



林 光 恒

(中国科学院海洋研究所)

早在十八世纪许多学者就已观察到微生物的发光现象。对发光微生物，包括发光细菌和发光真菌的研究迄今已有二百多年的历史。作为生物发光重要组成部分的微生物发光，由于它在理论研究和实际应用上的重要性，一直吸引着微生物学家、生理学家、生物化学家和物理学家的兴趣。海洋发光细菌在海上所形成的乳状海光，对军事、渔捞、航运的意义，也一直为航海学家、海洋学家和海洋生物学家所注意。随着科学技术的发展，对微生物发光的本质、生化过程的认识也不断深入；对发光微生物，特别是发光细菌的应用也日趋扩大。

本文就发光微生物的主要一类——发光细菌的生活环境、分类地位、发光机制及其应用的概况作一简单介绍。

一、发光细菌的生活环境

发光细菌是指在细菌生长过程中伴随有可见光发射的一类细菌。到目前为止，发光细菌绝大部分发现于海洋中，构成了海洋细菌中专门的一种生理类群——海洋发光细菌。

海洋中发光细菌不仅自由生活于海水中，而且也寄生、共生或腐生在鱼、虾等海洋生物体上，使被寄生、共生或腐生的生物体发光。如 *Photobacterium* 属的发光细菌，不仅存在于海水中，而且也存在于若干种海鱼的消化道和某些鱼及头足类的发光器官中；*Lucibacterium* 属的发光细菌除了生活于海水中外，也可以在已经死亡的海洋动物表面找到。

发光细菌到目前为止只发现一个种是淡水种，隶属弧菌属，定名为 *Vibrio albensis*。它是在德国易北河河水中发现的一种类似霍乱弧菌的发光细菌。此属在人粪便和胆汁中也发现过，它可以在淡水中以及直到 1.2% 浓度的 NaCl 溶液的培养基上发光 (Warren, 1945)。

Vibrio 属中，除了 *V. albensis* 是发光细菌外，还有一个种是海洋发光细菌，即 *V. fischeri*，该种在海水中某些海洋动物体上都可以找到。

一般海洋发光细菌的最适生长温度是 18°C—25°C。*P. phosphoreum* 和 *V. fischeri* 二个种可以在 5°C 及 5°C 以下的温度生长。*P. mandapamensis*, *L. harveyi* 和淡水种 *V.*

* 主要指海洋发光细菌

albensis 能在37℃生长。因此在全世界的海洋中都可以分离到。

至今还未发现有海洋发光细菌引起人和哺乳动物致病的情况。曾经有人在连续三天中吃下发光细菌液体培养物25毫升,未观察到有不良反应。

二、发光细菌的分类地位

1970年以前发光细菌的定名和分类存在着很大的混乱。许多种是从生态的观点上被定名的,如 *Micrococcus physiculus*, *Micrococcus* (*Coccobacillus*) *acropomae*, *Achromobacter marluccius*, *Photobacterium sepiiae* 等等。被描述的某些新种与现存的种几乎没有差异,同种异名现象广泛存在,给研究工作带来了很大麻烦。对于整个类群发光细菌的分类工作几乎没有专门进行。1954年 Breed 和 Lessel 提出将全部发光细菌归入两属,即 *Pseudomonadaceae* 科的 *Photobacterium* 属和 *Vibrio* 属。1957年第七版的伯吉细菌鉴定手册依 Breed 及 Lessel 的意见,把全部发光细菌列于 *Photobacterium* 和 *Vibrio* 属下,各属均有4个种。

Hendrie 等人 (1970) 针对发光细菌分类上的混乱,收集了各种发光细菌菌种进行了发光细菌的鉴定和分类的研究。他们根据发光细菌的形态、生理 (包括温度、盐度耐性和抗生素敏感性等)、生化诸特征,将全部海洋发光细菌归并为3属3种,即 *Vibrio* 属,包括 *V. fischeri*, *Photobacterium* 属,包括 *P. phosphoreum* 和 *P. mandapamensis* (新种);以及 *Lucibacterium* 属 (新属),包括 *L. harveyi*。1974年第八版的伯吉细菌鉴定手册就是以 Hendrie 等人的工作为基础,将全部发光细菌 (包括淡水种) 列为3属4种。即:

Vibrio 属 { *V. fischeri*
V. albensis

Photobacterium 属 { *P. phosphoreum*
P. mandapamensis

Lucibacterium 属 *L. harveyi*

此三属都位于 *Vibrionaceae* (弧菌科) 下。

三、发光细菌的分离培养

海洋发光细菌除了发光特性外,还具备有海洋细菌一般特点,如对盐度的要求,以海水或相当于海水盐度的2.5—3.0% NaCl 溶液中生长和发光最适。对温度的要求以25℃以下为宜,37℃或超过37℃除了个别菌种外,一般都不利于生长。海洋发光细菌喜欢沾附于某些海洋生物体和营养条件较好的固体颗粒表面;能耐受一定的静水压力;在无 NaCl 的培养基上不长。由于这些特性,一般都把海洋发光细菌视为典型的海洋细菌。

根据海洋发光细菌的特点,我们可以进行人工分离和培养。海洋发光细菌就象其它某些海洋细菌一样,离开了海洋环境,在人工的培养基上是较容易死亡的,特别是在人工长期培养下很容易丧失发光特性。

分离海洋发光细菌可以采取一定量的海水 (尤其是养分较丰富的海水,如河口、湾内)。用一般过滤水质微生物的硝化纤维素滤膜进行抽滤,然后将此滤膜置于固体培养基上 (配方在后),在20—25℃的温箱中培养3天左右,在暗室中用肉眼就能观察到该细菌菌落所发出的亮点。

从海洋生物分离发光细菌也是一种常用的方法,据我们体会以某些鱼虾类,如,鲳鱼、鲐鱼、乌贼、小虾为最好。方法是,将捕捞的新鲜鱼虾,用消毒海水冲洗除去表面污物,然后

将鱼虾放在大培养皿中（ $\phi 15\text{cm}$ 以上）。如果鱼体超过培养皿尺寸，可用消毒刀具切下鱼头或一块鱼肉放在皿中，并略加少许消毒海水或发光细菌培养液于皿中。随即将此培养皿置于 20°C 左右的温箱中培养。当天晚上（约培养12小时）就可见到亮光，次日晚可见亮度增强，此时可用接种环对准发光区域接触一下，在固体的发光细菌培养基上进行划线分离或稀释涂皿。

培养海洋发光细菌用的培养基有几种，根据我们体会以下列配方为佳：

旦白胨	0.5%
牛肉膏	1.0%
甘 油	1.0%
CaCO_3	少量

用陈海水或 2.5%—3.0% NaCl 盐水配制，调 pH 至 7.5。用作固体培养基时加琼脂 1.5%。

也有人把比目鱼剁碎、煮汤、过滤，将滤汁作为培养基。

在某些研究中也应用无机合成培养基。

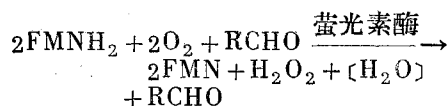
四、发光细菌的发光机制

发光细菌发光机制问题虽然经过许多学者的努力，有了比较深入的了解。但是，至今对导致发光的一系列反应中的个别细节并未彻底弄清。

McElroy 和 Seliger (1962) 认为细菌发光与细胞中氧化过程紧密相关，需要还原形的核黄素、棕榈醛 (palmitic aldehyde)、氧和萤光素酶。

近年来发光细菌机制的研究有了较大的进展。已经明确了细菌生物发光反应是一个复杂的过程，包括三种物质：还原形的黄素单核苷酸 FMNH_2 、长链的脂醛 (aliphatic aldehyde) RCHO 和分子氧。反应的产物是一定量的

黄素单核苷酸。发射的光有着接近 490nm 的发射光谱 (λ_B)，此值取决于精制的萤光素酶的细菌类型。作用的第一步是 FMNH_2 与萤光素酶相互作用形成一种复合物，再与氧经过几步反应形成一种类似氧化黄素蛋白的中间物，此中间物与 RCHO 作用产生光 (Lee 和 Murphy, 1975)。可用下式表示：



其中 H_2O 还未鉴定为反应产物。有人提出简单的动力学模型只包括一个 FMNH_2 (Matanabe 和 Nakamura, 1972)。反应的化学计算可以通过测定底物的消耗和所得到的产物的量来进行。

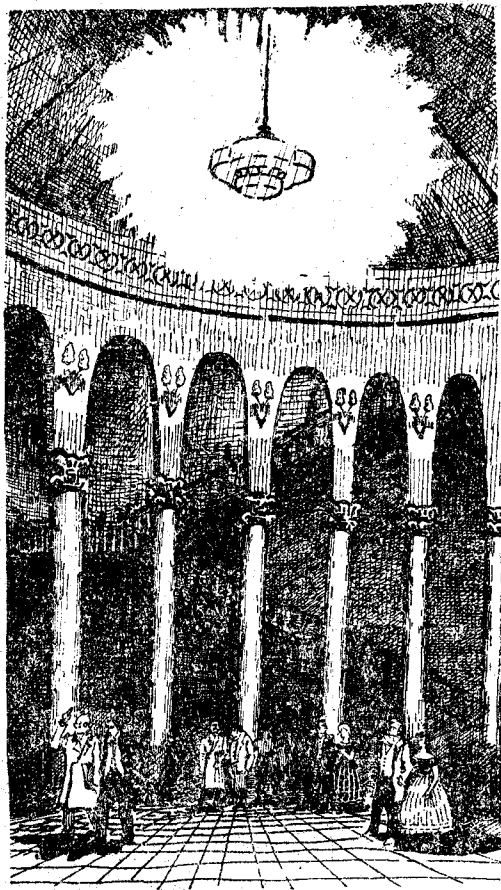
五、发光细菌的应用

随着发光细菌发光机制研究的不断深入和科学技术发展的需要，对发光细菌的应用也不断扩大。下面就发光细菌应用的几个方面作一简要介绍。

法国生理学家杜波依斯 (R. Dubois) 最早用发光细菌照明。1900 年他用大量发光细菌作为细菌灯照亮着在巴黎举行的国际展览会的光学宫殿大厅。由于发光细菌所发出的光是所谓“冷光”，不存在与光相联系的热，后来有人便提出将发光细菌用在利用“热光”照明有严重爆炸危险的火药库和采矿业中。第二次世界大战期间更有人提出用作灯火管制期间的标志 (见 Harvey, 1952 年专著)。

发光细菌发光需要氧气，且对氧气是极其敏感的。当氧气浓度为十万之一时，发光细菌就能产生可测出的光。利用发光细菌的这一特性作为对微量氧气的检测、滤器和滤膜孔径的测量或裂缝的检查、真空度的测定以及对氧气

通过橡胶和其它物质的扩散状况的测定等等 (Scholes, 1964)。



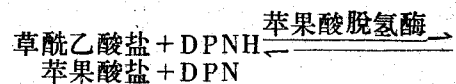
在医药工业上发光细菌主要用作对抗菌素的检查和毒性试验, 以及作为研究药物作用的模型系统 (model system), 特别是对麻醉药 (Harvey, 1952; Halsey和Smith, 1970; White和Dundas, 1970等)。鉴于发光细菌对药物反应的整个生活史的差异, Wardley-Smith (1975) 依据研究海洋细菌自然生态特征的恒化器 (Chemostat) 原理, 设计出一种发光细菌连续培养装置, 即所谓稳定发光装置 (Luminostat)。利用此装置可以使培养物中细菌令分布近似恒定, 以减少由于菌令所引起的方法误差。不仅麻醉剂对细菌发光有影响, 而且其它许多化学药品, 如生物碱、乙醚、乙

醇、金属盐类都对细菌发光有影响 (Harvey, 1952)。

用发光细菌作为材料来研究光合作用始于本世纪初。乃是利用发光细菌对氧的专一性, 测定在无氧时压碎的三叶草叶片的叶绿体悬浮液在光合作用中所释放出的氧。

近十年来发光细菌的生物化学研究有了较大的进展。利用发光细菌的粗酶制剂——含有二磷酸吡啶核苷酸脱氢酶 (DPNH*脱氢酶), 来检测DPNH浓度以及导致产生DPNH的先期酶促反应中被氧化的底物浓度。

利用下列反应来测定苹果酸盐或草酰乙酸盐浓度:



依DPNH氧化的速率来测定草酰乙酸盐, DPNH降低的速率取决于发光强度。

利用发光细菌的粗提取物与生物中普遍存在的黄素化合物(如黄素单核苷酸, 简称FMN)的专一性反应, 在活体外对来自地球外的样品进行生化鉴定, 决定样品中是否存在生命。此技术对大肠杆菌 (*E. coli*) 检出的限度 (7×10^{-17} 克FMN/每个细胞) 约为 10^5 细胞 (Seliger, 1973)。

在环境污染的监测上也利用发光细菌。这一方面是基于各种有机的、无机的化合物和各种金属及其盐类对细菌发光强度的影响来作为对污染的监测, 也包括核辐射的监测。从活体内生化过程来看, 显然是由于发光机制中某一种或数种要素受到了化学抑制。

发光细菌的应用是多方面的, 除了上面种种之外, 还有人利用发光细菌对化学药品的高度敏感性来代替警犬, 进行“嗅觉”。也有利用活体外DNA杂交技术进行海洋发光细菌种属与其它海洋细菌种属之间遗传关系的研究 (Reichelt等, 1976)。

* 又称尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD)