

发光细菌检测四环素族抗生素体系的建立

朱金国 刘红霞

(湖南出入境检验检疫局,湖南 长沙 410007)

摘要:为建立快速检测四环素族抗生素残留的方法,采用大量接种快速培养方法,制备出适宜检测用的发光菌检测液,建立了发光细菌检测四环素族抗生素体系。结果表明,在该检测体系条件下,明亮发光杆菌与金霉素、土霉素和四环素的抑制效应作用呈良好的线性关系,菌液与抗生素的作用最佳体积配比为1:3,相互作用的适宜时间为60~80 min。该体系对四环素族抗生素的检测灵敏度可达0.006 25 μg/ml,比传统的杯碟法高5倍,具有快速、简便的特点,可作为食品中抗生素残留的一种快速、灵敏的筛选检测方法。

关键词:发光,细菌;四环素类;研究技术

System constructed to detect tetracyclines drug by luminescent bacteria

ZHU Jin-guo, LIU Hong-xia

(Hunan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Hunan Changsha 410007, China)

Abstract: Luminescent bacteria have been widely used to monitor water quality and assess the toxicity of substances, but hitherto no reports are available on its use in detecting the biological activity of antibiotics. A rapid cultivating method of massive inoculation was adopted to produce a type of luminescent bacteria suspension suitable for detecting tetracyclines in food samples and a testing system was established. Experiments indicated that the best volume ratio of the bacteria suspension to the tetracycline solution was 1:3 for their interactions, and the best interaction time was approximately 60~80 minutes. Under the system conditions, the inhibiting effects of oxytetracycline, chlortetracycline and tetracycline on the *Photobacterium phosphoreum* presented good linear relationship. The sensitivity of this system in detecting tetracyclines can reach 0.006 25 μg/ml, which is five times higher than that of the traditional cylinder plate method. The system can be used as a rapid and convenient screen method for detecting tetracycline residues in foods.

Key Words: Luminescence, bacterial; Tetracyclines; Investigative Techniques

- 2000, 48(11):5773-5780.
- [4] 李秀芳,刘兴阶,赵红,等.我国部分克山病区和非病区主粮中霉菌的污染调查[J].卫生研究,1996,25(3):157-159.
- [5] Groves F D, Zhang L, Chang Y S, et al. *Fusarium* mycotoxins in core and core products in a high-risk area for gastric cancer in Shandong Province. China[J]. J AOAC Int, 1999, 82(3):657-662.
- [6] Hennequin C, Abachin E, Symens F, et al. Identification of *Fusarium* species involved in human infection by 28S rRNA gene sequencing[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(11):3586-3589.
- [7] Hue F X, Huerre M, Rouffault M A, et al. Specific detection of *Fusarium* species in blood and tissues by a PCR technique[J]. J Clin. Microbiol, 1999, 37:2434-2438.
- [8] O'Donnell K, Cigelnik E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous[J]. Molec Phylogenetics Evol, 1997, 7:103-116.
- [9] O'Donnell K, Cigelnik E, Nirenberg H I. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex[J]. Mycologia, 1998, 90(3):465-493.
- [10] 王晓英,刘秀梅.串珠镰刀菌伏马菌素产毒株聚合酶链式反应检测方法的研究[J].卫生研究,2003,32(3):228-231.
- [收稿日期:2004-12-26]

中图分类号:R15;Q949.32;TS201.3 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2005)02-0145-06

作者简介:朱金国 男 高级工程师

近 20 年来,发光细菌 (luminescent bacteria) 在环境、水质的监测、物质毒性的检测以及临床医学等多项领域的应用日益广泛^[1~4],有的达到了实用检测的阶段,也确立了相关的发光细菌培养方法和检测体系^[5,6]。目前对水质和环境毒性的检测广泛采用 1979 年 Bulich 建立的用 2% NaCl 溶液复活冻干发光细菌体系,美国 Biobics 公司推出了发光细菌急性毒性测定法和生物毒性检测仪 (Microtox)^[7,8]。荷兰利用假单胞发光菌 (*Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525) 测定水质中的毒性效应,并建立了有关的方法标准 (Netherlands Standard: NEN 6509)。最近国际标准化组织发布了利用冻干的发光费氏弧菌 (*Vibrio fischeri*) 检测水质样品中抑制效应的生物测定方法 (ISO 11348-3:1998(E))^[9]。作者通过初步的试验发现,四环素族抗生素 (Tetracyclines, TCs) 对复活的冻干发光细菌的发光没有明显的抑制效应。而其它发光细菌的检测体系,大多由于培养时间过长,菌龄老化,对 TCs 的敏感性较差,不适合于低浓度的 TCs 检测。目前对 TCs 的生物测定方法为管碟法,其操作较繁杂,耗时长,检测灵敏度也受到一定的限制。我们在对发光细菌生物学及其发光特性研究的基础上,采用大量接种快速培养发光细菌的方法,使发光细菌在短的培养时间内达到良好的生理敏感状态和适宜的发光强度,同时针对食品中 TCs 残留量级检测的特点和要求,建立检测 TCs 的发光细菌检测体系,可在低于 1 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度范围内,达到快速、灵敏的检测 TCs 的目的。

1 材料和方法

1.1 菌种

明亮发光杆菌 (*Photobacterium phosphoreum*) T3 变种,由中国科学院南京土壤研究所提供。

1.2 试剂和材料

TCs 标准品 盐酸金霉素 (Chlortetracycline Hydrochloride CTC) 含量为 95.0%,土霉素 (Oxytetracycline OTC) 含量为 92.4%,盐酸四环素 (Tetracycline Hydrochloride TTC) 含量为 98.7%,均为化学对照品级,购自中国药品生物制品检定所。胰蛋白胨、酵母浸膏粉为英国 OXOID 公司产品,其它试剂均为分析纯试剂。

HITACHI MPF-4 型荧光分光光度计,日本 HITACHI 公司生产。

磷酸盐缓冲液 KH_2PO_4 1.0 g、 Na_2HPO_4 5.0 g、NaCl 30.0 g,加蒸馏水 1 000 ml 溶解,分装后 121 15 min 灭菌。

发光细菌培养基 胰蛋白胨 5.0 g、酵母浸膏

5.0 g、丙三醇 3.0 g、NaCl 30.0 g、 KH_2PO_4 1.0 g、 Na_2HPO_4 5.0 g、蒸馏水 1 000 ml、121 15 min 灭菌。

1.3 发光细菌培养方法

加 5 ml 磷酸盐缓冲液至 1 支明亮发光杆菌试管斜面中,将细菌冲洗下来,转接到 120 ml 发光细菌培养基中,(23 \pm 1) 磁力搅拌或振荡培养 5 h 左右至发光。

1.4 发光测定

将待测的发光测试液振荡混匀后取 3 ml 置于 5 ml 石英比色杯中,用荧光分光光度计进行发光测定,检测波长为 650 nm,并根据试样发光量的大小,适当调节荧光光度计的量程,控制测定环境温度为 20 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

2 结果与讨论

2.1 TCs 对发光细菌发光的抑制效应

用磷酸盐缓冲液分别将盐酸金霉素、土霉素、盐酸四环素标准品稀释成 6.25、12.5、25.0、50.0、100.0、250.0、500.0、1 000.0 ng/ml,用移液器准确吸取 5.0 ml 发光菌液加入到 15.0 ml 稀释好的各 TCs 标准溶液中,(23 \pm 1) 恒温孵育 60 min,测定其发光强度,结果见表 1。

表 1 TCs 对发光细菌的抑制效应

OTC 浓度/ng ml ⁻¹	0	6.25	12.5	25.0	50.0	100	250	500	1000
发光强度	108.9	104.7	102.0	97.9	97.0	90.7	87.0	81.6	77.0
TTC 浓度/ng ml ⁻¹	0	6.25	12.5	25.0	50.0	100	250	500	1000
发光强度	65.6	57.6	55.1	51.1	47.8	43.3	39.3	36.0	32.8
CTC 浓度/ng ml ⁻¹	0	6.25	12.5	25.0	50.0	100	250	500	1000
发光强度	108.4	97.0	94.4	88.3	84.1	79.2	74.1	71.8	69.5

取浓度的对数 (LnC) 为 x ,以发光强度为 y ,分别求出金霉素、土霉素、四环素对发光细菌抑制效应的相关线性方程。

土霉素的线性方程: $A = 115.88$ $B = -5.445$
相关系数 (r) = -0.9921

$$y = -5.445x + 115.88$$

四环素的线性方程: $A = 67.16$ $B = -5.017$
相关系数 (r) = -0.9989

$$y = -5.017x + 67.16$$

金霉素的线性方程: $A = 107.13$ $B = -5.711$
相关系数 (r) = -0.9926

$$y = -5.711x + 107.13$$

计算结果显示,金霉素、土霉素、四环素对发光细菌的抑制反应的相关系数绝对值均大于 0.99, $|r| > 0.01$ ($0.05 = 0.707$, $0.01 = 0.834$) 表明这 3 种抗生素的浓度与发光细菌的发光抑制呈极显著相关。在 0.006 25 $\mu\text{g/ml}$ ~ 1 $\mu\text{g/ml}$ 的范围内,发光抑制量与 TCs 的浓度呈良好的线性关系,说明可用发光细

菌来检测 TCs 的浓度。

2.2 发光细菌与 TCs 不同配比作用试验

用磷酸盐缓冲液将盐酸金霉素标准品稀释成 6.25、12.50、25.00、50.00、100.00、200.00、400.00、800.00 ng/ml,共稀释 6 个组,每份体积为 20 ml。同时将培养的发光细菌菌液用磷酸盐缓冲液稀释成 1

1、1 5、1 10、1 20、1 50 和原液 6 个浓度。再将各稀释浓度的发光菌液分别按顺序加到配制好的金霉素标准品系列浓度溶液中,每个浓度组每份加菌液量为 20 ml。控制好各组的加样顺序及间隔时间,(23 ±1) 放置培养 60 min 后,再分别进行发光测定。结果如表 2。

表 2 发光细菌与金霉素不同配比浓度对发光的影响

菌液浓度	发光测定								
	0	6.25	12.50	25.00	50.00	100.00	200.00	400.00	800.00
1/100	89.8	82.4	77.6	73.4	66.3	64.4	71.5	71.5	65.4
1/40	96.3	87.7	80.0	78.3	74.7	69.4	67.2	67.5	64.1
1/20	52.3	47.9	44.2	40.9	37.8	35.5	34.7	33.8	32.1
1/10	115.5	108.8	103.6	92.2	76.3	73.6	71.8	70.1	68.9
1/4	161.2	156.9	149.8	141.5	136.3	128.4	124.4	119.9	115.8
1/2	103.4	101.5	97.0	91.4	84.6	80.4	75.6	73.0	71.8

取浓度的对数 (LnC) 为 x ,以发光强度为 y ,分别求出金霉素对不同菌液浓度的发光菌液发光抑制的相关线性方程,结果见表 3。

表 3 金霉素与菌液配比浓度的线性回归分析

菌液浓度	A	B	相关系数(r)
1/100	83.05	- 2.70	- 0.7319
1/40	94.36	- 4.97	- 0.9740
1/20	51.78	- 3.52	- 0.9690
1/10	120.52	- 8.77	- 0.9291
1/4	170.43	- 8.53	- 0.9925
1/2	112.17	- 6.52	- 0.9857

$|r| > 0.01$ ($\alpha_{0.05} = 0.707, \alpha_{0.01} = 0.834$)

从表 2 和表 3 的结果可以看出:加入菌量过少(菌液浓度 1/100、1/40),在 100 ~ 200 ng/ml 浓度范围,金霉素对发光细菌的发光表现有轻微刺激发光作用,其相关性也较差一些;从 B 值来看,菌液浓度以 1/4 和 1/10 斜率最大,对发光的抑制效果较好。菌液浓度为 1/4 即菌液与抗生素液的作用体积配比以 1 3 为最好。

2.3 金霉素与发光细菌不同作用时间对发光的影响

用磷酸盐缓冲液将盐酸金霉素标准品稀释成 6.25、12.50、25.00、50.00、100.00、200.00、400.00、800.00 ng/ml,每份标准品稀释液体积为 15 ml,取培养 5.5 h 至发光良好的发光细菌菌液,每 15.0 ml 金霉素稀释液中加 5.0 ml 菌液,(23 ±1) 恒温条件下静置培养,分别培养 40、50、60、80、100、120 min,到作用时间后立即按顺序取样进行发光测定(表 4)。

取浓度的对数 (LnC) 为 x ,以测定的发光强度为 y ,分别求出不同作用时间金霉素对发光细菌抑制效应的相关线性方程,结果如表 5。

表 4 金霉素与发光细菌不同作用时间对发光的影响

作用时间 (min)	金霉素标准品系列浓度 ng/ml								
	0	6.25	12.50	25	50	100	200	400	800
40	98.3	94.6	88.3	82.6	80.9	82.7	78.0	79.2	75.2
50	87.7	84.2	81.8	76.6	75.7	74.0	69.9	70.4	68.3
60	83.9	81.7	80.0	74.9	73.3	71.6	68.0	67.6	65.4
80	85.5	82.9	80.3	74.5	71.6	67.5	62.8	60.0	57.8
100	93.4	84.4	80.3	74.8	71.1	64.2	57.4	53.6	52.5
120	97.2	84.1	80.4	75.0	70.1	61.4	53.1	49.4	48.5

表 5 不同作用时间的相关线性方程

作用时间(min)	A	B	r
40	96.83	- 3.32	- 0.9130
50	89.02	- 3.26	- 0.9737
60	87.33	- 3.41	- 0.9845
80	92.82	- 5.43	- 0.9954
100	97.71	- 7.14	- 0.9919
120	100.26	- 8.22	- 0.98768

$|r| > 0.01$ ($\alpha_{0.05} = 0.707, \alpha_{0.01} = 0.834$)

结果表明,随着作用时间的增加,斜率增大,说明金霉素对发光细菌发光抑制效应随时间增长加强,在 40、50 min,由于作用时间较短,对发光细菌的抑制效应还没有充分体现,相关性较差一些,在 400 ng/ml 这个浓度点,还对细菌发光有刺激增强效应,随着时间的增长,刺激效应消失。从 60 min 开始, $|r| > 0.98$,线性较好。比较来看,金霉素与发光细菌作用时间以 60 ~ 80 min 较为适合。

3 讨论

以上试验结果可以说明,金霉素、土霉素、四环素在 0.006 25 ~ 1 $\mu\text{g/ml}$ 范围内对所确立的发光细菌检测体系的发光有明显的抑制效应。而且随着这 3 种抗生素浓度的增加,对细菌发光的抑制效应也逐渐增强。3 种四环素族抗生素的浓度对数与其对发光细菌的发光抑制效应呈良好的线性关系,其相关系数 $|r| > 0.99$,由此可建立相关的线性方程和检

测体系。

大量接种快速培养的明亮发光杆菌,菌龄短,细菌生理状态较为一致,对 TCs 有良好的敏感效应,适合 TCs 的检测。发光细菌与 TCs 的不同浓度作用配比和不同作用时间对发光的抑制反应有影响,在反应测试体系中,发光菌液与抗生素的体积配比以1:3为好。作用时间为 60~80 min,增加作用时间可使 TCs 对明亮发光细菌的抑制效应更为显著。包括菌液培养时间在内全部检测时间约为 6~7 h,只有杯碟法时间的 1/3。

目前常规的 TCs 和抗生素的生物测定方法大多采用杯碟法或其它扩散法,其原理是利用抗生素在摊布敏感菌的琼脂或纤维纸上的扩散来形成一定抗生素浓度梯度的扩散区,抗生素扩散到一定的半径距离形成的浓度成为该试验菌的最小抑制浓度时,即形成有边缘效应的抑菌圈。其扩散半径(r)的平方值与抗生素浓度 M 的对数呈直线关系^[10]。在本检测体系中,抗生素对发光细菌的抑制灵敏效应表现在单个细菌处于均散的初始抗生素浓度之中,而扩散法表现在抗生素浓度以扩散递减到最小抑制浓度对靶细菌的抑制生长,因而发光细菌方法的检测灵敏度要高于杯碟法和其它扩散法。另一个方面,细菌以单个形式在液体中培养生长时,与在固体表面形成的菌落生长时的生理状态不相同,这也可能影响到对抗生素的敏感性。实验结果证实,发光细菌检测体系对 TCs 的检测灵敏度可达 0.006 25 $\mu\text{g/ml}$,明显高于杯碟法 0.025~0.5 $\mu\text{g/ml}$ 的水平。扩散速率是琼脂扩散法的一个重要因素,抑菌圈的直径不仅与抗生素的活性有关,也与其在琼脂平板中的扩散速率有关^[10]。采用杯碟法测定抗生素的敏感性时,对所有的参数,即培养基的组成、营养成分的质量、琼脂的厚度及浓度要进行严格的标准化,更重要的是培养皿上的接种菌的密度必须严格标准化^[10]。相对而言,发光细菌检测体系易于控制各种参数,在使用上更为简便快速。

由于近些年来人们对食品安全的日益关注,国内外对食品中兽药残留的要求越来越严^[11],对于食品中抗生素的检测方法的灵敏度也提出了更进一步的要求。本文所建立的检测体系在食品和其它物质中残留级的四环素族抗生素的筛选检测具有重要意义。

参考文献

- [1] 吴自荣,王生清,朱慈辉,等. 利用发光细菌快速测定农药的研究[M]. 华东师范大学学报,1986,(4):96-100.
- [2] 赵元慧,王连生. 取代芳烃对发光菌的毒性及定量结构与活性相关[J]. 环境科学学报,1993,13(4):442-449.
- [3] 朱文杰,刘超亭. 利用海洋发光细菌快速测定生物医用材料的毒性[J]. 华东师范大学学报,1989,(4):90-94.
- [4] 周召银,苏嫦. 硒和砷对发光细菌 T3 变种的作用——生物体中的硒砷相互作用[J]. 生物化学与生物物理进展,1987,6,35-37.
- [5] Gabriel Bitton, Bernard J. Dukla. Toxicity Testing Using Microorganisms[Z]. CRC press, Inc, Florida, USA.
- [6] Steinberg S M, Pzozimek E J, Engelmann W H. A review environmental applications of bioluminescence measurements [J]. Chemosphere, 1995,30(11):2155-2197.
- [7] Bulich A A. A practical and reliable method for monitoring the toxicity of aquatic sample [J]. Process biochemistry, 1982, 17(2):45-47.
- [8] Bulich A A, Isenberg D L. Use of the luminescent bacteria system for the rapid assessment of aquatic toxicity[J]. ISA Transactions, 1981,20(1):29-33.
- [9] ISO 1998E. 11348—3. Water quality-determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) — Part 3:Method using freeze-dried bacteria[S].
- [10] 张治锁. 抗生素药品检验[M]. 北京:人民卫生出版社,1987.
- [11] 庄无忌. 各国食品和饲料中农药兽药残留限量大全[M]. 北京:中国对外经济贸易出版社,1995.

[收稿日期:2004-12-22]

中图分类号:R15;Q-331;TQ450.26 文献标识码:A

文章编号:1004-8456(2005)02-0150-04