜离子 Copper ions	0.266	0.004	乙腈 Acetonitrile	1.416	0.209	3,5-二氯苯酚 3,5-dichlorophenol	6.49×10 ⁻⁵	4.622×10 ⁻⁵
镉离子 Cadmium ions	0.211	0.157	乙醇 Ethanol	1.694	1.044	甲醛 Formaldehyde	1.014×10 ⁻²	6.62×10 ⁻⁴
锌离子 Zinc ions	0.083	0.040	二甲基亚砜 Dimethyl sulfoxide	1.672	0.718	邻二甲苯 o-xylene	0.441	0.451
			丙酮 Acetone	1.062	0.190	间二甲苯 m-xylene	0.797	0.360
						对二甲苯 para-xylene	0.494	0.016

菌的 EC_{50} 值分别为 1.062、1.416、1.672 和 1.692 $mol \cdot L^{-1}$ (表 1),重组发光大肠杆菌对于以上 4 种有机溶剂的 EC_{50} 值分别为 0.190、0.209、0.718 和 1.044 $mol \cdot L^{-1}$ (表 1),以丙酮、乙腈、二甲基亚砜和乙醇为受试物,重组发光大肠杆菌比 502 发光细菌灵敏度高。

2.3 有机化合物对重组发光大肠杆菌和 502 发光细菌的急性毒性

从毒性数据来看,3,5-二氯苯酚对重组发光大肠杆菌和 502 发光细菌的毒性作用最大,如图 5 和

图 6 所示,邻/间/对二甲苯对 502 发光细菌的毒性作用相当,其 EC_{50} 值分别为 0.441、0.797 和 0.494 $mol \cdot L^{-1}$;邻二甲苯和间二甲苯对重组发光大肠杆菌的 EC_{50} 值为 0.451 $mol \cdot L^{-1}$ 和 0.360 $mol \cdot L^{-1}$,但对二甲苯的 EC_{50} 值相对较小,为 0.016 $mol \cdot L^{-1}$,苯环类化合物对发光细菌的急性毒性强度可能与苯环取代基的位置有关。表明对二甲苯对重组发光大肠杆菌的毒性作用很强,可用重组发光大肠杆菌灵敏检测环境中的对二甲苯。

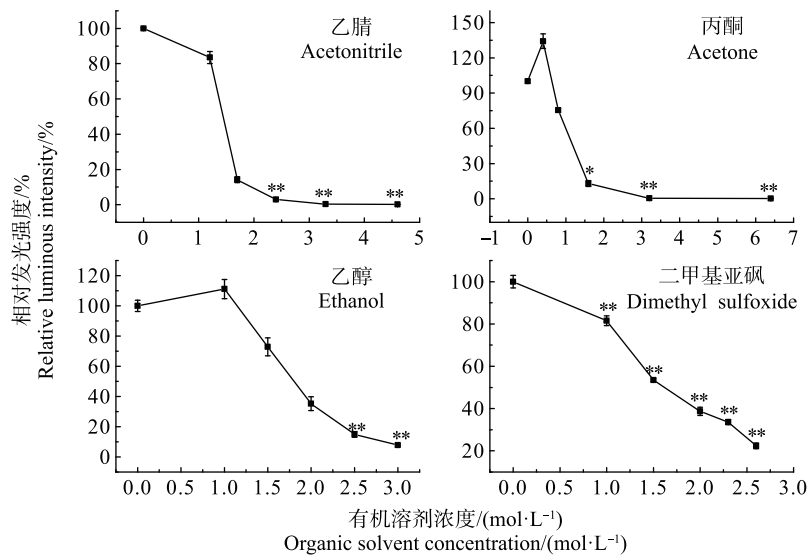


图 3 4 种有机溶剂对 502 发光细菌的毒性作用 (* $P<0.05$ 、** $P<0.01$)

Fig. 3 Toxicity of 4 organic solvents on *Photobacterium phosphoreum* 502 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

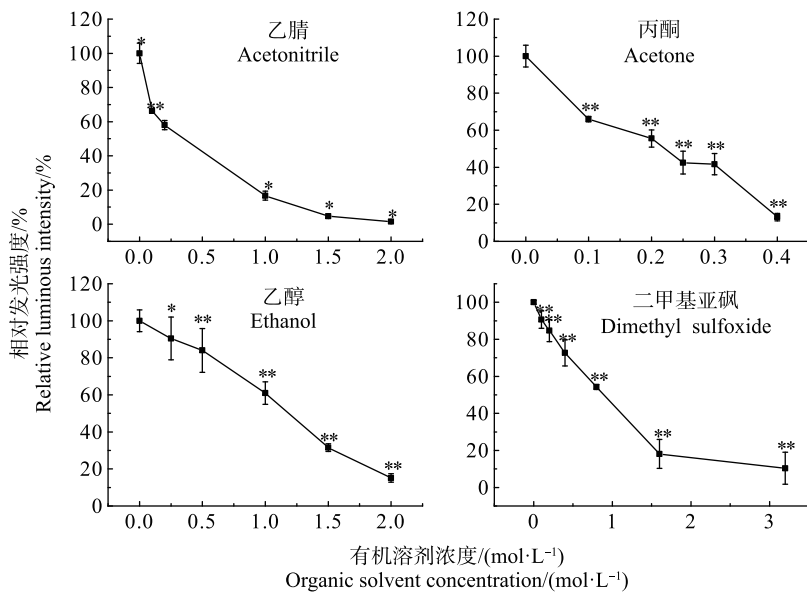


图 4 4 种有机溶剂对重组发光大肠杆菌的毒性作用 (* $P<0.05$ 、** $P<0.01$)

Fig. 4 Toxicity of 4 organic solvents on recombinant luminescent *Escherichia coli* (* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

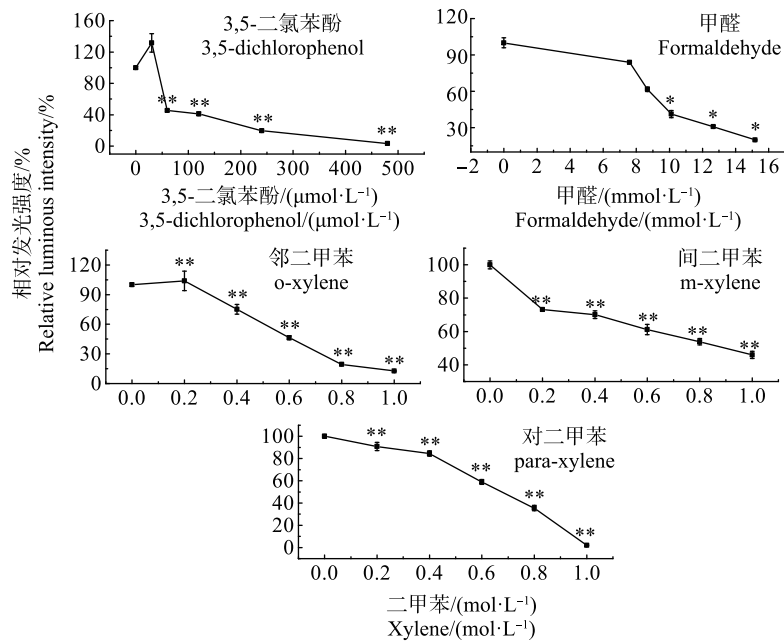


图 5 5 种有机化合物对 502 发光细菌的毒性作用 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

Fig. 5 Toxicity of 5 organic compounds on *Photobacterium phosphoreum* 502 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

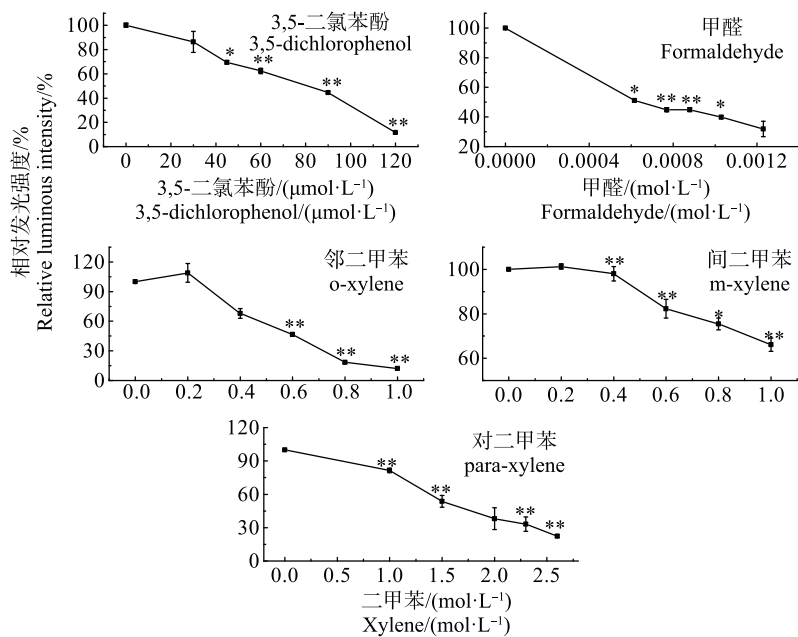


图 6 5 种有机化合物对重组发光大肠杆菌的毒性作用 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

Fig. 6 Toxicity of 5 organic compounds on recombinant luminescent *Escherichia coli* (* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

3 讨论 (Discussion)

重金属被指出具有神经毒性、致癌性和致畸性等毒性作用。其中重金属铜为生命体所必需的微量元素,但高浓度的铜则会引起生物体内的铜中毒。铜对微生物的毒性影响可能为铜离子结合体内蛋白并干扰其代谢过程^[12]。重金属锌也是生物体内主要

的微量元素。机体内多种蛋白需要与锌结合,发挥不同的生理功能。然而过量的锌同样会引起机体急性和慢性中毒。人暴露于大剂量锌污染的情况下会出现腹泻、头痛、呕吐和肌肉收缩失调等毒性效应^[13]。重金属镉则在机体内表现为很强的蓄积性,过量的镉会产生急性或慢性中毒现象,镉会对体内

酶体系产生影响,如会使巯基酶失效。本文中,研究了铜、镉和锌分别对502发光细菌和重组发光大肠杆菌的急性毒性,研究过程中发现,镉和锌在低浓度范围内,对2种发光细菌的生长没有毒害作用,反而具有轻微的促进作用,但随着浓度的升高,发光强度随之减小,对发光细菌的生长表现为明显的毒害作用(图1和图2)。据已有研究表明,物质对发光细菌的这种低剂量刺激与高剂量抑制的作用称为“hormesis”^[14-15],即毒物兴奋效应,Shen等^[16]也描述了低浓度锌暴露刺激发光的现象。但hormesis因刺激反应很小,常被当成实验错误,或因使用的为亚急性浓度而被忽略。近年来,随着对毒物兴奋效应的研究增多,发现青海弧菌Q67暴露于低剂量的个人护理产品、抗生素和离子液体时,其生物发光显示出对发光物质即黄素单核苷酸(FMN)和还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)的诱导兴奋效应^[17-18],而在高浓度抗生素的暴露下,Q67中的超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量开始增加,引发抗氧化防御机制。因此本文中的研究结果进一步提示需在生态风险评估中考虑兴奋效应^[18]。

铜对502发光细菌和重组发光大肠杆菌则表现为持续抑制的剂量-效应关系。本研究中3种重金属对502发光细菌的 EC_{50} 值分别为0.083、0.211和0.266 $mmol \cdot L^{-1}$,急性毒性由强到弱依次为:锌离子>镉离子>铜离子,其中镉离子>铜离子的毒性顺序,与徐恒蒲等^[19]对明亮发光杆菌T3的研究结果以及赵莉等^[20]对费氏弧菌的研究结果一致;而对重组发光大肠杆菌的 EC_{50} 则为0.004、0.040和0.157 $mmol \cdot L^{-1}$,急性毒性由强到弱依次为:铜离子>锌离子>镉离子,镉的低毒性可能是由于重组发光大肠杆菌的细菌膜外层存在胞外多糖,这些多糖已被发现可以吸附和捕获镉,进而可组成细胞壁^[18]。Gellert^[21]总结了导致相关元素毒性差异的因素。在细胞能量供应相关的代谢途径的关键步骤中,有毒元素与酶或变构效应物的相互作用可能是潜在的机制之一,此外,有毒元素与萤光素酶复合物的相互作用,影响发光,可能是毒性水平不同的另一个原因。其中铜离子对502发光细菌的急性毒性相对较弱,而对重组发光大肠杆菌的急性毒性最强,这可能是因为502发光细菌和重组发光大肠杆菌在不同盐浓度检测环境下对铜离子的生物可利用性不同,此外,Muneeswaran等^[22]的研究也发现青海弧菌Q67比502发光细菌对铜离子的暴露更敏感,与本研究结果一致。且在

铜离子的毒性作用下重组发光大肠杆菌的灵敏度高于方贵桢等^[6]构建的基因重组发光大肠杆菌*E. coli* HB101 pUCD607(EC_{50} 值为0.010 $mmol \cdot L^{-1}$)。生物发光是生物体内酶催化氧化反应产生的发光现象,而在重组发光大肠杆菌中的核心基因*luxCDABE*编码1个复杂的生物发光机制中涉及的所有酶,重金属铜、锌和镉对细菌的毒性可能是通过影响发光菌的酶系统。

比较重金属对重组发光大肠杆菌和502发光细菌的毒性作用,发现以重组发光大肠杆菌为受试生物物的毒性测试结果(EC_{50})比502发光细菌灵敏度更高。美国环境保护局(United States Environmental Protection Agency, US EPA)现已基于生物毒性实验的毒性数据制定了铜离子、锌离子和镉离子水质基准的最大浓度(CMC)分别为0.031、0.116和1.850 $mmol \cdot L^{-1}$ ^[23],这3种重金属的水质基准值顺序与本研究重组发光大肠杆菌的急性毒性强弱排序一致,表明了重组发光大肠杆菌的测试结果可能更适合于生态监测。同时本研究获得的铜离子、锌离子和镉离子对502发光细菌和重组发光大肠杆菌的急性毒性实验数据可为我国水质标准的修订和完善提供参考。

有机溶剂用途广泛,常用作稀释剂、萃取剂、黏胶溶剂、去污剂和清洗剂,但对动植物的生长可造成严重危害,由于其广泛使用致使各个环境单元均有检出,本研究选取实验室常见的4种有机溶剂丙酮、乙腈、二甲基亚砜和乙醇为受试物,研究其对2种发光细菌的急性毒性。实验过程中发现丙酮和乙醇会在低浓度组使重组发光大肠杆菌产生毒性兴奋效应,对于这一现象刘树深等^[24]解释为,当发光体系存在少量的丙酮和乙醇时,增强了菌体细胞膜的渗透性,有机溶剂渗入细胞膜的同时也带入了氧,导致体系的发光强度增大。本研究中的其余有机溶剂则均随暴露剂量的增加而加剧抑制发光细菌的发光强度。根据 EC_{50} 值,4种有机溶剂对2种发光细菌的毒性抑制顺序均为丙酮>乙腈>二甲基亚砜>乙醇,与刘树深等^[24]发现的这4种有机溶剂对发光菌Q67的抑制毒性顺序一致,结果表明丙酮、乙腈、二甲基亚砜和乙醇对3种发光菌的种内毒性作用模式相似。有机溶剂对发光细菌的毒性作用除与暴露剂量有关外,还与其自身的结构或性质有关。在碳链长度相同时,毒性顺序为乙腈>乙醇,具有相似结构的丙酮>二甲基亚砜。丙酮表现的毒性作用最强,

刘树深等^[24]研究发现其能改变发光细菌细胞膜的磷脂结构,进而增强了细胞膜的渗透性。在本研究中按 EC_{50} 作为毒性强弱的判别标准发现,在丙酮、乙腈、二甲基亚砜和乙醇的毒性作用下,重组发光大肠杆菌的毒性测试结果敏感度高于 502 发光细菌。且在二甲基亚砜的毒性作用下重组发光大肠杆菌的灵敏度高于方贵桢等^[6]构建的基因重组发光大肠杆菌 *E. coli* HB101 pUCD607(EC_{50} 值为 $0.718 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$),后续也可指导实验所用溶剂的选择和添加限量。

本研究中选取的 5 种常见有机污染物对 502 发光细菌和重组发光大肠杆菌的毒性强弱顺序均为:3,5-二氯苯酚>甲醛>二甲苯。3,5-二氯苯酚对生物体有广谱毒性及诱变毒性,文献资料显示,3,5-二氯苯酚对浮萍的生长具有明显的抑制作用^[25],且 3,5-二氯苯酚可作为穗状狐尾藻毒性试验的参比物^[26]。与本研究中发现的 3,5-二氯苯酚对 502 发光细菌和重组发光大肠杆菌具有较强的毒性作用一致。甲醛作为 1 种重要的化工原料,广泛应用于合成药品、有机合成、涂料、材料和橡胶等行业。研究表明,人类长期暴露于甲醛,会对皮肤、呼吸系统、神经系统和肝肺功能等造成危害。钱骁^[27]在甲醛对发光细菌的单一毒性中计算出的 EC_{50} 值为 $0.257 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,与本研究重组发光大肠杆菌的 EC_{50} 值 $0.662 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 接近,但明显小于对 502 发光细菌的 $10.14 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。间二甲苯、对二甲苯和邻二甲苯为石化行业的特征污染物且检出率较高^[28]。但二甲苯对发光细菌的毒性数据较少,在本研究中,二甲苯的同分异构体对发光细菌的毒性作用存在差异,主要表现为,对二甲苯作用于重组发光大肠杆菌的毒性较强,其 EC_{50} 值 ($0.016 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 相较其他二甲苯的 EC_{50} 值 ($0.360 \sim 0.797 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 约低 1 个数量级左右,3,5-二氯苯酚和二甲苯的母体相同均为苯环,不同的取代官能团或官能团位置对其毒性效应影响较显著,有机化合物抑制发光菌的差别来源于不同取代基或官能团位置,因影响其作用于微生物靶点的效应程度,前期实验结果表明,需要进一步分析其毒性机制^[29]。同样发现在 3,5-二氯苯酚、甲醛、邻二甲苯、间二甲苯和对二甲苯的毒性作用下,重组发光大肠杆菌的毒性测试结果灵敏度均高于 502 发光细菌,重组发光大肠杆菌更适合评估单一化学品的生物毒害作用。此外,重组发光大肠杆菌相较于 502 发光细菌能以较快的生长速率进入发光稳定期;且 502 发光细菌为海洋发光菌,对盐浓度要求较高,重组发光大肠杆菌

能有效克服这一缺陷,避免盐度对样品毒性的干扰;且重组发光大肠杆菌对 pH 的耐受范围非常高,几乎从 pH 4 到 pH 12 均可发出强光,可有效检测较强酸或强碱样品的生物毒性。为此重组发光大肠杆菌可能更适合作为生态监测的测试菌种。

同时发现,环境化学品对重组大肠杆菌的毒性顺序为:铜离子>锌离子>3,5-二氯苯酚>镉离子>甲醛>对二甲苯>丙酮>乙腈>间二甲苯>邻二甲苯>二甲基亚砜>乙醇,提示重金属对重组大肠杆菌的毒性效应要明显高于有机溶剂和有机化合物,然而,在本研究中简单地研究单一物质的毒性作用是不够的,在自然环境中,环境化合物常常是以复合污染的形式出现,在接下来的研究中应该清楚这些因子之间的相互作用,分析并探究它们共存时可能产生的环境效应,才能更好地解决环境污染问题。

参考文献 (References):

- [1] Jin X W, Li Z Y, Xu P P, et al. Advances in microfluidic biosensors based on luminescent bacteria [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2019, 47(2): 181-189
- [2] Westlund P, Nasuhoglu D, Isazadeh S, et al. Investigation of acute and chronic toxicity trends of pesticides using high-throughput bioluminescence assay based on the test organism *Vibrio fischeri* [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2018, 74(4): 557-567
- [3] Cui R X, Kwak J I, An Y J. *Salvinia natans* microplate assay: A simple and efficient method for evaluating aquatic toxicity [J]. Marine Pollution Bulletin, 2022, 185(Pt A): 114274
- [4] Wang D L, Gao Y, Lin Z F, et al. The joint effects on *Photobacterium phosphoreum* of metal oxide nanoparticles and their most likely coexisting chemicals in the environment [J]. Aquatic Toxicology, 2014, 154: 200-206
- [5] 国家环境保护局, 国家技术监督局. 水质 急性毒性的测定 发光细菌法: GB/T 15441—1995 [S]. 北京: 中国标准出版社, 1995
- [6] 方贵桢, 胡立新, 黄国勇, 等. 基因重组发光大肠杆菌应用于环境样品毒性的测试[J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 2020, 52(2): 60-67
- [7] Fang G Z, Hu L X, Huang G Y, et al. Application of gene-recombinant luminescent *Escherichia coli* in the toxicity test of environmental samples [J]. Journal of South China Normal University (Natural Science Edition), 2020, 52(2): 60-67 (in Chinese)
- [7] 王靖. Lux 基因重组铜绿假单胞菌的发光特性、抑菌评估和生物膜形成机理探究[D]. 西安: 西北农林科技大学

- 学, 2020: 5-6
- Wang Q. Luminescence characteristics, bacteriostasis evaluation and biofilm formation mechanism of lux gene recombinant *Pseudomonas aeruginosa* [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2020: 5-6 (in Chinese)
- [8] 钱俊, 李久铭, 只金芳, 等. 基于大肠杆菌的全细胞微生物传感器的构建及其在急性生物毒性检测中的应用[J]. 分析化学, 2013, 41(5): 738-743
- Qian J, Li J M, Zhi J F, et al. Development of a whole cells microbial biosensor based on *E. coli* and its application to acute biotoxicity determination [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2013, 41(5): 738-743 (in Chinese)
- [9] 周上洋, 赵建亮, 黄国勇, 等. 重金属 Zn、Cu 和 Hg 对基因重组发光大肠杆菌的综合毒性及其联合效应[J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 2018, 50(1): 33-37
- Zhou S Y, Zhao J L, Huang G Y, et al. Comprehensive toxicity and combined effect of heavy metals Zn, Cu and Hg on gene-recombinant luminescent *Escherichia coli* [J]. Journal of South China Normal University (Natural Science Edition), 2018, 50(1): 33-37 (in Chinese)
- [10] Girotti S, Maiolini E, Bolelli L, et al. Bioremediation of hydrocarbons contaminated waters and soils: Monitoring by luminescent bacteria test [J]. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 2011, 91(9): 900-909
- [11] Zhang Y, Yuan Y X, Wang Y F, et al. Comprehensive evaluation on the bio-toxicity of three advanced wastewater treatment processes [J]. Water, Air, & Soil Pollution, 2020, 231(3): 110
- [12] 覃佳名, 姜必广, 南小龙, 等. 重金属污染土壤微生物修复研究进展[J]. 环境科学与技术, 2021, 44(S2): 132-143
- Qin J M, Jiang B G, Nan X L, et al. Progress in research on microbial remediation of heavy metal contaminated soil [J]. Environmental Science and Technology, 2021, 44(S2): 132-143 (in Chinese)
- [13] Luo Y L, Wang W X. Immune responses of oyster hemocyte subpopulations to *in vitro* and *in vivo* zinc exposure [J]. Aquatic Toxicology, 2022, 242: 106022
- [14] 王东红, 彭安, 王子健. 有毒物质低剂量刺激作用的研究进展[J]. 安全与环境学报, 2004, 4(1): 18-21
- Wang D H, Peng A, Wang Z J. Advances in study of hormesis [J]. Journal of Safety and Environment, 2004, 4(1): 18-21 (in Chinese)
- [15] Stebbing A R D. Tolerance and hormesis: Increased resistance to copper in hydroids linked to hormesis [J]. Marine Environmental Research, 2002, 54(3/4/5): 805-809
- [16] Shen K L, Shen C F, Lu Y, et al. Hormesis response of marine and freshwater luminescent bacteria to metal exposure [J]. Biological Research, 2009, 42(2): 183-187
- [17] Agathokleous E, Wang Q, Iavicoli I, et al. The relevance of hormesis at higher levels of biological organization: Hormesis in microorganisms [J]. Current Opinion in Toxicology, 2022, 29: 1-9
- [18] Mo L Y, Wang J, Qin L T, et al. Mechanism of time-dependent toxicity of quinolone antibiotics on luminescent bacteria *Vibrio qinghaiensis* sp.-Q67 [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2023, 255: 114784
- [19] 徐恒蒲, 孟一鸣, 李澳, 等. 重金属污染土壤生物毒性的发光菌法测定及评价[J]. 化工环保, 2019, 39(5): 538-544
- Xu H P, Meng Y M, Li A, et al. Detection and evaluation of biotoxicity of heavy metal-contaminated soil using *Photobacterium phosphoreum* [J]. Environmental Protection of Chemical Industry, 2019, 39(5): 538-544 (in Chinese)
- [20] 赵莉, 杨虹, 郭晶晶. 二元含汞重金属混合物对费氏弧菌的联合毒性研究[J]. 安全与环境学报, 2015, 15(1): 297-300
- Zhao L, Yang H, Guo J J. Study on the combined toxicity of binary heavy metal mixture to *Vibrio fischeri* [J]. Journal of Safety and Environment, 2015, 15(1): 297-300 (in Chinese)
- [21] Gellert G. Sensitivity and significance of luminescent bacteria in chronic toxicity testing based on growth and bioluminescence [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2000, 45(1): 87-91
- [22] Muneeswaran T, Kalyanaraman N, Vennila T, et al. Rapid assessment of heavy metal toxicity using bioluminescent bacteria *Photobacterium leiognathi* strain GoMGm1 [J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2021, 193(3): 109
- [23] United States Environmental Protection Agency (US EPA). National Recommended Water Quality Criteria [S]. Washington DC: Office of Water, Office of Science and Technology, 2009
- [24] 刘树深, 刘芳, 刘海玲. 20 种水溶性有机溶剂对发光细菌的毒性效应[J]. 中国环境科学, 2007(3): 371-376
- Liu S S, Liu F, Liu H L. Toxic effects of 20 water-soluble organic solvents on bioluminescent bacteria [J]. China Environmental Science, 2007(3): 371-376 (in Chinese)
- [25] 姚洪伟, 舒耀皋, 汪丹. 3,5-二氯苯酚对浮萍的生长抑制效应[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(23): 113-115

- Yao H W, Shu Y G, Wang D. Growth inhibition effect of 3,5-dichlorophenol on duckweed [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2020, 48(23): 113-115 (in Chinese)
- [26] 李肇丽, 赵汉卿. 3,5-二氯苯酚对穗状狐尾藻的毒性影响[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(5): 85-86, 95
- Li Z L, Zhao H Q. The toxic effect of 3,5-dichlorophenol on *Myriophyllum spicatum* [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2018, 46(5): 85-86, 95 (in Chinese)
- [27] 钱骁. 工业废水中有害物质的发光细菌法检测研究[D]. 青岛: 青岛理工大学, 2013: 33-34
- Qian X. Study on detection of harmful substances in industrial wastewater by luminescent bacteria method [D]. Qingdao: Qingdao University of Technology, 2013: 33-34 (in Chinese)
- [28] 冉丽红. 石化工业特征污染物对海洋生物毒性研究[D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2018: 2-3
- Ran L H. Study on toxicity of characteristic pollutants in petrochemical industry to marine organisms [D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2018: 2-3 (in Chinese)
- [29] 汪皓琦, 董玉瑛, 汪灵伟. 3 种新型污染物对发光菌的毒性作用研究[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(4): 179-184
- Wang H Q, Dong Y Y, Wang L W. Study on the toxicity of three emerging pollutants to *Photobacterium phosphoreum* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2018, 13(4): 179-184 (in Chinese) ◆