

发光细菌毒性检测机理及应用研究进展

Research progress of the detection mechanism of luminescent bacterial toxicity and its application

胡欣颖¹ 贺稚非¹ 李洪军²

HU Xin-ying¹ HE Zhi-fei¹ LI Hong-jun²

(1. 西南大学食品科学学院, 重庆 400715; 2. 重庆市特色食品工程技术研究中心, 重庆 400715)

(1. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Chongqing Engineering Research Center of Regional Food, Chongqing 400715, China)

摘要:阐述了发光细菌及其检测有毒有害物质的机理,综述了近年来发光细菌在毒性评估及食品安全检测中的应用研究进展,指出了发光细菌应用于食品安全检测过程中的影响因素,并指明了该技术领域应用研究方向。

关键词:发光细菌;检测机理;毒性评估;食品安全检测

Abstract: The paper describes the luminescent bacteria and the mechanism of detecting toxic and harmful substances. This paper reviews the recent advances in the application of luminescent bacteria in toxicity assessment and food safety testing. What's more, the factors influencing the application of luminescent bacteria in food safety testing are pointed out, and the paper indicates the application research direction in this technical field.

Keywords: luminescent bacteria; detection mechanism; toxicity assessment; food safety testing

随着食品行业的发展,食品分析技术的作用日趋重要。应用化学分析方法,如原子吸收光谱法(atomic absorption spectroscopy, AAS)、气相色谱法(gas chromatography, GC)、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)以及各种联用方法如气质联用(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)等,检测食品中有毒有害物质,但前处理过程繁杂、需要专业操作人员、分析步骤繁琐、设备昂贵^[1-2],并且受限于实验室使用,无法在食品生产与流通过程中实现有毒有害物质的实时检测。最主要的是这些技术虽然能检测化合物浓度,但不能反映有关样品的毒性^[3]。

基金项目:国家重点研发计划资助(编号:2016YFD0401503);重庆市特色食品工程技术研究中心能力提升项目(编号:cstc2014pt-gc8001)

作者简介:胡欣颖,女,西南大学在读硕士研究生。

通信作者:贺稚非(1960—),女,西南大学教授,博士。

E-mail:2628576386@qq.com

收稿日期:2018-03-17

生物学检测方法不仅可以估计样本毒性,还可以估计毒物对整个生态系统的综合影响^[4]。经典生物测定通常使用小鼠、鱼类、藻类、甲壳类动物、植物或其他生物体^[5],但也存在缺点:需要特殊设备和专业操作人员,测定时间长、重现性低以及存在生物标准化争议^[5-7]。因此寻找一种简单、快速且便宜的生物检测方法成为迫切的需求。

发光细菌是一类在正常代谢过程会发光的生物。自1969年 Kossler 阐述了基于生物发光细菌的生物测定法后^[8],发光细菌逐渐被用于各种环境污染监测和食品单一及综合毒性评价。同时构建了以发光细菌发光强度变化为指标的有害物质检测标准,相关的检测试剂盒也陆续研制成功^[9]。相较于化学检测,发光细菌检测具有前处理简单,反应快、灵敏度高、可实时监测,成本低、样品需求量少、实验室及耗材需求低等优点^[10-11],将成为食品安全检测新的发展方向,目前中国关于发光细菌检测的研究相对较少,缺乏对发光细菌在毒性评估和食品有毒有害物质检测方面的系统性分析和总结。

基于此,本文综述发光细菌在毒性评估及食品安全检测中的应用,对发光细菌检测存在的问题及未来的发展方向进行分析和总结,以期对发光细菌在食品有毒有害物质检测中的应用和新型检测仪器的开发提供理论依据。

1 发光细菌检测有毒有害物质的机理

1.1 发光细菌简介

生物发光是一种常见的现象,绝大多数生物发光有机体生活在海洋中,只有少数生活在陆地或淡水环境中。发光细菌是一类能够在正常代谢过程中发出蓝绿色光的生物,全部是革兰氏阴性菌,其大多为直杆菌,也有少数呈弧状或球杆状,有鞭毛。发光细菌个体微小,长度约为 1.5~3.0 μm,宽度约为 0.5~0.8 μm,释放的蓝绿色荧光波长范围为 450~490 nm^[12]。单个发光细菌发出的光极其微弱,肉眼几乎不

可见,但当大量发光细菌聚集在一起时,发出的光则肉眼可见。

发光细菌属于变形菌门、 γ 变形菌纲。发光细菌可分为 4 个属:光杆菌属 (*Phototrhabdus*)、发光杆菌属 (*Photobacterium*)、希瓦氏菌属 (*Shewanella*) 和弧菌属 (*Vibrio*)^[12-13]。光杆菌属的典型菌有陆地发光杆菌 (*P. luminescens*)、温和光杆菌 (*P. temperate*) 等,发光杆菌属的典型菌有明亮发光杆菌 (*P. phosphoreum*)、鲑鱼发光杆菌 (*P. leiognathi*)、夹孢发光杆菌 (*P. angustum*) 等,希瓦氏菌属的典型菌有羽田希瓦氏菌 (*S. hanedai*) 等,弧菌属的典型菌有哈维氏弧菌 (*V. harveyi*)、费氏弧菌 (*V. fischeri*)、青海弧菌 (*V. qinghaiensis*)、霍乱弧菌 (*V. cholerae*) 等。

1.2 发光细菌检测机理

发光细菌中分子氧以还原态的黄素单核苷酸 (FMNH_2) 及长链脂肪醛 (RCHO) 为底物,经胞内细菌荧光酶催化作用,将二者分别氧化为黄素核苷酸 (FMN) 和长链脂肪酸,同时伴随着波长为 450~490 nm 蓝绿光的释放,可以通过生物发光计检测。

在发光细菌中广泛存在表达荧光素基因 (*lux*)。*lux* 基因主要包括 *luxC*、*luxD*、*luxA*、*luxB*、*luxE* 5 个部分,其中 *luxA*、*luxB* 编码荧光素酶^[14],该酶是一种分子量为 80 kDa 的异二聚体蛋白,包括 α (40~42 kDa) 和 β (36~37.5 kDa) 2 个亚基^[15],在其发光过程对 FMNH_2 具有高度的特异性。*luxC*、*luxD*、*luxE* 分别编码酰基蛋白还原酶 (R , 54 kDa)、酰基转移酶 (t , 33 kDa) 和依赖 ATP 的合成酶 (S , 42 kDa),这 3 种酶能够组成脂肪酸还原酶复合体催化醛类(该反应中参与发光的醛可能是十四醛)生成,使细菌持续发光^[16]。海洋发光细菌,如明亮发光杆菌 (*P. phosphoreum*)、鲑鱼发光杆菌 (*P. leiognathi*)、哈维氏菌 (*V. harveyi*)、费氏弧菌 (*V. fischeri*) 等,在 *luxE* 之后还有一个额外的基因 *luxG*,有研究者^[17] 推测 *luxG* 基因产物是为荧光素酶反应提供 FMNH_2 底物的黄素还原酶。发光细菌生物发光机理见图 1^[9]。

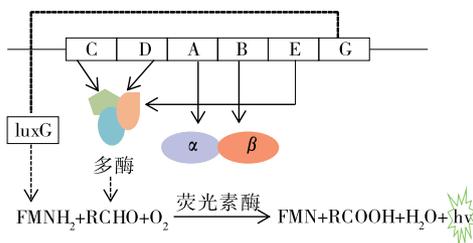


图 1 发光细菌生物发光机理

Figure 1 Luminescent bacteria bioluminescence mechanism

发光细菌检测机理分为特异性检测和非特异性检测,特异性发光细菌检测是根据受体-报告基因的原理(“lights on”模式)^[18],在 *lux* 上游导入特殊应激启动子,当宿主细胞的生长环境中存在有毒物存在时,毒物进入到宿主细胞,诱导特异性调控元件,进而调控下游基因表达,发出光源。非特异性检测利用的原理是发光细菌“lights off”模式^[19-20],即外来毒物通过直接抑制发光细菌酶的活性以及抑制细胞内有关

发光反应的生理代谢对发光细菌形成发光抑制作用,见图 2^[19]。在“lights on”测定中,可定量的报道分子与已知的被检测目标毒物活化的特定基因启动子融合,改变发光强度。在“lights off”测定中,样品毒性根据正常细胞活性的抑制程度估算,这种抑制可以发生在反应的任何阶段或影响细胞生长发育的任何位点。生物发光广泛依赖于细胞代谢,需要高能辅因子,因此,当接触到外界有毒有害物质时,发光细菌新陈代谢受到影响,进而使发光强度减小^[21-22]。

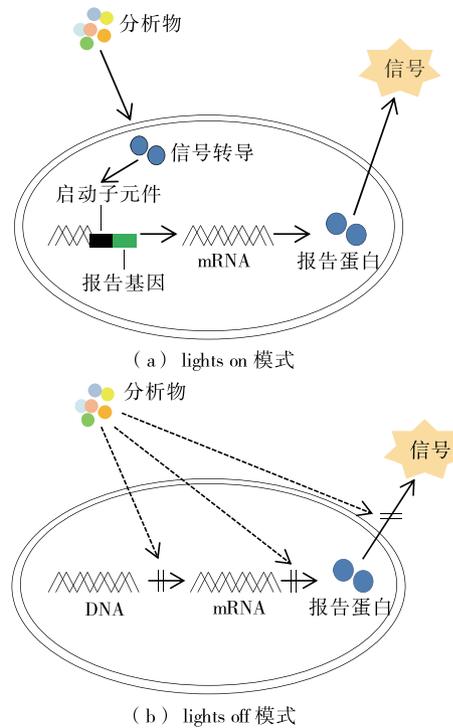


图 2 发光细菌检测有害物质原理

Figure 2 The principle of detecting harmful substances by luminescent bacteria

2 发光细菌在毒性评估中的研究现状

2.1 利用发光细菌检测与传统急性毒性检测方法对比

生物毒性是指外源性物质与机体接触或进入机体后对机体产生的损伤,有急性毒性和慢性毒性 2 种。在应用发光细菌对毒物进行生物毒性评价时,发光细菌因在毒物中暴露时间较短,通常被认为是一种急性毒性评估。急性毒性的测试是毒理学安全性评价的基础性试验,是制订卫生管理标准不可或缺的依据^[23]。随着急性毒性评价方法的不断发展,当前中国的急性毒性试验主要采用传统方法(GB 15193. 3—2003)^[24]。但由于使用动物数量较大且 LD_{50} 的测试受动物及实验室环境的影响,在“3Rs”原则,即减少(reduction)、优化(refinement)、替代(replacement)^[25]下,衍生出了固定剂量法(fixed dose procedure, FDP)、急性毒性分类法(acute toxic class method, ATC)、上下法(up-and-down procedure, UDP)等方法,旨在采取其他措施来减少试验中动物的痛苦,这 3 种方法是目前常用的方法。其与利用发光细菌检测相比优缺点见表 1^[10, 21, 26-27]。

表 1 急性毒性评估中传统方法和发光细菌检测方法的优缺点

Table 1 Advantages and disadvantages of traditional methods and luminescent bacteria detection methods in acute toxicity assessment

检测方法	优点	缺点
固定剂量法	使用动物数量少;毒性分级一致率达到 87.2%;能为危险度评价提供较为足够的急性毒性试验资料	在以死亡作为试验终点的国家中推广受制约,不同实验室对试验终点的判断差异可能导致严重的偏差
急性毒性分类法	减少动物使用量约 70%;重复性好	以动物死亡作为试验终点;无法精确地提出毒物毒性剂量,不适用于痕量毒物分析
上下法	使用动物数量少,仅为 5~10 只;能够得到 LD_{50} 的估计值及相应的置信区间;能够观察毒性表现;所需受试物少;实用性好,能够应用计算机程序进行数据分析	以动物死亡作为观察终点;耗时长;无法提供剂量-效应数据;无法估计 48 h 以外才出现毒性症状的受试物毒性
发光细菌检测	不需要使用动物进行试验;前处理简单;反应时间短;灵敏度高;可实时监测;成本低;样品需求量少;实验室及耗材需求低	活细胞是复杂的系统,具有不确定性;通过减少或增加发光强度来对有毒物质作出反应,得到的结果是模糊的

2.2 发光细菌在毒性评估中的应用

细菌发光在毒理学中的应用从发光细菌应用于生态监测开始,目前仍被广泛地应用,关于发光菌在毒性评估中的研究与应用主要集中在环境科学的各个领域^[28-29]。在食品行业,可见报道主要集中在发光细菌用于食品添加剂、农药和兽药的毒性评价。Cai 等^[30]研究了 5 种典型的农药(乐果、马拉硫磷、阿特拉津、灭草灵、乙草胺)对发光细菌的毒性作用及其作用机制。石颖等^[31]分别用 8 种兽药作用于青海弧菌 Q67,发现 Q67 的相对发光率与兽药浓度呈反比,并总结了 8 种兽药的抑制效率。

这些研究多集中在对单一物质的毒性评价,但在实际的检测应用中,食品成分具有复杂性,化学混合物的毒性具有联合作用,如拮抗作用、协同作用或加和效应等,发光细菌会受多种有毒物质的影响。因此,研究混合毒物对发光细菌的毒性作用具有重要的意义。基于此,吴淑杭^[32]以青海弧菌、费氏弧菌和明亮发光杆菌 T_5 为受试对象,研究重金属、农药和兽药等农产品污染物的单一毒性和联合毒性,揭示多种污染物共存时产生的毒性联合作用与综合生物毒性,并建立专用数学模型。

在联合毒性的研究中,选择合适的联合毒性评价模型进行毒性评价非常重要,常用的联合毒性评价方法有指数法、浓度加和与独立作用模型(CA/IA)法以及定量结构-活性关系模型(QSAR 模型)预测法^[33-34]。3 种毒性评价方法各有优劣,在应用过程中应根据实际情况进行选择。目前关于这些模型在发光细菌中的应用也有诸多报道,张瑾等^[35]以青海弧菌 Q67 为受试微生物,测定 6 种吡啶类离子溶液组成的 4 组二元混合物和 2 组三元混合物的联合毒性,用浓度加和模型进行分析,结果表明:除了有一组主要是拮抗作用外,其他组都是加和作用。董玉瑛等^[36]测定了 3 种医药成分:阿奇霉素、盐酸环丙沙星和阿司匹林组成的混合体系对发光细菌的联合毒性,应用多种方法进行评价,得出的结果具有一致性,说明这些评价方法在联合毒性中具有可行性。

3 发光细菌在食品安全检测中的应用

3.1 发光细菌应用现状

表 2 显示了国内外学者利用发光细菌在部分食品安全检测中的应用。由表 2 可知,目前国内外的研究重点主要集中在以天然发光细菌为代表的非特异性发光细菌的应用上。在食品原料选择上,以农畜产品居多,比如蔬菜、肉类、奶类,很少涉及其他食品种类。而且在农畜产品中以畜产品为原料的研究最多,在检测毒物种类上,主要集中在对农兽药,尤其是对兽药进行检测,而对食品添加剂、食品中的生物毒素以及其他有毒有害物质的检测较少,并且在兽药检测中,很少涉及一些激素类兽药如糖皮质激素等的检测研究。

在发光细菌的选择方面,以青海弧菌为代表的淡水发光细菌逐渐成为研究的热门。因为与海洋发光细菌相比,青海弧菌在检测时不需要保证 2%~3% 的氯化钠浓度,避免了 NaCl 对样品特性的干扰。

在特异性发光细菌研究应用方面,目前在食品科学领域的研究报道较少,大多集中在四环素类抗生素以及少量关于 β -内酰胺类药物的研究上。尽管特异性工程细菌在食品科学领域的研究应用刚刚起步,但其在环境科学中已有深入研究,已经建立了对多种重金属能够特异性检测的工程菌^[46]。这些研究可以为发光细菌在食品安全检测中的应用提供借鉴。

3.2 检测效果的影响因素

发光细菌是一种生物检测技术,发光细菌本身具有不确定性,且样品的组成具有复杂性。因此在实际检测过程中,检测效果会受到多种因素的影响,如原料前处理、毒物兴奋效应、样品刺激作用等。

3.2.1 原料前处理 在食品安全检测中,样品前处理占据整个样品分析的大部分时间,并且检测结果的重复性、准确性以及方法的灵敏度都与样品前处理过程密切相关。理想的原料预处理方法,不仅能获得待检测物质,还能够减少对发光细菌检测的干扰。目前,在样品前处理中常用的方法有溶

表2 国内外学者在食品安全检测中应用发光细菌的部分研究
Table 2 The application of luminescent bacteria in food safety detection

食物种类	毒物	发光细菌	参考文献
热带水果	真菌毒素、霉菌毒素	青海弧菌 sp.Q67	[9]
蔬菜	甲胺磷	未具体说明	[37]
褐牙鲈	氯霉素	鮟发光杆菌	[38]
液体奶	三聚氰胺	费氏弧菌	[39]
鱼肉	土霉素	工程菌 <i>E. coli</i> K12	[40]
禽肉	多西环素	工程菌 <i>E. coli</i> K12	[41]
猪肉	恩诺沙星、磺胺间甲氧嘧啶	青海弧菌、明亮发光杆菌 T3	[42]
鱼肌肉、牛、鸡、猪的肌肉、 肝脏和肾脏	二氟沙星、恩氟沙星、环丙沙星、沙拉沙星、诺氟沙星、丹诺沙星、氧氟沙星、氟沙星、洛美沙星、马氟沙星和托吡沙星	含有质粒 pRecAlux3 的大肠杆菌 pK12	[43]
大米	重金属:铅、镉、汞	明亮发光杆菌	[44]
水产品	抗生素、重金属、甲醛、生物毒素	弧菌属、发光杆菌属、希瓦氏菌属、光杆菌属	[45]

剂萃取法和离心法。在国内外的一些研究中,都是将原料绞碎、离心,然后取上清液备用^[41,47-48],但这些方法均存在提取不彻底的缺点,这使发光细菌检测技术不能准确地反映被检样品的毒性。并且在用有机溶剂萃取时,有机溶剂也可能会对发光细菌发光强度造成影响。因此,Pellinen等^[40]在检测鱼肉中四环素时,对处理鱼肉样品的方法进行了优化,在均质之后不进行离心,也不使用有机溶剂,优化后的方案可使四环素的检出限更低。

在利用发光细菌进行快速检测时,无色或颜色较浅的液体样品比较容易测试,而固体样品则必须经过前期处理才能进行检测。在固体样品的预处理方面,一些适用于其他生物检测的预处理方法如固相萃取^[49]等,也适用于发光细菌检测。

3.2.2 毒物兴奋效应 毒物兴奋效应(Hormesis)是一种生物体的适应性反应,它是指在致毒因素不同的剂量强度范围,生物体具有不同的剂量-反应关系^[50]。Hormesis通常被认为是毒物对生物体在高剂量时表现负面影响(如生长发育受到抑制),但在低剂量时却表现为有益作用(如刺激生长发育)^[51],其主要应用于遗传毒性致癌物健康风险评估与毒物生态风险评估上。大多数农、兽药都显示出毒物兴奋效应,Calabrese等^[51]指出青霉素、链霉素、土霉素、氯霉素、硫磺杆菌素、抗金葡美芬、磺胺、杆菌肽、吡啶硫胺素等药物在低剂量下能够刺激生物体生长;Morse^[52]认为需要考虑农药的Hormesis,从而完整了解农药的潜在影响。

在发光细菌毒性评估中,也会出现毒物兴奋效应。汤森等^[53]以费氏弧菌作为受试生物,盐酸四环素作为研究对象,证明了在细菌生长的延滞期和平台期,盐酸四环素对费氏弧菌的发光强度存在时间依赖型毒物兴奋效应。Shen等^[54]通过建立剂量-效应曲线和时间-效应曲线研究了Cu、Zn、Cd、Cr对青海弧菌的影响,并发现4种金属对青海弧菌具有明显的毒物兴奋效应。

3.2.3 样品刺激作用 在利用发光细菌进行毒性评估和食品安全检测时,样品中的某些非研究对象也会引起发光细菌

发光强度的变化。已有的研究表明,低剂量的 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Na^+ 等无机离子均对天然发光细菌产生刺激作用^[53],并且这种刺激作用在淡水重组菌中并未出现减弱现象^[55]。

样品的刺激作用具有两面性,在海洋发光细菌利用过程中,需要2%~3%的NaCl溶液来模仿海洋环境,并用其处理样品,溶液中的KCl、NaCl等无机物会对发光细菌产生刺激作用,在毒性测试中使发光细菌保持最大发光强度。但是这种盐溶液有可能会改变样品性质,如降低金属的生物利用率和有机物的溶解性^[56],这都会使检测误差偏大。

4 结论与展望

发光细菌繁殖速度快,易于培养和观察,这为其在检测中的应用提供了一个广阔的发展空间。发光细菌检测方便快捷且成本低,虽然在环境科学领域已经取得长足的发展,但在食品科学领域,尤其是在食品安全检测中的研究与应用起步较晚,其前期研究主要停留在整体水平以及细胞水平,目前正向基因水平和分子水平的方向纵深发展。因此,在食品领域,对发光细菌展望如下:

(1) 发光细菌在食品安全检测中的应用研究范围需要扩大,不应仅仅停留在农畜产品检测方面,应拓宽至其他深加工食品中;并且被检测物质应包含农药残留、兽药残留、食品添加剂以及生物毒素等有毒有害物质,全方位地确保食品安全。

(2) 在诸多限制发光细菌检测发展的因素中,原料前处理方式、毒物兴奋效应以及样品自身的刺激作用是制约该方法发展的主要因素,应寻求合理的解决方式减少这些影响。

(3) 在特异性发光细菌研究方面,应积极借鉴其他领域的成功经验,构建出在食品有毒有害物质检测中能实现特异性检测的发光细菌。

(4) 在热门发光细菌青海弧菌的研究方面,应对发光机理及毒物兴奋效应进行系统研究,从而为其在食品安全检测中的应用提供理论依据。

(5) 制定关于发光细菌在食品行业使用的统一标准,现在可作为参考的只有GB/T 15441—1995,发光细菌的研究

取得了很大进展,如发光细菌冻干粉、发光细菌固体培养试剂盒以及发光细菌毒性检测仪的商业化。因此,急需完善相关的标准政策,以推动该产业的健康快速发展。

参考文献

- [1] GOMES J O, BORGES N W, MACHADO A E, et al. Optimization of fipronil degradation by heterogeneous photocatalysis: Identification of transformation products and toxicity assessment[J]. *Water Research*, 2017, 110: 133-140.
- [2] LE T X H, NGUYEN T V, YACOUBA Z A, et al. Correlation between degradation pathway and toxicity of acetaminophen and its by-products by using the electro-Fenton process in aqueous media[J]. *Chemosphere*, 2017, 172: 1-9.
- [3] JIA K, IONESCU R E. Measurement of bacterial bioluminescence intensity and spectrum: current physical techniques and principles[J]. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2016, 154: 19-45.
- [4] CHEN Season S, SUN Yu-qing, TSANG D C W, et al. Potential impact of flowback water from hydraulic fracturing on agricultural soil quality: Metal/metalloid bioaccessibility, Microtox bioassay, and enzyme activities[J]. *Science of the Total Environment*, 2016, 579: 1 419-1 426.
- [5] KUDRYASHEVA N S, TARASOVA A S. Pollutant toxicity and detoxification by humic substances: mechanisms and quantitative assessment via luminescent biomonitoring[J]. *Environmental Science & Pollution Research International*, 2015, 22 (1): 155-167.
- [6] KUZNETSOV A M, RODICHEVA E K, MEDVEDEVA S E, et al. Bioluminescent bioassays based on luminous bacteria marker system[C]// *Bioluminescence and Chemiluminescence-Progress and Current Applications*, International Symposium on Bioluminescence. [S.l.]: Journal of Siberian Federal University, 2017: 323-326.
- [7] ABBAS M, ADIL M, EHTISHAM-UL-HAQUE S, et al. *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 626: 1 295-1 309.
- [8] GRABERT E, KOSSLER F. About the effects of nutrients on the luminescent bacteria test[J]. *Journal of Bioluminescence & Chemiluminescence*, 1997: 291-294.
- [9] JIAN Qi-jie, GONG Liang, LI Tao-tao, et al. Rapid assessment of the toxicity of fungal compounds using luminescent *vibrio qinghaiensis* sp. Q67[J]. *Toxins*, 2017, 9(10): 335-347.
- [10] BOLELLI L, FERRI E N, GIROTTI S. The management and exploitation of naturally light-emitting bacteria as a flexible analytical tool: A tutorial[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2016, 934: 22-35.
- [11] PIVATO A, GASPARI L. Acute toxicity test of leachates from traditional and sustainable landfills using luminescent bacteria[J]. *Waste Management*, 2006, 26(10): 1 148-1 155.
- [12] 朱文杰. 发光细菌与环境毒性检测[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2009: 25-37.
- [13] LEON M B, ALBRECHT J A. Comparison of adenosine triphosphate (ATP) bioluminescence and aerobic plate counts (APC) on plastic cutting boards[J]. *Journal of Foodservice*, 2007, 18(4): 145-152.
- [14] BERGNER T, TABIB C R, WINKLER A, et al. Structural and biochemical properties of LuxF from *Photobacterium leiognathi*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2015, 1 854(10): 1 466-1 475.
- [15] SHARIFIAN S, HOMAEI A, HEMMATI R, et al. Light emission miracle in the sea and preeminent applications of bioluminescence in recent new biotechnology[J]. *Journal of Photochemistry & Photobiology B Biology*, 2017, 172: 115-128.
- [16] MARTINI S, ALI B A, GAREL M, et al. Effects of hydrostatic pressure on growth and luminescence of a moderately-piezophilic luminous bacteria *photobacterium phosphoreum* ANT-2200[J]. *Plos One*, 2013, 8(6): e66 580.
- [17] NIJVIPAKUL S, WONGRATANA J, SUADEE C, et al. LuxG is a functioning flavin reductase for bacterial luminescence[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(5): 1 531-1 538.
- [18] LEWIS J C, FELTUS A, ENSOR C M, et al. Peer reviewed: applications of reporter genes[J]. *Anal Chemi*, 2011, 70(17): 579-585.
- [19] BELKIN S. Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2003, 6(3): 206-212.
- [20] THOMULKA K W, MCGEE D J, LANGE J H. Use of the bioluminescent bacterium *Photobacterium phosphoreum*, to detect potentially biohazardous materials in water[J]. *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology*, 1993, 51(4): 538-544.
- [21] KRATASYUK V A, ESIMBEKOVA E N. Applications of luminous bacteria enzymes in toxicology [J]. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 2015, 18 (10): 952-959.
- [22] FERNÁNDEZPIÑAS F, RODEAPALOMARES I, LEGANÉS F, et al. Evaluation of the ecotoxicity of pollutants with bioluminescent microorganisms[J]. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2014, 145: 65-135.
- [23] 袁媛, 邱霞. 急性毒性试验研究进展[J]. *海军医学杂志*, 2013, 34(5): 360-360.
- [24] 谭剑斌. 体内外替代方法在急性毒性评价中的研究进展[J]. *毒理学杂志*, 2010, 24(6): 479-482.
- [25] RIEBELING C, LUCH A, TRALAU T. Skin toxicology and 3Rs-current challenges for public health protection[J]. *Experimental Dermatology*, 2018, 27(5): 526-536.
- [26] SEWELL F, RAGAN I, MARCZYLO T, et al. A global initiative to refine acute inhalation studies through the use of 'evident toxicity' as an endpoint: Towards adoption of the fixed concentration procedure [J]. *Regulatory Toxicology & Pharmacology Rtp*, 2015, 73(3): 770-779.
- [27] DIENER W. Biometric evaluation of the ATC method for the determination of the acute dermal toxicity of chemicals[J]. *Biometrical Journal*, 2015, 40(8): 979-991.
- [28] PRICE R L, MURPHY M J, SQUIRRELL D J, et al. Rapid detection of food-borne bacteria using bacteriophage and ak bioluminescence[C]// *Bioluminescence and Chemiluminescence*,

- International Symposium. [S.L.]: Bioluminescence and Chemiluminescence, 2014: 301-304.
- [29] CHEN Wen-yan, CAI Qiang, ZHAO Yuan, et al. Toxicity evaluation of pig slurry using luminescent bacteria and zebrafish[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2014, 11(7): 6 856-6 870.
- [30] CAI Yu-hang, LI Juan, ZHAO Wen-jin, et al. Single toxicity and QSAR-assistant toxic mechanisms of pesticides (dimethoate, malathion, atrazine, prometryn and acetochlor) to photobacterium phosphoreum in the sediment lixivium[J]. Asian Journal of Chemistry, 2015, 27(2): 569-574.
- [31] 石颖, 丁武, 张志超, 等. 应用青海弧菌评价常见 8 种兽药的安全性毒性[J]. 西北农业学报, 2012, 21(6): 17-21.
- [32] 吴淑杭. 发光细菌法快速检测农产品中主要污染物联合毒性技术研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2007: 8-10.
- [33] NEALE P A, LEUSCH F D, ESCHER B I. Applying mixture toxicity modelling to predict bacterial bioluminescence inhibition by non-specifically acting pharmaceuticals and specifically acting antibiotics[J]. Chemosphere, 2017, 173: 387-394.
- [34] 孔令云, 田大勇, 石恬恬, 等. 混合化合物联合毒性研究进展[J]. 中国科技论文, 2014, 9(6): 663-668.
- [35] 张瑾, 刘树深, 邓慧萍, 等. 吡啶类离子液体对青海弧菌 Q67 的混合毒性评估[J]. 生态毒理学报, 2013, 8(6): 955-962.
- [36] 董玉瑛, 邹学军, 陈峥, 等. 三种药品联合毒性作用及其环境风险分析[J]. 环境化学, 2013, 32(7): 1 257-1 262.
- [37] 袁东星, 邓永智, 林玉晖. 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.
- [38] 朱兰兰, 林洪, 王静雪, 等. 利用发光细菌进行褐牙鲈中氯霉素残留快速检测的研究[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(10): 155-159.
- [39] 张国辉, 赵吉, 邵玉琴, 等. 发光弧菌快速检测液态奶中的三聚氰胺[J]. 食品科学, 2010, 31(6): 145-147.
- [40] PELLINEN T, BYLUND G, VIRTA M, et al. Detection of traces of tetracyclines from fish with a bioluminescent sensor strain incorporating bacterial luciferase reporter genes [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2002, 50(17): 4 812-4 815.
- [41] PIKKEMAAT M G, RAPALLINI M L B A, KARP M T, et al. Application of a luminescent bacterial biosensor for the detection of tetracyclines in routine analysis of poultry muscle samples[J]. Food Additives & Contaminants Part A Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment, 2010, 27(8): 1 112-1 117.
- [42] 石颖. 发光细菌快速检测畜产品中兽药残留研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012: 13-23.
- [43] CHEN Wen-yan, CAI Qiang, ZHAO Yuan, et al. Toxicity evaluation of pig slurry using luminescent bacteria and zebrafish[J]. International Journal of Environmental Research & Public Health, 2014, 11(7): 6 856-6 870.
- [44] 何早, 吴卫国, 胡雨欣, 等. 发光细菌法检测大米中的重金属[J]. 粮食与油脂, 2016, 29(5): 63-66.
- [45] 段效辉, 王颖, 曹鹏, 等. 发光细菌在水产品安全中的应用研究进展[J]. 化学与生物工程, 2016, 33(10): 8-11.
- [46] CUI Zhi-song, LUAN Xiao, JIANG Hui-chao, et al. Application of a bacterial whole cell biosensor for the rapid detection of cytotoxicity in heavy metal contaminated seawater[J]. Chemosphere, 2018, 200: 322-329.
- [47] VIROLAINEN N E, PIKKEMAAT M G, ELFERINK J W, et al. Rapid detection of tetracyclines and their 4-epimer derivatives from poultry meat with bioluminescent biosensor bacteria[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(23): 11 065-11 070.
- [48] 石颖, 丁武. 利用发光细菌检测猪肉中的兽药残留[J]. 西北农业学报, 2016, 25(9): 1 420-1 426.
- [49] SMITAL T, TERZIC S, ZAJA R, et al. Assessment of toxicological profiles of the municipal wastewater effluents using chemical analyses and bioassays[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2011, 74(4): 844-851.
- [50] CALABRESE E J, BALDWIN L A. Hormesis: the dose-response revolution [J]. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2003, 43(1): 175-197.
- [51] CHAPMAN P M. The implications of hormesis to ecotoxicology and ecological risk assessment[J]. Human & Experimental Toxicology, 2001, 20(10): 499-505.
- [52] MORSE J G. Agricultural implications of pesticide-induced hormesis of insects and mites [J]. Human & Experimental Toxicology, 1998, 17(5): 266-269.
- [53] 汤森, 曾鸿鹄, 王大力, 等. 四环素对费氏弧菌产生生物兴奋效应(Hormesis)的时间关系和机制[J]. 环境化学, 2015, 34(11): 1 981-1 987.
- [54] SHEN Kai-li, SHEN Chao-feng, LU Yuan, et al. Hormesis response of marine and freshwater luminescent bacteria to metal exposure[J]. Biological Research, 2009, 42(2): 183-187.
- [55] MA Xiao-yan, WANG Xiao-chang, NGO H H, et al. Bioassay based luminescent bacteria: interferences, improvements, and applications[J]. Science of the Total Environment, 2014, 468: 1-11.
- [56] GAO Ya, LIN Zhi-fen, CHEN Rui, et al. Using molecular docking to compare toxicity of reactive chemicals to freshwater and marine luminous bacteria[J]. Qsar & Combinatorial Science, 2012, 31(11/12): 809-816.

(上接第 171 页)

- [24] 李军茂, 何明珍, 欧阳辉, 等. 超高效液相色谱与飞行时间质谱联用快速鉴别木芙蓉叶的化学成分[J]. 中国药理学杂志, 2016, 51(14): 1 162-1 168.
- [25] 蒋益花, 陈敏明, 吴美媛. 微波法提取木芙蓉花总黄酮的工艺研究[J]. 中国酿造, 2007, 26(2): 34-36.
- [26] 卫强, 纪小影, 徐飞, 等. 木槿叶化学成分及抑制 α -葡萄糖苷酶活性研究[J]. 中药材, 2015, 38(5): 975-979.
- [27] 张文彦, 王晓红, 李安平. 木槿功能性营养成分与生物活性研究进展[J]. 食品与机械, 2017, 33(2): 216-219.
- [28] 金月亭, 应铁进. 木槿花生物活性的初步研究[J]. 中国食品学报, 2008, 8(3): 37-41.
- [29] 唐津忠, 鲁晓翔, 陈瑞芳. 金莲花中黄酮类化合物的提取及其抗氧化性研究[J]. 食品科学, 2003, 24(6): 88-91.
- [30] 太志刚. 四种花卉的化学成分及其抗氧化活性研究[D]. 昆明: 云南大学, 2011: 65-69.
- [31] 李华, 李佩洪, 王晓宇, 等. 抗氧化检测方法的相关性研究[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(4): 6-11.