

文章编号:1673-1689(2005)06-0106-05

发光细菌法在食品安全性检测中的应用

凌云, 赵渝, 徐亚同, 朱文杰

(华东师范大学 资源与环境科学学院, 上海 200062)

摘要: 食品安全性是当前全社会普遍关注的热点问题。其中, 监督检测手段与方法的研究是该领域一个重要的研究方向。作者阐述了发光细菌检测法在污染物快速检测中的应用。通过对发光细菌法在农药残留、重金属毒性与生物毒素等方面的检测研究表明, 作为一种速度快、灵敏度高、成本低廉的生物毒性监测方法, 发光细菌法将在食品安全快速检测领域中有着广泛的应用前景。

关键词: 食品安全性; 发光细菌; 快速检测

中图分类号: TS 201.3

文献标识码: A

Application of Photobacteria in Food Safety Inspection

LING Yun, ZHAO Yu, XU Ya-tong, ZHU Wen-jie

(School of Resource and Environment Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: The food safety is a social hotspot social currently. One important subject of the article is to study the way of monitoring and inspecting food safety. Application of photobacteria to monitor food contamination is summarized in this article. The study on monitoring the pesticide residues, heavy metal's toxicity and biological toxin by photobacteria indicated that, the photobacteria, as a quick, sensitive and cheap biological monitoring method, would have great development potential in the field of rapid food safety inspection.

Key words: food safety; photobacteria; rapid inspect

目前, 由于农、兽药残留、有机污染物污染、食品添加剂以及生物污染等引起的食品安全问题层出不穷, 因此食品安全问题成为社会各界关注的焦点。其中检测方法的研究成为该领域的一个新的研究热点。目前, 我国绝大部分食品安全监测方法的关键技术来源于国外, 以气相、液相色谱以及分光光度计等仪器分析为主, 这些方法可检出样品中的痕量污染物, 具有检测限低、精确度高等特点, 但是存在着操作复杂、时间长、成本较高的问题, 尤其不适宜作为食品生产流通过程中的现场监测, 也无法对污染物进行生物危害性评估^[1]。为适应我国国

情, 一些以生物化学、免疫学、分子生物学原理为基础的快速检测方法应运而生, 成为快速检测的主要手段。然而现有的食品快速检测方法一般都只是针对已知的食品污染物进行检测, 对于未知成分则大多无能为力^[2]。由于食品中需要检测的种类和组分很多, 分子结构复杂, 往往难以下手。生物检测法由于能同时对多种毒物产生发光受抑反应, 且前处理简单, 成本低廉, 在定性、半定量的现场快速检测中逐渐显现出了其优势。随着食品工业的发展, 采用发光细菌法检测食品安全性作为一种快速的初筛方法^[3], 已逐渐受到人们的广泛关注。

收稿日期: 2005-07-02; 修回日期: 2005-08-30.

基金项目: 上海市重大科技项目 (05DZ19101) 资助课题.

作者简介: 凌云 (1978-), 男, 浙江湖州人, 环境科学博士研究生.

1 发光细菌检测法简介

发光细菌方法应用于环境毒物的检测源于自 20 世纪 80 年代,由于其检测速度快、灵敏度高、设备简单以及具有极好的可扩展性,在环境样品的毒性检测中得到了迅猛的发展.研究表明,大部分有机污染物对发光细菌毒性与对多种水生生物的毒性呈明显正相关^[4].我国于 1995 年也将这一方法列为环境生物毒性检测的标准方法(GB/T15441-1995).发光细菌的发光机理的研究表明,不同种类的发光细菌的发光机理是相同的^[5].是由分子氧作用,胞内荧光酶催化,将还原态的黄素单核苷酸(FMNH₂)及长链脂肪醛氧化为 FMN(?)及长链脂

肪酸,同时释放出最大发光强度在波长为 450~490 nm 的蓝绿光,见图 1.

荧光素酶是生物体内催化荧光素或脂肪醛氧化发光的一类酶的总称,细菌荧光素酶是含 α 、 β 两个多肽亚基的单加氧酶,只有两个亚基共存时才有活性.从不同海洋细菌中提取到的细菌荧光素酶其相对分子质量差别较小.外来受试物主要通过下面两个途径抑制细菌发光:1)直接抑制参与发光反应的酶类活性;2)抑制细胞内与发光反应有关的代谢过程.凡能够干扰或破坏发光细菌呼吸、生长、新陈代谢等生理过程的任何有毒物质都可以根据发光强度的变化来测定^[6].

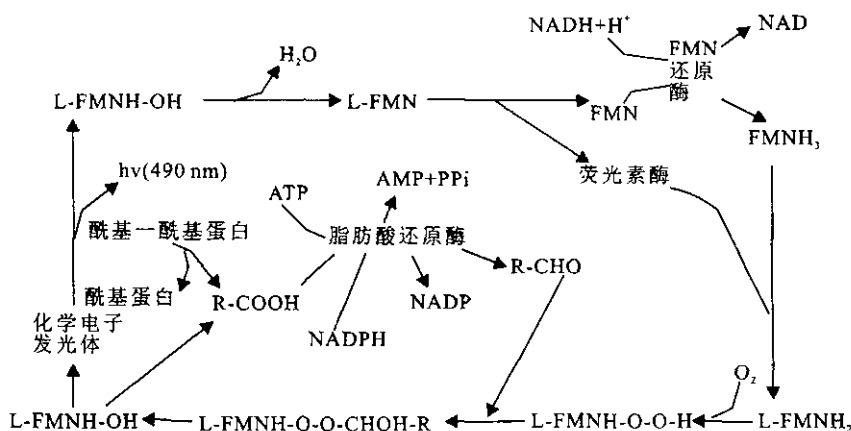


图 1 发光细菌发光原理图

Fig. 1 Principle of photobacteria luminescence

在自然界中,发光细菌主要分布在海洋中,包括明亮发光杆菌、发光杆菌、羽田希瓦氏菌、海氏交替单胞菌、哈维氏弧菌等等菌种,而淡水发光细菌包括青海弧菌、发光异短杆菌和霍乱弧菌等.国际上通常以明亮发光杆菌作为标准菌株,但在检测样品时必须添加 3% 的 NaCl 溶液,以满足这一菌株对高盐度的生态需要,结果造成某些样品的毒性与其他生物毒性检测的结果相关性较差^[15,16].本课题组朱文杰老师等^[17]于 1994 年分离获得自主知识产权淡水发光细菌为国际上惟一非致病的淡水发光细菌菌株,目前已经运用于环境污染物的生物毒性评价中,由于是淡水菌株,因此在实验中无须加入高盐度的发光细菌培养液,使得操作更为简便,对样品的影响也更小.

2 发光细菌检测法在食品安全检测中的应用

2.1 在农药残留检测中的应用

有机磷农药具有药效高、品种多、防治对象多、

在环境中易降解等优点,在我国农业生产中大量使用.但大多数品种属于高毒性,人们在食用高残留的水果蔬菜时会发生急性中毒或慢性中毒.对此,袁东星等^[7]探讨了采用发光细菌对甲胺磷、水胺硫磷、氧化乐果、敌敌畏、辛硫磷、甲基异硫磷等 6 种常用有机磷农药的检测状况.通过发光菌对蔬菜中以上 6 种有机磷农药抑光反应情况的分析表明,随着试样中有机磷农药浓度的增加,发光细菌的发光强度降低,发光强度与农药质量浓度呈负相关.发光细菌检测法的最小农药检出质量浓度为 3 mg/L.尽管发光强度与农药质量浓度没有严格的线性关系,但足以满足现场快速检测中的半定量要求.该方法的优点是快速、简便、灵敏、价廉,适用于现场,是检测蔬菜中有机磷农药残留的一种快速、有效、价廉的方法,且稍加改进后便可应用于蔬菜以外的食品如水果、稻米中的毒物检测.

2.2 在重金属生物毒性检测中的应用

用江、河、湖泊水进行农业灌溉引起的土壤重金属污染极易造成蔬菜、水果、大米、水产品中重金属含量超标,而重金属极易在人体内进行积累,从

而引发难以治疗的急慢性疾病. 因此, 重金属污染也是食品安全检测中的重要问题. 刘清等^[8]探讨了 Cu、Zn、Cd、Hg 等 4 种重金属对青海弧菌(Q67 菌株)的单独和联合毒性作用. 在单元素毒性试验中, 对每一种金属元素分别设置 5 个浓度系列, 根据损失发光强度与剩余发光强度的比值对结果进行处理. 发现这些金属对青海弧菌 Q67 产生了毒性反应. Zn 毒性最强, Cd 和 Hg 的毒性接近, 铜的毒性最低. 随后, 在设置的 11 组混合金属元素毒性研究中发现, Zn 和 Cd 对青海弧菌(Q67 菌株)有拮抗作用. Zn 和 Cu 有加和作用, 而 Cu 和 Cd, Cu 和 Hg, Zn 和 Hg, Cd 和 Hg 均为协同作用.

2.3 在致癌物质生物毒性检测中的应用

含氮杂环化合物广泛存在于石油工业、食品工业、医药工业中, 许多含氮杂环化合物具有强烈的“三致”作用, 同时又很难为自然界的微生物所降解, 会对人类健康产生潜在的危害. 为了给这些物质的急性毒性、联合毒性和危险性评价提供基础数据和基本方法, 江敏等^[9]研究了吡啶、吡啶、喹啉、异喹啉、2- 甲基喹啉和 8- 羟基喹啉等 6 种含氮杂环化合物对发光细菌的急性毒性作用及上述物质两两混合对发光细菌的联合毒性作用. 6 种含氮杂环化合物纯物质对发光细菌的毒性影响结果表明, 发光细菌的相对发光度均随化合物浓度的增加而线性降低, 具有良好的相关性, 其毒性由强至弱依次为 8- 羟基喹啉、异喹啉、吡啶、喹啉、2- 甲基喹啉、吡啶. 且所有物质两两混合的联合毒性作用均表现为相加作用.

2.4 在染料色素毒性效应评价中的应用

食用色素是最常用的食品添加剂. 19 世纪 80 年代开始使用合成色素作为食用色素, 由于是合成色素, 大部分含有偶氮双键结构, 属于偶氮染料. 目前国际上已全面禁止其作为食品染料使用. 但由于偶氮染料染色效果好、牢度强、食品色泽鲜亮、富有新鲜感、能激起人们的食欲和购买欲, 因此将其作为食品染料的现象时有发生^[10], 如最近发生的“苏丹红事件”.

为了对发光细菌检测染料的急性毒性测定提供建议, 党亚爱等^[11]根据 1995 年国家标准规定的发光细菌法测定化合物的急性毒性标准, 测定了碱性紫、活性黑、还原蓝等 17 种染料对发光细菌的抑制影响. 结果表明, 常用的 17 种染料对发光细菌均有一定的急性毒性, 而且染料的毒性与染料类型、分子大小、官能团性质有着一定的联系. 碱性染料的毒性最大, 还原性染料的毒性次之, 酸性染料的

毒性较小, 活性染料和直接染料的毒性最小. 单就同种性质的偶氮染料来看, 多偶氮类染料比单偶氮和双偶氮类染料对发光细菌发光量的影响要大. 该方法检测的优点在于: 发光细菌对环境敏感, 容易培养, 测试时只需微量样品; 试验过程中不需要严格的无菌操作, 测试简便、快速、适用性强、重复性好、灵敏度高且费用低廉.

2.5 在生物毒素检测评价中的应用

天然毒素是一大类生物活性物质的总称, 主要包括真菌毒素、海洋毒素、微生物毒素等. 由于其毒性对食品安全和人类健康已构成了严重的威胁, 所以对其进行检测也是食品安全的重要内容之一. 黄曲霉毒素 B₁ 为强致癌物质, 传统的测试方法繁琐、准确度差、成本高. 赵华清等^[12]采用明亮发光杆菌 T3 小种的暗变种 T9171 菌株检测了黄曲霉毒素 B₁、苯酚、环磷酸胺、缩水甘油、硫酸二乙酯、溴化乙锭、甲基磺酸乙酯、硫酸锌、重铬酸钾等 9 种化合物和 14 种环境样品的基因毒性. 结果表明, 在 9 种化合物中检出 3 种阳性物, 6 种可疑物. 由于该菌株对黄曲霉毒素 B₁ 的敏感性较差, 因此黄曲霉毒素 B₁ 的阳性反应仅有 42%, 但如果对菌株进行调整, 将会有更满意的结果. 环境基因毒物的筛选中, 发光细菌法也是一种非常有价值的短期生物试验方法.

2.6 利用发光基因的 Ames 氏试验及其应用研究

在污染物的基因毒性检测方面, Ames 试验是检测遗传毒物的基准方法, 它是公认的筛选具有潜在遗传毒性化合物的方法. 但 Ames 试验操作复杂、测定时间长、条件要求高, 而发光菌 Ames 试验具有发光检测可自动化操作、省时、省力和细菌培养时间短等优点. Ulitzur S^[19]、Richard A Wecher 等^[20]的研究表明: 可以用发光细菌暗变种检测致突变化合物, 美国 Microbics 公司发展了一种短期的检测遗传毒性的生物测定方法(发光细菌法), 其商品名称为“Mutatox”^[21]. 朱文杰申请了一种以基因工程发光细菌用于化合物基因毒性检测的专利^[22], 其方法是将青海弧菌的发光基因导入鼠伤寒沙门氏菌 TA97, 构建成基因工程菌 LZ- 17. 该工程菌能产生细菌荧光酶, 加入萘醛后能发出波长为 440~ 640 nm 的可见光, 具备鼠伤寒沙门氏菌 TA97 所具有的与 Ames 试验有关的性状. 该工程菌作为受试生物应用于 Ames 试验中, 采用发光检测确定回变细菌的数量, 并以此评价受试污染物的基因毒性.

2.7 在药品生物毒性评价中的应用

抗癌中药“十八反”配伍药物的毒性问题一直存在着争议, 沈光稳等^[13]采用明亮发光杆菌对甘

草、甘遂等及其配伍药物,川乌、半夏等及其配伍药物,藜芦、党参等及其配伍药物对发光杆菌的发光抑制进行了测定。结果表明,某些配伍药物毒性反而小于单个药物,支持了“十八反”配伍毒性并不增加,相反有些毒性有所降低的结论。

3 结 论

发光细菌法在环境监测中已经得到了广泛的

应用,而现在食品当中的大多数污染物也可以用发光细菌法进行检测。但是由于食品中成分复杂,而且污染物浓度较低,以前用的仪器设备无法达到我们的检测低限,因此发光细菌用于食品安全的检测还不多见。但是,随着对该方法的不断深入研究,检测仪器的日益完善,检测范围和检测限的不断增加,作为一种速度快、灵敏度高、成本低廉的生物毒性监测方法,发光细菌将在食品安全检测中有着更为广泛的作用。

参考文献:

- [1] 何永红,高志贤,晁福寰. 基于生物学原理的农药残留检测技术研究[J]. 卫生研究 2004,33(1):112—114.
- [2] 张志洁 林清玉. 我国食品安全检测主要应用技术的研究及现状[J]. 食品工业科技, 2003,24 (12):89— 91.
- [3] 朱丽梅. 生物检测方法在农药残留检测中的应用[J]. 南京农专学报,2003,19(3):42— 46.
- [4] Alex W Kwong, Chi-yui Chan, Reinhard Renneberg. Monitoring biodegradable substances with high-molecular content with a microbial sensor [J]. **Analytical Letters**,1998,31(14):2309—2325.
- [5] Thomtdka KW. Use of bioluminescent bacterium *Photobacterium phosphoreum* to detect potentially biohazardous materials in water[J]. **Bull. Environ. Contam Toxicol.** ,1993,51(4):538.
- [6] 杜宗军. 发光细菌的研究和应用[J]. 高技术通讯,2003,12:103—106.
- [7] 袁东星. 蔬菜中有机磷农药残留的发光菌快速检测[J]. 环境化学,1997,16(1):77—81.
- [8] 刘清. Cu、Zn、Cd、Hg 对青海弧菌(Q67 菌株)联合毒性作用的研究[J]. 中国环境科学,1997,17(4):301—303.
- [9] 江敏,顾国维,李咏梅. 6 种含氮杂环化合物对发光细菌的毒性研究[J]. 上海环境科学,2003,22(12):931—934.
- [10] 郑屏,徐业平,汤峻松. 食品中偶氮染料 PONCEAU2R 的快速鉴定[J]. 检验检疫科学,2000,10(6):36—38.
- [11] 党亚爱. 利用发光菌评价 17 种染料的毒性效应[J]. 西北农林科技大学学报,2003,31(3):183—186.
- [12] 赵华清. 发光细菌法检测环境污染中的基因毒性[J]. 应用与环境生物学报,2000,6(6):577—580.
- [13] 沈光稳. 采用发光细菌研究探讨“十八反”配伍药物的临床毒性[J]. 中医药研究,1998,14(1):10.
- [14] Alex W Kwong, Chi-yui Chan, Reinhard Renneberg. Monitoring biodegradable substances with high-molecular content with a microbial sensor [J]. **Analytical Letters**,1998,31(14):2309—2325.
- [15] Hindwood A L, M J McCormick. The effect of ionic solutes on EC50 values measured using the Microtox test[J]. **Toxicity Assess**,1987,2:449—461.
- [16] Vasseur P F. Influence of physicochemical parameters on the Microtox test response[J]. **Toxicity Assess**,1986,1:283—300.
- [17] 朱文杰,汪杰. 发光细菌一新种——青海弧菌[J]. 海洋与湖沼,1994,25(3):275—279.
- [18] 马梅,童中华. 新型淡水发光菌(*Vibrio qinghaiensis*- Q67)运用与环境样品毒性检测的初步研究[J]. 环境科学学报,1998,18(1):86—91.
- [19] Ulitzur S. A new sensitive and simple bioluminescence test for mutagenic compounds[J]. **Mutat Res**, 1980,74 :113—124.
- [20] Richard A Wecher. Bioassay procedures for identifying genotoxic agents using light emitting bacteria as indicator organisms[J]. **Serono Symp Publ**,1982,1:109.
- [21] Kwan K K. Mutatox test ; A new test for monitoring environmental genotoxic agents[J]. **Environ Pollut**,1990 ,65:323—332.
- [22] 朱文杰,杨晔晔,景奉香,等. 工程菌 LZ-17 的构建和应用[P]. 中国专利:CN1448504, 2003-10-11.
- [23] Tydrich L. New applications for ATP bioluminescence methods[J]. **Cereal Food World**,1996,41:463—465.
- [24] Griffiths MW. The role of ATP bioluminescence in the food industry ; new light on old problems[J]. **Food Technol**, 1996,5:62—66, 68, 71, 72.
- [25] Strachan G, Preston S, Maciel H, *et al.* Use of bacterial biosensors to interpret the toxicity and mixture of herbicides in freshwater[J]. **Wat Res**,2002,35(14):3490—3945.

[26] 黄正,任恕. 微生物传感器在污染物生物毒性分析中的应用[J]. 传感器技术,2004,23(9):4—6.

[27] Han TS, Kim YC, Sasaki, *et al.* Microbial sensor for trichloroethylene determination[J]. **Anal Chimm Acta**,2001,431: 225.

[28] 王建龙,文湘华. 现代环境生物技术[M]. 北京:清华大学出版社,2001,18.

[29] Kaiser K L E. Correlations of vi. brio fischeri bacteria test data with bioassay data for other organisms[J]. **Enviromental Perspectives**,1998,106(Supplement 2):583—591.

[30] 杨大进. 农药残留生物快速检验方法[J]. 中国食品卫生杂志,1998,10(2):38—40.

(责任编辑:李春丽,杨 萌)

(上接第 93 页)

续表 1

治疗 时间/m	空腹血糖浓度/ (mmol/L)		糖化血红蛋白 质量分数/%	
	黄酮苷 治疗组	西药 治疗组	黄酮苷 治疗组	西药 治疗组
6	6.78±1.3	8.76±1.5	6.95±2.5	10.29±3.9
7	6.59±1.2	8.71±1.6	6.73±2.2	10.12±4.1
8	6.41±1.2	8.68±1.7	6.68±1.9	10.04±4.2
9	6.35±1.1	8.67±1.4	6.53±2.0	9.92±5.6

糖化血红蛋白含量变化在两个治疗组之间的差异要大于空腹血糖含量变化. 黄酮苷治疗组糖尿病患者在治疗一个月后的糖化血红蛋白含量就低于西药治疗组,治疗九个月后为 6.53%±2.0%,比西药治疗组的 9.92%±5.6%低 3.39%. 揭示黄酮苷降低糖尿病患者的空腹血糖值是通过降低糖化血红蛋白含量而实现的. 这一治疗结果是否具有普遍规律性则还有待更多重复性疗效结果的支持.

参考文献:

[1] Samad Shera, Ieena Etu. Increasing diabetes prevalence hits developing countries[J]. **Medicine Digest**,2000, 8(5): 16.

[2] 田浩明. 糖化血红蛋白在糖尿病诊断中的价值[J]. 华西医科大学学报,1990,21(2):197.

(责任编辑:朱 明)