

DMSO 胁迫提高发光细菌毒性实验敏感度的研究

吴晓壬¹, 罗剑飞¹, 朱兴江², 赵丹丹², 林炜铁¹

(1. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

(2. 马鞍山市产品质量监督检验所, 安徽马鞍山 243000)

摘要: 利用二甲基亚砜(DMSO)胁迫, 以发光细菌青海弧菌 Q67 种为实验菌种, 通过与标准物质作用测定相对发光值确定其生物毒性效价, 对多种食品中可能存在的污染物进行毒性对比研究。结果表明, DMSO 浓度在 0.1%~1.0% 之间不影响发光细菌正常生理反应, 同时可以有效的提高其对毒性物质作用毒性。DMSO 能明显提高发光细菌的检测敏感度, 有效降低半数致死量 EC₅₀。对受试重金属汞、铜、镉和锌, 其提高效率为 43.28%~58.50%; 四环类抗生素中盐酸金霉素、盐酸四环素和土霉素的提高效率在 8.2%~11.6% 之间; 抗菌类农药二氰蒽醌、溴菌腈、甲霜灵和异菌氰胺的提高效率为 10.49%~38.32%。DMSO 的胁迫促进效果适用于多种毒性物质, 并且能够在短时间内提高作用效果(30 min 以内), 为食品领域应用生物毒性检测方面提供了一种新的分析方法。

关键词: 发光细菌; DMSO; 重金属; 抗生素; 抗菌农药; 敏感度

文章编号: 1673-9078(2017)5-298-304

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.5.048

Enhancement of Luminescent Bacteria Sensitivity on Toxic Substances by DMSO

WU Xiao-ren¹, LUO Jian-fei¹, ZHU Xing-jiang², ZHAO Dan-dan², LIN Wei-tie¹

(1.School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

(2.Product quality Supervision and Inspection Institute, Ma'anshan 243000, China)

Abstract: The luminescent bacteria *V.qinghaiensis* Q67 was selected as test bacterium. Through testing with the standard material, RLU(Relative light unit) was determined as the biological toxicity titer. The experiment had detected the toxicity of several kinds of toxic substances in food. Results showed that when the concentration of DMSO ranges from 0.1% to 1.0%, DMSO significantly improved the toxicity of *V.qinghaiensis* Q67 to toxic substance and had little influence to luminescent bacteria. The toxicity test with different concentrations of DMSO is significantly increased and the EC₅₀(concentration for 50% of maximal effect) were reduced observably. The EC₅₀ of copper, mercury, cadmium and zinc were enhanced from 43.28% to 58.50%. The efficiencies of DMSO to Tetracyclines antibiotic including chlortetracycline, tetracycline and oxytetracycline were enhanced from 8% to 11.6%. The toxicity of four antimicrobial pesticides including Two-anthraquinone, Bromothalonil, metalaxyl and iprodione like amine fluoride were promoted from 10.49% to 38.32%. DMSO stress method was suitable for a variety of toxic substances, and also could appeared in a short time (less than 30 min), which provided a new analytical method for the application of biological toxicity test in the field of food.

Key words: Luminescent bacteria; DMSO; heavy metals; antibiotics; Antimicrobial pesticides; sensitivity

发光细菌生物快速毒性测试法是利用有毒物质浓度与发光细菌发光强度变化成一定比例关系, 通过检测发光菌与待测物作用前后光强变化来判断待测物毒性大小的综合毒性检测方法^[1]。与传统的仪器检测方法(如光谱法、分光光度法、气相色谱法、液相色谱法、气-质联仪法、液-质联仪法和核磁共振法等)

收稿日期: 2017-01-12

基金项目: 马鞍山市产品质量监督检验所委托项目(x2SW-B514183)

作者简介: 吴晓壬(1991-), 男, 在读硕士, 主要从事环境检测方面的研究

通讯作者: 林炜铁, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事环境微生物方面的研究

相比, 生物监测法不需大型设备, 检测快速、成本低, 可以了解污染物的生物毒性与基因毒性效应, 也可作为精密的仪器分析法的补充, 有效地降低检测成本^[2,3]。

在实际应用过程中, 由于发光细菌针对不同的毒性物质的反应敏感度不同, 且当待测物质的浓度过低时, 由于细胞膜的阻隔作用, 毒性物质进入到细菌体内作用时间过长, 无法短时间内呈现出抑制效果。由于发光细菌冻干粉复苏过程中保持自身发光强度不变时间约为 1~2 h, 要保证在发光细菌正常的生理活动情况下尽可能缩短检测所需要的时间, 提高检测效率,

扩大生物毒性检测的可适用范围。因此, 寻求一种提高发光细菌敏感度的办法, 缩短检测所需要的时间, 对解决发光细菌快速检测的局限性具有重要意义。

二甲基亚砜(DMSO)是一种含硫有机化合物, 常温下为无色无臭的透明液体, 是一种吸湿性的可燃液体。具有高极性、高沸点、热稳定性好、非质子、与水混溶的特性, 由于能分子量小, 可以迅速透入细胞。DMSO作为一种极性表面活性剂, 能够破坏革兰氏阴性菌发光细菌的磷脂分子层, 膜改变发光细菌细胞膜的通透性, 可加速分子物质进去透过细胞膜, 并且有研究表明 DMSO 可以明显的改善细胞膜的通透性。

利用 DMSO 快速携带毒性物质进入细胞, 并且能一定程度地提高细胞膜通透性的特点, 可以在一定程度上促进在单位时间内毒性物质对发光细菌细胞作用效果, 进而提高发光细菌对待测毒性物质的检测敏感度。本文章对农产品中可能存在的食品污染毒性物质进行试验, 并且对 DMSO 胁迫下对发光细菌敏感度的提高做了一系列的研究。

1 材料与方法

1.1 菌种

实验采用的发光细菌为青海弧菌 Q67 (*Vibrio qinghaiensis* sp.-Q67)冻干粉购自于北京滨松光子有限公司, 编号为 CS235。

1.2 试剂和材料

实验选取 11 种毒性检测物质标准品, 均为分析纯, 其中重金属包括氯化汞、氯化镉、氯化锌和硫酸铜; 四环类抗生素包括盐酸金霉素、盐酸四环素和土霉素; 抗菌类农药有二氧蒽醌、溴菌腈、甲霜灵和异菌氟脞胺。以上试剂均购自于广州普博欣生物科技有限公司。

发光细菌复苏液: KH_2PO_4 0.27 g, Na_2HPO_4 1.42 g, NaCl 8.5 g, MgSO_4 0.5 g, CaCl_2 0.01 g, 蒸馏水 1000 mL, 调节 pH=7.0, 121 °C、20 min 灭菌待用。

发光细菌渗透压缓冲液: KH_2PO_4 0.27 g, Na_2HPO_4 1.42 g, KCl 0.2 g, NaCl 8.5 g, 蒸馏水 1000 mL, 调节 pH=7.0, 121 °C 20 min 灭菌待用。

1.3 实验方法

1.3.1 发光细菌冻干粉复苏

取青海弧菌 Q67 冻干粉一支, 用移液枪加入 1 mL

发光细菌复苏液加入冻干粉中, 混匀至没有冻干粉沉淀, 静置室温 15 min 待用。

1.3.2 相对发光值测定

取 1 mL 将待检测的样品, 并加入 100 μL 新鲜复苏的发光细菌复苏液, 用移液枪混匀后, 取 100 μL 置于白色酶标板上, 利用多功能酶标仪测量其发光强度, 并计算相对发光值:

$$\text{相对发光值} = \frac{\text{样品发光强度}}{\text{对照品发光强度}} \times 100\%$$

1.3.3 DMSO 剂量对发光细菌发光值的影响

取发光细菌渗透压缓冲液, 按体积分数加入 DMSO 浓度 0.1%、0.5%、0.8%、1%、2%、5%、10%、20%和 30%, 加入复苏好的青海弧菌 Q67 复苏液, 进行青海弧菌 Q67 毒性试验对比空白计算所得相对发光值, 考察 DMSO 与青海弧菌的剂量-效应关系。

1.3.4 重金属标准样品的毒性检测

(1) 用发光细菌缓冲液分别将氯化汞、氯化镉、硫酸铜、氯化锌重金属试剂的按表 1 的离子浓度设定的浓度进行配置, 并用移液器精确的吸取 100 μL 发光细菌复苏液到 1 mL 配置好的标准溶液中, 30 min 测定其发光强度, 计算相对发光值。

(2) 配制一系列添加梯度浓度为 0% (空白对照)、0.10%、0.20%、0.30%、0.40%和 0.50%的二甲基亚砜的发光细菌缓冲液, 并且用缓冲液配制一系列浓度梯度的四种重金属溶液, 将复苏好的发光细菌菌液加入到重金属离子溶液中, 30 min 后通过测定发光值。

1.3.5 四环类抗生素标准品的毒性检测

取盐酸金霉素、盐酸四环素、土霉素分析纯标准品按表 3 的梯度浓度进行配置浓度, 加入复苏好的发光细菌液, 30 min 进行发光细菌毒性检测, 比计算得到 EC_{50} 浓度。利用计算得到的 EC_{50} 浓度, 在发光细菌渗透压调节液中添加一定 0.2%、0.4%、0.6%、0.8%和 1.0%的 DMSO 胁迫下进行毒性检测, 30 min 后检测其发光值, 对照空白计算相对发光值。

1.3.6 抗菌类农药的标准品毒性试验

取四种抗菌类农药, 按表 5 的浓度进行配置, 加入发光细菌冻干粉复苏液, 30 min 后测量其相对发光值, 参照 1.3.5 在抗菌类农药进行梯度 DMSO 的胁迫毒性检测。

2 结果与讨论

2.1 DMSO 剂量对发光细菌剂量-效应影响

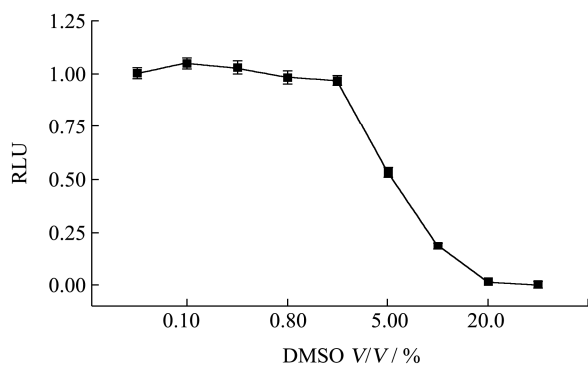


图1 DMSO与青海弧菌Q67作用30 min的剂量-效应曲线(30 min)

Fig.1 Dose-response curves of DMSO toxicity to *V. qinghaiensis* Q67 (30 min)

从图1可以看出, DMSO的浓度大于1%, 对发光细菌存在着明显的毒性作用。选取DMSO的浓度不超过1%作为发光细菌检测毒性物质的胁迫剂量。

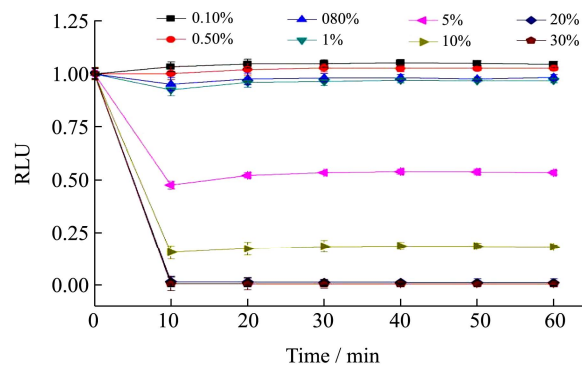


图2 不同时间下DMSO与发光细菌毒性变化剂量-效应变化曲线

Fig.2 Dose-response curves of DMSO toxicity to *V. qinghaiensis* Q67 over time

从图2的结果可以看出, DMSO对当发光细菌的影响随时间变化不明显, 且在浓度低于1%时, 对发光细菌的发光值影响小于5%, 并且在1h之内发光值保持不变。

表1 四种重金属对发光细菌的剂量-效应结果

Table 1 Dose-response curves of the toxicity of four heavy metals to *V. qinghaiensis* Q67

测定物质	浓度/(mg/L)	RLU(相对发光值)	回归方程	R ²	EC ₅₀ /(mg/L)
Hg ²⁺ (HgCl ₂)	0	1.00±0.017	y=-5.4776x+1.4946	0.9824	0.1814
	0.08	0.984±0.021			
	0.1	0.937±0.012			
	0.12	0.840±0.035			
	0.14	0.703±0.018			
	0.16	0.656±0.020			
	0.18	0.532±0.037			
Cd ²⁺ (CdCl ₂)	0	1.00±0.024	y=-0.1865x+1.1042	0.9866	3.2396
	1	0.924±0.022			
	2	0.726±0.017			
	3	0.563±0.032			
	4	0.339±0.015			
	5	0.145±0.032			
	6	0.012±0.004			
Cu ²⁺ (CuSO ₄)	0	1.00±0.027	y=-0.0828x+1.2459	0.9953	9.0052
	1	1.002±0.011			
	2	0.987±0.024			
	4	0.915±0.037			
	6	0.773±0.027			
	8	0.622±0.020			
Zn ²⁺ (ZnCl ₂)	0	1.00±0.015	y=-0.2131x+1.1836	0.9997	3.2071
	1	1.022±0.012			
	3	0.649±0.031			
	5	0.546±0.025			

转下页

接上页

7	0.476±0.023
9	0.324±0.033
10	0.204±0.008

2.2 重金属 DMSO 胁迫下实验结果

2.2.1 重金属对发光细菌的抑制效应

对以上所测得的数据,以浓度作为横轴,相对发光值为数轴,利用 GraphPadPrism5 软件进行回归分析,得到回归方程,并计算半数致死量 EC₅₀ 表示重金属的毒性大小。

根据以上实验数据的结果,对青海弧菌 Q67,重金属浓度与相对发光值在一定浓度之间呈良好的线性关系,R² 值可以达到 0.95 以上。根据半数致死量 EC₅₀ 汞呈现出毒性最强的汞,其次是锌,再者是镉,毒性最低的是铜。

2.2.2 DMSO 胁迫下重金属毒性提高程度

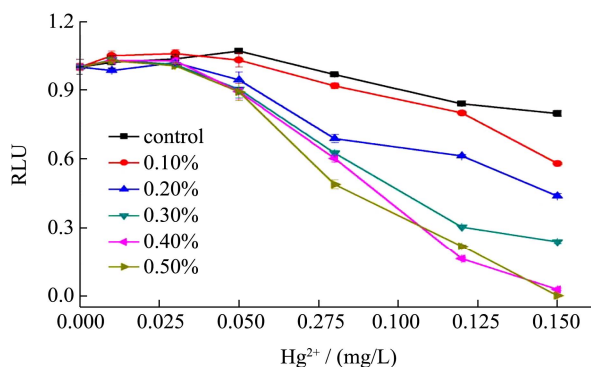


图3 不同 DMSO 添加浓度下重金属汞对发光细菌相对发光值变化曲线

Fig.3 Changes in the RLU emitted by *V. qinghaiensis* Q67 treated with heavy metal mercury under different DMSO concentrations

根据实验结果显示,DMSO 的添加量的增加,发光细菌的相对发光值成逐渐递减,Hg²⁺ 浓度为 0.15 mg/L 时,空白组的相对发光值还在 1.0 左右,DMSO

表2 三种四环类抗生素浓度-效应效果

Table 2 Dose-respone curves of 3 kinds of Tetracyclines antibiotic

测定物质	浓度/(mg/L)	RLU(相对发光值)	回归方程	R ²	EC ₅₀ /(mg/L)
盐酸金霉素	0	1.00±0.011	y=-0.0462x+0.8929	0.9497	8.504
	1	0.865±0.028			
	5	0.727±0.012			
	10	0.325±0.034			
	15	0.138±0.024			
	20	0.049±0.027			

添加量分为 0.1%、0.2%和 0.3%的实验组相对发光值为 0.58、0.43 和 0.24,添加量在 0.4%和 0.5%的实验组都到达致死水平(相对发光值接达到 0),可以看出不同 DMSO 的添加量对发光细菌的敏感程度有不同的提升。

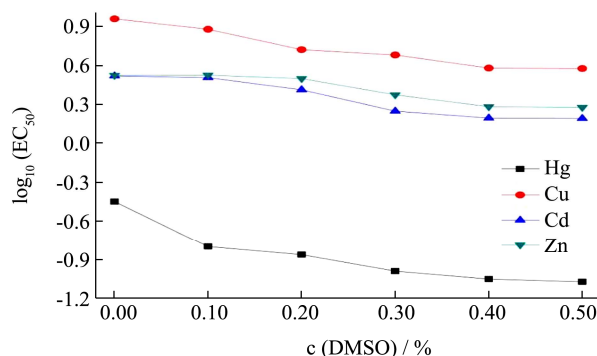


图4 四种重金属在 DMSO 胁迫下 EC₅₀ 的变化趋势

Fig.4 Trend of the change in EC₅₀ of four heavy metals under DMSO stress

从图上的结果可以看出,四种重金属离子在 DMSO 的作用下,半数致死量 EC₅₀ 呈不同程度的下降趋势,其中 Hg²⁺ 从 0.1814 mg/L 下降到 0.0843 mg/L, Cu²⁺ 从 9.0052 mg/L 下降到 3.7366 mg/L, Cd²⁺ 从 3.2396 mg/L 下降到 1.5422 mg/L, Zn²⁺ 从 3.2071 mg/L 下降到 1.8753 mg/L,达到相同程度的毒性所需要的剂量都不同程度减少,敏感度分别提高 53.52%、58.50%、52.90% 和 43.28%,说明发光细菌在 DMSO 胁迫下对重金属离子敏感程度更高。

2.3 四环类抗生素毒性实验结果

2.3.1 四环素类抗生素在 DMSO 胁迫下发光细菌的影响效果

转下页

接上页

盐酸四环素	0	1.00±0.032	$y=-0.0392x+1.0451$	0.9895	13.905
	1	0.984±0.017			
	5	0.904±0.024			
	10	0.618±0.033			
	15	0.452±0.024			
	20	0.271±0.028			
土霉素	0	1.001±0.010	$y=-0.0828x+1.2459$	0.9953	9.0052
	10	0.855±0.029			
	20	0.638±0.032			
	30	0.498±0.025			
	40	0.359±0.037			
	50	0.296±0.014			

由上表的结果得出，毒性回归方程呈现出良好的线性关系， R^2 值都在 0.94 以上，根据 EC_{50} 的大小，可以判断三种抗生素的毒性大小比较结果为：盐酸金霉素 (8.504 mg/L) > 盐酸四环素 (13.905 mg/L) > 土霉素 (32.727 mg/L)。这由于四环素类抗生素作用机理是直接抑制细胞的蛋白值代谢，相比其他抗生素短时间作用效果明显，也是作为发光细菌快速检测的标准品之一。

2.3.2 DMSO 胁迫下对四环素类抗生素敏感程度的提高

从上图的结果可以看出，在 DMSO 的胁迫下，同样剂量的抗生素的毒性随着 DMSO 的添加量成正相关关系，当金霉素中 DMSO 的添加量为 1.0% 时，相对发光值降低至 0.445，敏感程度提高 11.5%，相应的四环素和土霉素的也降低至 0.442 和 0.46，敏感程度提高 11.6% 和 8.2%。实验结果看出，高浓度的 DMSO 是存在一定的促进作用，提高敏感程度在 8%~11.6%

之间。

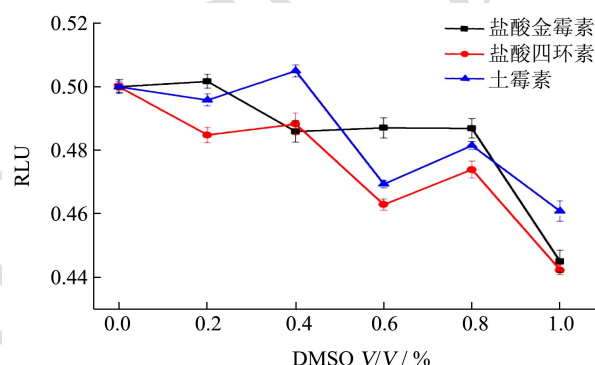


图 5 三种抗生素 EC_{50} 剂量在 DMSO 胁迫下发光值的变化趋势

Fig.5 Changes in emitted RLU at EC_{50} for three antibiotics under DMSO stress

2.4 抗菌类农药毒性实验结果

2.4.1 抗菌类农药对发光细菌毒性影响

表 3 四种抗菌农药剂量-效应作用效果

Table 3 Dose-response curves of four antimicrobial pesticides

测定物质	浓度/(mg/L)	RLU(相对发光值)	回归方程	R^2 值	EC_{50} /(mg/L)
二氟苄醌	0	1.00±0.012	$y=-0.3905x+0.9804$	0.8855	1.2302
	0.1	0.864±0.016			
	0.3	0.837±0.024			
	0.5	0.818±0.032			
	0.8	0.790±0.010			
	1	0.570±0.005			
	1.2	0.699±0.011			
	1.5	0.341±0.027			
	0	1.00±0.014			
0.1	0.899±0.009				
0.2	0.603±0.025				

转下页

接上页

	0.4	0.395±0.011		
	0.6	0.403±0.019		
	0.8	0.281±0.029		
	1	0.164±0.041		
	1.2	0.043±0.310		

	0	1.00±0.033		
	0.1	0.967±0.024		
	0.3	0.765±0.010		
甲霜灵	0.5	0.600±0.042	$y=-0.453x+0.934$	0.8998
	0.8	0.464±0.019		0.9580
	1	0.446±0.031		
	1.2	0.485±0.011		
	1.5	0.295±0.030		

	0	1.00±0.012		
	1	0.916±0.026		
	3	0.575±0.019		
异菌氟胺胺	5	0.648±0.011	$y=-0.0551x+0.9605$	0.9751
	10	0.335±0.030		8.3575
	15	0.195±0.012		
	20	0.144±0.028		
	25	0.023±0.009		

根据回归分析, 回归方程都在 0.88 以上, 在都在一点的浓度梯度范围里面呈现良好的线性关系, 根据 EC₅₀ 得出抗菌类农药对发光细菌的作用效果比较, 四种抗菌农药毒性大小依次为溴菌腈>甲霜灵>二氰葱醌>异菌氟胺胺, 可作为发光细菌检测的标准品。

2.4.2 DMSO 胁迫下抗菌类农药毒性影响

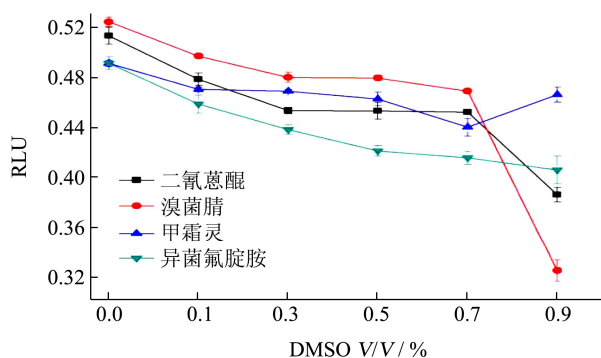


图6 四种抗菌农药 EC₅₀ 剂量在不同浓度 DMSO 胁迫下作用效果

Fig.6 Changes in emitted RLU at EC₅₀ for four antimicrobial pesticides under DMSO stress

从上图的结果表明, 同样 EC₅₀ 剂量的情况下随着 DMSO 浓度的提高, 抗菌类农药对发光细菌的毒性有明显的增强, 当 DMSO 浓度为 0.9% 促进效果最佳, 二氰葱醌发光值达到 0.3842, 相对毒性提高 24.95%; 溴菌腈发光值在 DMSO 浓度为 0.9% 时, 相对发光值

为 0.3227, 毒性提高 38.32%; 甲霜灵最适促进浓度为 0.7%, 促进效率为 10.49%; 异菌氟胺胺最高提高效率为 17.5%。四种农药都存在不同程度的明显提高, DMSO 是一种助溶剂, 能提高农药主要成为分的水溶液中溶解度, 并快速穿透细胞膜进入细菌内进行发挥毒性抑制作用, 从而达到短时间内提高发光细菌检测敏感度的效果。

3 结论

3.1 以不同 DMSO 的添加浓度, 对发光细菌青海弧菌 Q67 进行剂量效应实验, 结果表明, 当 DMSO 浓度在 0.1%~1.0% 之间, 对发光细菌发光值的影响程度低于 0.5%, 且 DMSO 作用下细菌发光值在 1 h 之内保持稳定, 满足细菌毒性检测的要求。

3.2 以青海弧菌 Q67 作为受试菌种, 对多种毒性物质标准品进行毒性检测, 包括 4 种重金属离子、3 种四环类抗生素和 4 种抗菌类农药。根据实验数据进行回归分析和 EC₅₀ 计算, 11 种毒性物质的剂量-效应回归方程 R² 值都在 0.85 以上, 线性效果良好。通过 EC₅₀ 分析重金属毒性比较: Hg²⁺>Zn²⁺>Cd²⁺>Cu²⁺, EC₅₀ 值分别为 0.1814 mg/L、3.2071 mg/L、3.2729 mg/L 和 9.0052 mg/L; 四环类抗生素毒性比较: 盐酸金霉素>盐酸四环素>土霉素, EC₅₀ 值分别为 8.504 mg/L、13.905

mg/L、32.727 mg/L; 抗菌类农药毒性比较: 溴菌腈>甲霜灵>二氰蒽醌>异菌氟胺胺, 其 EC₅₀ 值分别为 0.4682 mg/L、0.9580 mg/L、1.2302 mg/L 和 8.3575 mg/L。

3.3 DMSO 胁迫下, 11 种试验标准品的毒性浓度随着 DMSO 的添加量成正相关的趋势, 在 DMSO 浓度为 0.5% 的情况下, 四种重金属 Hg²⁺、Zn²⁺、Cd²⁺ 和 Cu²⁺ 的 EC₅₀ 值分别降低 53.52%、58.50%、52.90% 和 43.28%; 在 DMSO 胁迫下, 三种四环类抗生素 (盐酸金霉素、盐酸四环素和土霉素) 的 EC₅₀, 对发光细菌敏感程度分别为 11.5%、11.6% 和 8.2%; DMSO 对四种抗菌类农药二氰蒽醌、溴菌腈、甲霜灵和异菌氟胺胺的促进效率分别为 24.95%、38.32%、10.49% 和 17.5%。

3.4 DMSO 胁迫下发光细菌对多种有毒物质敏感度都存在不同程度的提高, 并且可以应用于食品中残留物质检测, 作为初筛和生物毒性验证性研究具有良好的应用前景, 为发光细菌快速检测领域提供了一种新的方法。

参考文献

- [1] 杨洁, 张金萍, 徐亚同, 等. 11 种农药对淡水发光细菌青海弧菌 Q67 的毒性研究[J]. 环境污染与防治, 2011, 33(4): 20-24
YANG Jie, ZHANG Jin-ping, XU Ya-tong, et al. The toxicities of 11 pesticides to freshwater luminescent bacterium *V. qinghaiensis* Q67 [J]. Environmental Pollution and Control, 2011, 33(4): 20-24
- [2] 周明霞. 发光细菌的分离鉴定以及用于环境毒性检测的系统研究[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2012
ZHOU Ming-xia. Identification of *Photobacterium* and its systematic study on environment toxicity detection [D]. Changsha: Hunan Normal University, 2012
- [3] Heinlaan M, Kahru A, Kasemets K, et al. Rapid screening for soil ecotoxicity with a battery of luminescent bacteria tests [J]. Altern Lab Anim, 2007, 35(1): 101-110
- [4] Son A, Nichkova M, KDosev D, et al. Luminescent lanthanide nanoparticles as labels in DNA microarrays for quantification of methyl tertiary butyl ether degrading bacteria [J]. Nanosci Nanotechnol, 2008, 8(5): 2463-2467
- [5] Rantala A, Utriainen M, Kaushik N, et al. luminescent bacteria based sensing method for methylmercury specific determination [J]. Anal. Bioanal. Chem., 2011, 400(4): 1041-1049
- [6] 张瑾, 刘树深, 窦容妮, 等. 30 种离子液体对青海弧菌 Q67 的毒性效应[J]. 环境科学, 2011, 32(4): 1108-1113
ZHANG Jin, LIU Shu-shen, DOU Rong-ni, et al. Toxicities of 30 ionic liquids to *Vibrio qinghaiensis* sp. Q67 [J]. Environmental Science, 2011, 32(4): 1108-1113
- [7] Boiandin A N, Kalacheva G S, Rodicheva E K, et al. Synthesis of reserve polyhydroxyalkanoates by luminescent bacteria [J]. Mikrobiologiya, 2008, 77(3): 364-369
- [8] Gusev A, Kargatova T V, Medvedeva S E, et al. Quantitative criteria for the estimation of the effectiveness of bioluminescence expression in natural and transgenic luminescent bacteria [J]. Biophysics, 2008, 53(5): 836-841
- [9] Tsybul'skii I E, M A Sazykina. New biosensors for assessment of environmental toxicity based on marine luminescent bacteria [J]. Prikl. Biokhim. Mikrobiol., 2010, 46(5): 552-527
- [10] Medvedeva S E, O A Mogil'Naia, L Popova. Heterogeneity of the populations of marine luminescent bacteria *Photobacterium leiognathi* under different conditions of cultivation [J]. Microbiology, 2006, 75(3): 349-357
- [11] Ma J, Shi C, Wu S, et al. A study on toxicity of aquaculture drugs to *Luminescent bacteria* [J]. Journal of Hygiene Research, 2008, 37(3): 291-293
- [12] 王献忠. 我国农药生产和使用现状及其展望[J]. 科技信息, 2011, 13: 777-816
WANG Xian-zhong. The current production and use of pesticide in our country [J]. Science and Technology Information, 2011, 13: 777-816
- [13] 张煜, 王小兵, 胡松学. 青海弧菌 Q67 冻干粉急性毒性测试方法研究[J]. 安徽农业科学, 2014, 15: 4746-4748
ZHANG Yu, WANG Xiao-bing, HU Song-xue. Study on the method of using *Vibrio Qinghaiensis* sp. Q67 Freeze-dried powder to detect acute toxicity [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2014, 15: 4746-4748
- [14] 任皓. 发光细菌法检测抗生素及砷敏感型发光细菌表达载体构建[D]. 郑州: 河南工业大学, 2011
REN Hao. The toxicities of 11 pesticides to freshwater luminescent bacterium *V. qinghaiensis* Q67 [D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2011
- [15] Menz J, M Schneider, K Kummerer. Toxicity testing with luminescent bacteria characterization of an automated method for the combined assessment of acute and chronic effects [J]. Chemosphere, 2013, 93(6): 990-996
- [16] Garcia A, Recillas S, Sanchez A, et al. The luminescent bacteria test to determine the acute toxicity of nanoparticle suspensions [J]. Methods. Mol. Biol., 2012, 926: 255-259

现代食品科技