

水/土壤环境微生物分析与利用

1 水环境微生物分析与利用

不同水环境中微生物菌群的组成数量均有差异,即使在同一水域的不同季节微生物的组成及数量亦有变化。然而在同一水域相同季节,在不受污染的情况下,水中微生物菌群组成和数量是有一定的,它们维持着微生物菌群间的生态平衡。水中微生物菌群组成主要是细菌,除细菌外还有酵母菌、放射线菌、噬菌体及病毒等。随着水环境的污染,会造成水生生态的失调。而微生物作为一种生态调节剂,治理水环境可以明显的改善水质,从而改善水生态环境[1]。

1.1 有益微生物对水生生态系统的生物修复

微生物生态学和微生态的研究表明水环境和水生生物中存在大量的有益微生物,这些微生物直接影响水质和水产养殖。其实微生物无论从群体还是从个体说,它都具有两重性,既有致病作用,也有生理作用,致病作用和生理作用是相对的,只有在特殊状态下,才会表现出致病作用。[2]

水生生态环境中的有益微生物(硝化细菌,光合细菌,硫化细菌,芽孢杆菌等

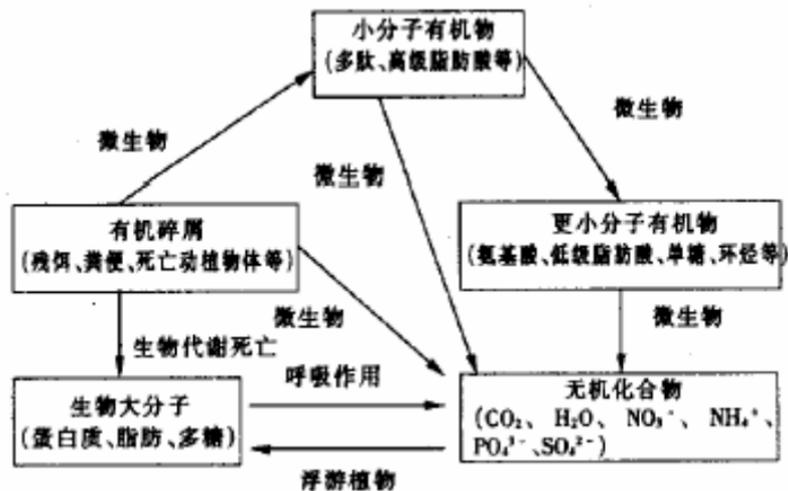
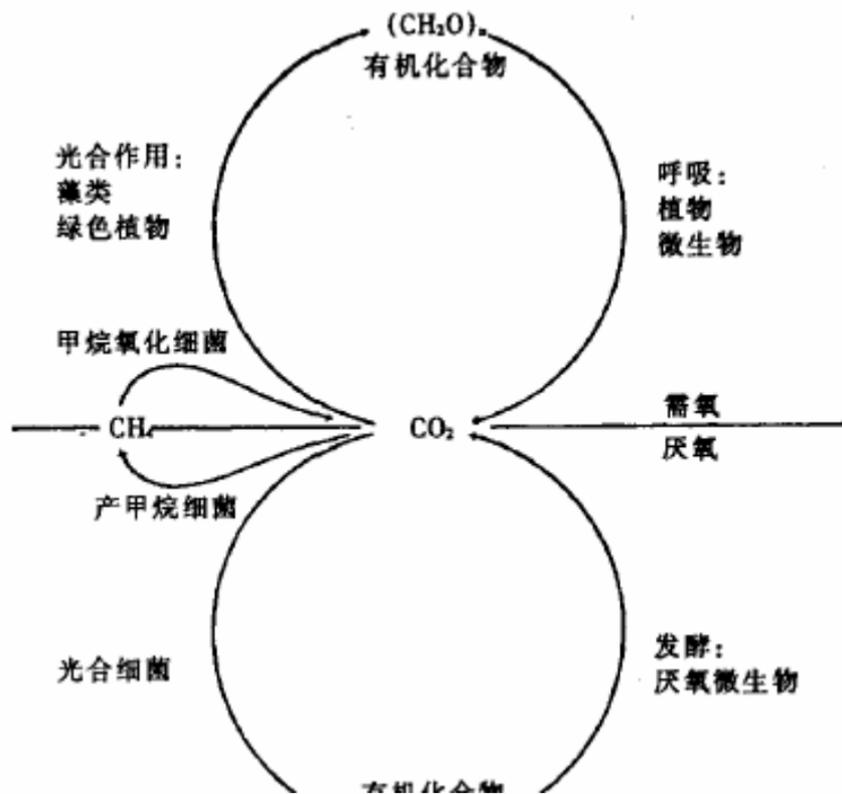


图2

1.2 微生物在水体生态链中的地位和作用

微生物是自然界中分布最广、种类最多、数量最大、个体最小的生物类群，是大自然生态平衡的基础。这些微生物可以保证水质的正常功能，从而维持水生



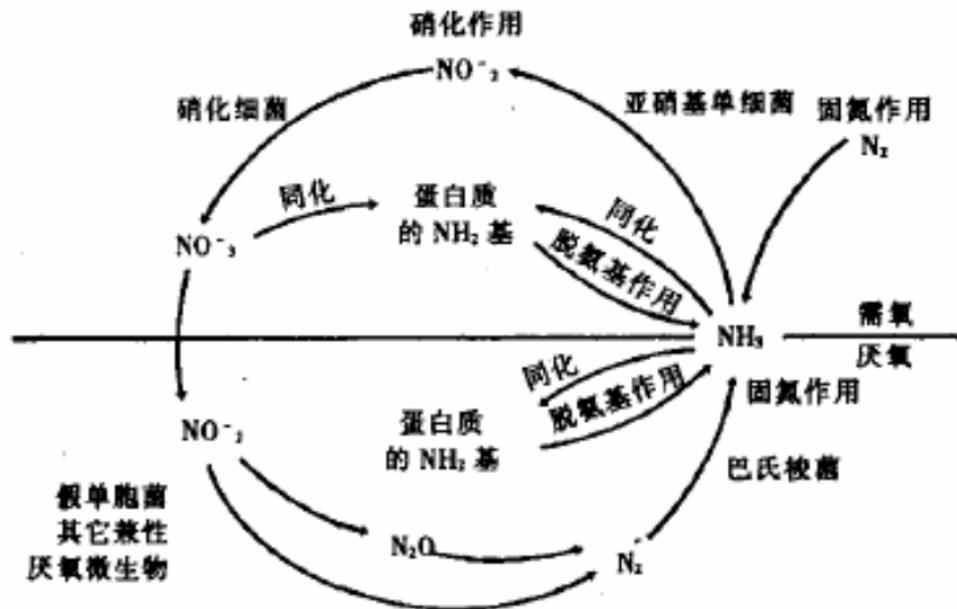
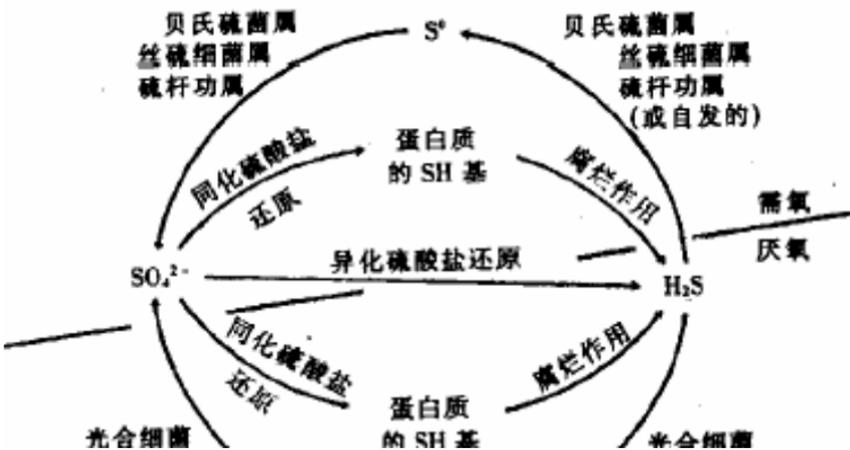


图4水生环境中的氮循环

-)。许多微生物和植物可用硫酸盐作为硫的唯一来源,以氧化态- (R - HS) 把它转变成为有机的硫氢基化合物。微生物产生的H2S 对大多需氧微生物有毒性并且它可以与许多的金属离子起反应,使之生成沉淀,从而起净化作用。硫循环的简图(见图6) 。[13] [15]



调控土壤中能量和养分循环以及有机质转化的对应微生物的数量,并且土壤微生物对碳和氮转化速率较快,可以很好地表征土壤总碳或总氮的动态变化,因此它也是比较敏感的生物学指标。大量研究表明:不同重金属及其不同浓度对土壤微生物生物量的影响效果也不一致;并且,土壤环境因素也影响重金属污染对土壤微生物生物量的大小。

土壤微生物种群结构是表征土壤生态系统群落结构和稳定性的重要参数之一。近年来,国内外学者采用较为先进的碳素利用法、核酸测定法研究了土壤微生物功能的多样性和结构的多样性。不同类群的微生物对土壤中重金属的耐性也不同,通常为真菌>细菌>放线菌。

2.2土壤重金属污染微生物修复的机理

调查表明,受到重金属污染的土壤,往往富集多种耐重金属的真菌和细菌,微生物可通过多种作用方式影响土壤重金属的毒性。微生物对土壤中重金属活性的影响主要体现在以下四个方面: 吸附和富集作用, 溶解作用, 氧化还原作用, 对重金属-有机络合物的降解。现将从上述几个方面对有关的研究进展和动态作一概述。

微生物对重金属离子的生物吸附和富集

物可促进土壤对重金属的固定，同时还能够利用有效的营养和能源，在土壤滤沥过程中通过其代谢活动分泌有机酸络合并溶解土壤中的重金属。

微生物对重金属的氧化还原

土壤中的一些重金属元素可以多种价态存在，它们呈高价离子化合物存在时溶解度通常较小，不易迁移，而以低价离子形态存在时溶解度较大，易迁移。微生物能氧化土壤中多种重金属元素，某些自养细菌如硫-铁杆菌类能氧化As、Cu、Mo、Fe等。微生物的氧化作用能使这些重金属元素的活性降低。另一方面，微生物可以通过对阴离子的氧化，释放与之结合的重金属离子。如氧化铁-硫杆菌能氧化硫铁矿、硫锌矿中的负二价硫，使元素Fe、Zn、Co、Au等以离子的形式释放出来。微生物还可以通过氧化作用分解含砷矿物。通过对3株高温硫杆菌协同热氧化硫化杆菌对砷硫铁矿的氧化分解的研究表明，高温硫杆菌加速砷硫铁矿分解的可能机制如下：高温硫杆菌去除矿物分解过程中产生的硫保护层，分泌配体溶解活化硫，分泌有机代谢物促进热氧化硫化杆菌的生长。此外，微生物还能还原土壤中多种重金属元素。例如，细菌产生的特殊酶能还原重金属，且对Cd、Co、Ni、Mn、Zn、Pb和Cu等有亲合力；选用从浓度10 mmol/L Cr⁶⁺、Zn²⁺、Pb²⁺的土壤中分离出来的菌种能够将硒酸盐和亚硒酸盐还原为胶态的Se，能将Pb²⁺转化为Pb，使胶态Se与胶态Pb不具毒性，且结构稳定。

大于重金属。经研究认为,这些性质与重金属浓度相关的同时也与土壤有机碳、pH相关,而且由于土壤各个化学因子之间的相互作用影响太大,难以判断是什么因子引起微生物性质改变的。随着对微生物研究方法以及金属形态研究方法的改进,可能的办法是将微生物学性的变化与金属形态特别是生物有效态以及植物的吸收联系起来研究,采用两个或多个相对独立的指标来综合评价重金属污染土壤。

许多研究者对同样因子的研究结果相差很大,甚至是相互矛盾的,一个很重要的原因就是研究方法。近年来许多学者对传统方法作出改进,尽量避免分离培养,如测定微生物群落的磷酸脂脂肪酸法以及一些分子生物学的方法。但所有这些都还只是一种尝试,要作为标准方法还需大量的研究。还有,以往的研究工作多是在模拟体系中进行的,研究结果与野外实际条件存在很大的差异。例如,在复杂的土壤体系中,微生物与不同类型的土壤胶体及重金属的相互作用机制及其对重金属形态、稳定性和生物有效性的影响如何等,还有待进一步的研究。总的来说,我们仍需要做大量的野外试验以获得准确的实验参数来验证室内实验的结果,不能仅仅“纸上谈兵”,以期建立较为标准的研究方法。

从前面微生物与重金属相互作用的一系列理论和实验中,不难看出,环境中的重金属往往呈复合形态,这就需要将具有不同修复功能的高效菌株加以混合

- [14] 刘波,刘文斌, 微生物对水产养殖环境的生物修复作用, 淡水渔业,2003 , 33 (1)
- [15] WEINER R M ,et al. Applications of biotechnology to the production , recovery and uses of marine Polysaccharides[J].Biotechnology ,2000 (3) :889 ~ 902
- [16]张秋芳.土壤重金属污染治理方法概述,福建农业学报,2000,15(增刊):200-203.
- [17]王保军,杨惠芳.微生物与重金属的相互作用,重庆环境科学,2001,18(1):35-38.
- [18]蒋先军,骆永明,赵其国.重金属污染土壤的微生物学评价,土壤,2000.3:130-134.
- [19]沈振国,陈怀满.土壤重金属污染生物修复的研究进展,农村生态环境,2000,16(2):39-44.
- [20]陈晓东,常文越,邵春岩.土壤污染生物修复技术研究进展,环境保护科学,2001,5:53-56.
- [21]龚平,孙铁珩,李培军.重金属对土壤微生物的生态效应,应用生态学报,1997,8(2):218-224.

Pops 微生物降解方法研究

微生物降解被认为持久性有机污染物在自然界中降解的主要途径,有关研究也相当活跃。另外,应用生物降解原理治理被污染环境的生物修复技术近年来发展很快,由于它不仅经济、安全,而且所能处理的阈值低、残留少,其应用前景十分广阔 本文根据国际上最新的研究报道,就持久性有机污染物的降解菌株、降解机制以及 pops 污染的生物修复等内容作一简要综述。

基酚)和氯代酚。

表 1 联合国欧洲经济委员会 POPs 控制名单

	英文名称	中文名称	CAS 登记号
禁止使用或排放的化合物	Aldrin	艾氏剂	309-00-2
	Chlordane	氟丹	57-74-9
	Chlordecone	开蓬	143-50-0
	DDT	滴滴涕	50-29-3
	Dieldrin	狄氏剂	60-57-1
	Endrin	异狄氏剂	72-20-8
	Heptachlor	七氯	76-44-8
	Hexabromobiphenyl	六溴联苯	36355-01-8
	Hexachlorobenzene	六氯苯	118-74-1
	Mirex		2385-85-5
	PCB	多氯联苯	
Toxaphene	毒杀芬	8001-35-2	
限制使用或排放的化合物	DDT	滴滴涕	50-29-3
	HCH	六六六	
	PCB	多氯联苯	608-73-1
减少到 1990 年的 排放水平	PAHs [*]	多环芳烃	
	Dioxines/furans	二恶英/呋喃	
	Hexachlorobenzene	六氯苯	

注：* 为多环芳烃，指苯并(a)芘、苯并(b)荧蒹、苯并(k)荧蒹、茚并(1,2,3-c,d)芘。

表 1 部分 POPs 的降解微生物

POPs	降解菌
艾氏剂	镰孢霉菌、青霉菌
狄氏剂	芽孢杆菌、假单胞菌
DDT 等多种 POPs	白腐真菌
七氯	芽孢杆菌、镰孢霉菌、小单胞菌、诺卡氏菌、曲霉菌、根霉菌、链球菌
丙体六六六	梭状芽孢杆菌、埃希氏菌

表 1)。

2.2 降解合成农药的优势微生物

通过适应作用或共代谢作用降解农药的微生物较多，其中黄杆菌属、镰刀菌属、节细菌属、曲霉属、芽孢杆菌属、棒状杆菌属、木霉属等 7 属，在降解作用中占优势(见表 2)。

氯代芳香烃(包括 PCB)、多环芳烃、硝基芳烃、农药(杀虫剂、除草剂)等,大多为异生物合成物(Xenobiotics)。就氯代芳香烃而言,它们广泛用作溶剂、还原剂、导热剂、防腐杀菌剂、除草剂以及化工、医药、农药生产原料与中间体,可通过多种途径如生产废水排放、废物填埋与焚烧、事故性泄漏等进入环境,同时也是许多异生物合成物如农药等在环境中迁移转化(水解)的产物,对环境的污染具有广泛性与普遍性。

3.1.1 好氧生物降解研究

以氯代芳香族污染物为例,迄今有关氯苯、氯苯酚、PCB、2,4-D 等污

chlorophenolium 降解 PCP 并非由 pcpB 基因编码的 PCP 4-单加氧酶直接转化为四氯对苯二酚，实际上先转化为四氯苯醌，而后被还原为四氯对苯二酚，该过程由 pcpD 基因编码的依赖于 NADPH 的还原酶催化完成。四氯乙烯脱氯降解菌 Dehalococcoides ethenogenes strain 195 对多种氯代芳烃具有还原脱氯活性。

3.1.2 厌氧生物转化与降解研究

氯代芳香族污染物厌氧生物降解是通过微生物还原脱氯作用，逐一脱氯形成低氯代中间产物或被矿化生成 $\text{CO}_2 + \text{CH}_4$ 的过程。

2001 年，Tartakovsky B，Michotte A，Cadieux J C A 提出了氯代芳香烃、多

气联基 (PCP)、砷基基类等有机污染物厌氧降解途径到处理工程与生物修复工

上苯环的稠环化合物，是土壤、水体和空气环境中广泛存在的一类污染物。PAHs主要来源于石化燃料的燃烧过程，是一类被很多国家列入黑名单的有机污染物。如何有效清除 PAHs 造成的环境污染，长期以来是一个世界性的热点与难题

PAHs降解菌筛选的传统的方法是利用平板技术直接分离PAHs降解菌，这一方法由于其便于菌种分离的优点目前仍被广泛使用。Bastiaens等人利用锆-聚砜复合膜这一可吸附PAHs的载体来筛选具有PAHs粘着性的降解菌株，以期提高环境中那些被土壤或淤泥吸附的PAHs的降解效率。随着分子生物学的迅猛发展，基于特定DNA片段或核糖体RNA的检测筛选技术已经逐渐成为一种选择，其关

键在于对PAHs降解途径中关键降解酶的基因序列的测定。这些基因比印有可能成

力。

3.2.2 大分子 PAHs 的微生物降解

近年来，对大分子 PAHs 的微生物降解研究进展迅速。2000 年，Robert A . Kanaly 等分离到的降解菌，包括脱氨产碱杆菌(*Alcaligenes denitrifima*s)、红球菌、白腐真菌、假单胞菌和分枝杆菌等。

另外，2000 年 Sndarat Boonalmn , Margaret L . Brits el al 从 PAHs 污染的现场分离出的由某些特定的真菌和细菌组成的混合物，能以大分子 PAHs 为唯一碳源和能源，进行生长繁殖。

由以上看出，农药降解微生物在自然界中广泛存在，说明降解农药的菌并非特殊的微生物，而是在自然界中广泛存在。

3.3.2 降解基因的克隆与表达

这一领域已经成为当今环境生物技术的研究热点，特别是分子生物学和生物技术的发展极大地推动了农药微生物降解的研究，这一工作基础是对降解质粒的研究，质粒是染色体外的遗传因子，它的基本特性之一是能寄生在寄主细胞内，并和寄主细菌进行同步复制，在细菌细胞分裂时，它能稳定地传给后代细胞。人们已经对除草剂 2.4-D 及 2.4.5-T 的降解质粒做了不少研究。研究证明

吸附，难于受到微生物的攻击。细菌好气降解二恶英有关细菌降解低氯二恶英、DD、DF 的研究比较多。降解的细菌主要有 Burkholderia(Ahraligenes)属，Sphingomonas 属，Pseudomonas 属，Staphylococcus 属的菌株。

1999 年，Megharaj 等发现在土壤中的 Sphingomonas sp. strain RW1 能够生存。在土壤中添加 DD，DF 能被降解。而且，Halden 等也认为在土壤中添加的 DD，DF，2-CDD 能被 Sphingomonas sp. straub RW1 降解。

3.4.2 厌氧细菌对二恶英的降解

有研究报告认为由污泥中的厌氧微生物群(多为细菌)可使 1, 2, 3, 4, 6, 7,

4 结论

有效防治POPs对环境和人类的危害是一件刻不容缓的大事。我国POPs研究起步较晚，缺乏相关的环境背景资料，研究基础相对薄弱。因此，有必要大力开展有关POPs的基础研究和应用研究，从而制定出符合国情、因地制宜的控制措施。

综上所述，归纳目前POPs的微生物降解研究内容，国内集中在pops的环境化学行为、pops的检测与来源分析、污染治理途径等研究上；国外研究主要是pops的判别与筛选、pops的环境行为、生物毒性、环境风险评价等。国内外对pops在

国外研究者近年来针对一些难降解污染物高效降解途径的缺乏和现有已知途径的缺陷，提出了应用分子生物学等手段进行降解途径的设计、组装，新代谢途径的创建，以扩展降解菌利用底物的范围、避免有毒中间产物的形成、提高底物通量及其生物可利用性、增加催化活性的稳定性等。这方面的工作有赖于对降解菌生理生化、遗传学特性的全面认识，是今后生物降解研究的重点与热点。

(3)在应用基础方面，应用DNA 探针、FISH、DDGE 以及基因芯片(Microarray)等技术研究废水处理生物反应器、污染环境生物修复工艺的微生物种群结构多样性与动态学，在工艺系统水平上表征污染物转化降解与微生物相互

[5] J Harry W .Valack , Dick J .Bakker , Ingvar Brandt , etal . Controlling persistent organ ic po llutants—what next?Environmental Toxicology and Pharmacology ,1998 , 6(3) : 143— 175

[6]Jan Campfens , Donald Mackay . Fugacity—based model of PCB bioaccumulation in complex aquatic food webs . Environ . Sci . Technol . , 1997 , 31(2) : 577— 583

17]张建强 , 二恶英的微生物降解 , 重庆环境科学 , 2003 , 第25卷第10期

[8]]Rudolph A .Abramovitch ,Bangzhou Huang ,Mark Davis ,etal .Decompo sition of PCB ' s and other po lychlorinated aromat—ics in soil using microwave

[15] E . E . Tarver , H . H . Hill . Comparison of a pulsed electron capture detector and a fourier transform ion mobility detector after capillary supercritical fluid chromatography . Fresenius ' J . Anal . Chem . , 1992 , 344(10— 11) : 453— 459

[16] j Oliver Brueggemann , Ruth Freitag . Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil samples by micellar electrokinetic capillary chromatography with photodiode array detection . J . Chromatogr . A , 1995 , 717(1— 2) : 309—

324

[17] 刘旭光 , 宋福平 , 张杰 , 寡核苷酸芯片在微生物检测中的应用 , 生物技术通

[24] 苏丽敏, 袁星, 持久性有机污染物 (POPs) 及其生态毒性的研究现状与展望, 2003, 重庆环境科学, 第25卷第9期

[25] 朱利中, 张建英. 环境化学. 杭州: 杭州大学出版社, 1998

[26] 王海黎, 陶澍. 生物标志物在水环境研究中的应用. 中国环境科学, 1999, 19(5): 421-426

[27] 李森, 陈家军, 孟占利, 多氯联苯处理处置方法国内外研究进展, 中国环保产业, 2004-2

[28] Song Lin, Peter L. Bullock, Richard F. Addison, et al. Detection of cytochrome

EDCs 微生物降解方法研究综述

1 环境激素(EDCs)

20 世纪后期,野生动物和人类的内分泌系统、免疫系统、神经系统出现了各种各样的异常现象。人类内分泌系统异常的突出表现是生殖异常,除了个别现象之外,总的趋势是:“阴盛阳衰”。其主要原因在于环境中存在一些能够像激素一样影响人体和动物体内分泌功能的物质,并不直接作为有毒物质给生物体带来异常影响,而是以激素的面貌对生物体起作用,即使数量极少,也能让生物体的内分泌失衡,出现种种异常现象。“环境激素”(EnvironmentalHormone)也译作“环境荷尔蒙”。学术上命名为“内分泌干扰物”(Endocrine Disrupter 或 Endocrine Distrupting Chemicals)。尽管它们在环境中浓度极小,但是一旦进入人体和动物体内,可以与特定的激素受体结合,进而诱导产生雌激素,或者进一步与生物体

	福美锌、苯菌灵
洗涤剂	C5- C9 烷基苯酚、壬基苯酚、4- 辛基苯酚
防腐剂	五氯酚、三丁基锡、三苯基锡
副产物	二恶英类、呋喃类、苯并(a) 芘、八氯苯乙烯、对硝基甲苯、苯乙烯二聚体、苯乙烯三聚体
其他化合物	双酚 A、多氯联苯类、多溴联苯类、甲基汞、铅及络合物、镉及络合物

2 EDCs 微生物降解方法

目前, 关于环境激素的降解的研究还处于一个相对较低的水平, 在目前已公布的 67 种环境激素中, 在收集有关文献时遇到了一些麻烦, 近五年的文献中研究苯二甲酸二甲酯的比较多, 多氯代有机化合物的降解已经有机构在进行研究。

2.1 对苯二甲酸二甲酯的好氧微生物降解

各种对苯二甲酸乙二醇聚酯(PET)产品的产销量逐年上升, 广泛应用于聚酯

甲酯的降解。根据鉴定出的中间产物，对苯二甲酸二甲酯的生化降解途径为：
 $DMT \rightarrow MMT \rightarrow TA \rightarrow CO_2 + H_2O$ 。

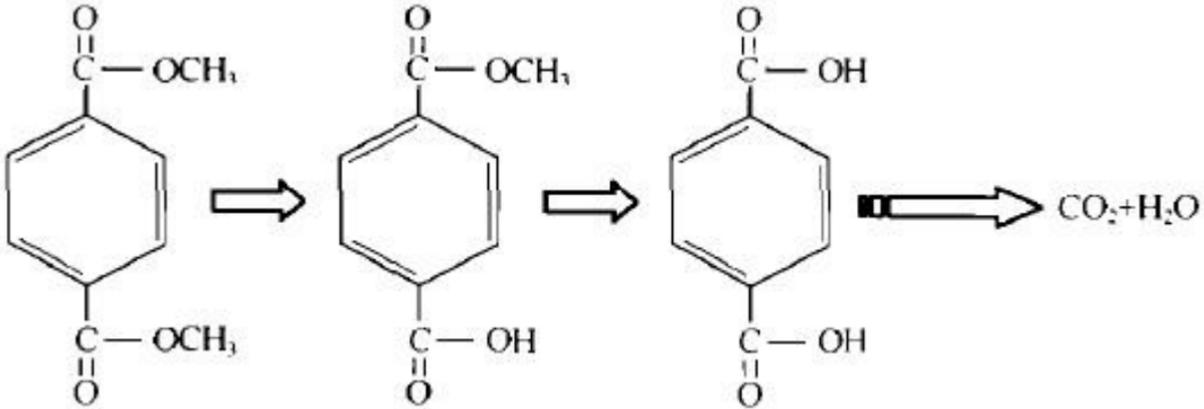
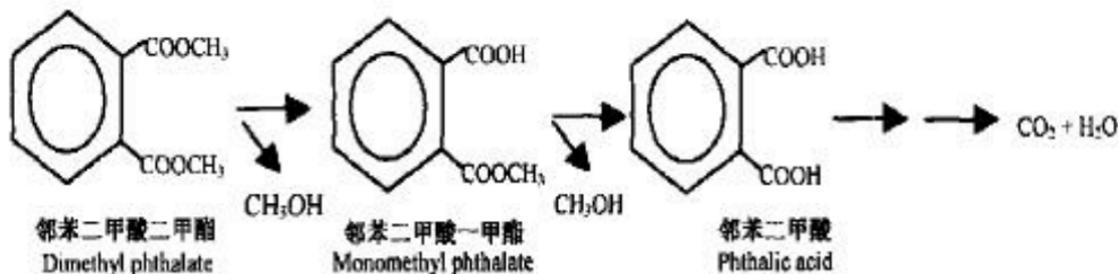


图 1 红树林泥中富集的细菌对对苯二甲酸二甲酯(DMT)的生物降解途径

研究表明，对苯二甲酸二甲酯的 2 个酯基的水解是决定其完全矿化的重要起始步骤。对苯二甲酸二甲酯比间苯二甲酸二甲酯更容易被降解。

邻苯二甲酸丁酯（环境中广泛污染物 DBP）固定化微生物降解

48 h 内将浓度高达 2 600 mg/ L 的邻苯二甲酸完全矿化;两个细菌的组合(组合 I 包括 *Pseudomonas fluorescens* , *P. aureofaciens* 和 *Sphingomonas paucimobilis* ;组合 II 包括 *S. paucimobilis* 和 *Xanthomonas maltophilia*) 能够在 48 ~ 120 h 内将邻苯二甲酸二甲酯完全降解,产生的中间产物有邻苯二甲酸一甲酯和邻苯二甲酸. 结果表明,邻苯二甲酸二甲酯的微生物降解需要有两种以上细菌才能完成.

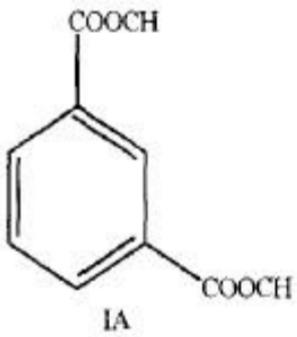
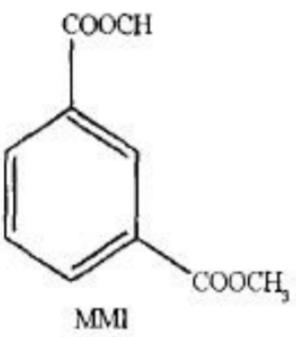
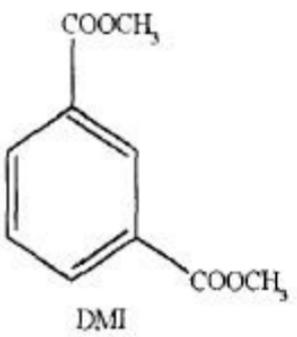


邻苯二甲酸二甲酯的好氧微生物降解的可能途径

从活性污泥中分离到的细菌 *Comamonas acidovorans* Fy -1 在 48 h 内将 2 600 mg/ L 的邻苯二甲酸完全矿化. 同时有两个细菌组合能够利用邻苯二甲酸二

为:DMI MMI IA CO₂ + H₂O。研究表明,DMI 的 2 个酯基的水解是决定 DMI 能否完全矿化的重要步骤,但 2 个酯基的酶催化水解反应有差异,由不同的细菌分步来完成,说明是酯酶对不同底物的专性所致;第 2 个酯基的水解对整个降解过程有决定性作用。

注：上文的 3 种化合物包括 DMI、间苯二甲酸一甲酯(mono2methyl isophthalate , MMI) 和间苯二甲酸(isophthalate , IA),后 2 种化合物作为 DMI 的可能代谢中间产物而被使用;DMT 为 DMI 的异构体,用作富集培养时的底物。



环境污染物。许多 PCOC 类化合物是环境激素物质，当它们长期低剂量存在时，容易使人和生物的内分泌系统紊乱。通常它们的辛醇/水分配系数较高，非常容易在土壤/沉积物的有机质中积累，而且通过食物链的传递和浓缩作用将会对人类和野生动物造成不利的影响。

尽管 PCOC 多为人工合成化合物，对微生物有毒害作用，微生物降解性很差。但人们还是在河底沉积物中找到了一些能够缓慢降解这些物质的微生物。研究表明，通过长期的自然演化，有的微生物能逐步改变自身条件以适应变化的环境，他们可通过自然突变形形成新的变种，也可能通过形成诱导酶以适应新的环境，其中后一种情况更为普遍。研究表明，尽管这种降解不能使 PCOC 有机物完全矿化，但可以达到无毒或低毒效果，而且这种降解后的产物较易溶于水，有利于进一步降解。可见，微生物的遗传变异和质粒感传递特征，加上人为的驯化，可使一些微生物能够克服 PCOC 的毒害作用，为生物降解提供了可能。

脱氯是多氯代物有机化合物生物降解的关键步骤，主要分为好氧脱氯和缺氧脱氯。在土壤深层中左右左较多的溶解氧，PCOC 微生物降解以氧化脱氯为主。

- [8] 陈敏,罗启芳. 聚乙烯醇包埋活性炭与微生物的固定化技术及其对水胺硫磷降解的研究[J]. 环境科学,1994,15(3):11-14.
- [9] 王琳,罗启芳. 中国公共卫生 2003 年第 19 卷第 11 期 1302~1303.
- [10] 林兴桃,王小逸,任仁. 环境污染与防治 第 25 卷 第 5 期 2003 年 10 月
- [11] 刘兆平. 环境雌激素活性物质的检测. 国外医学卫生分册, 2000, 27(2): 96~100
- [12] 戴树桂,张东梅,张仁江等. 固相萃取技术预富集环境水样中邻苯二甲酸酯. 环境科学, 2000, 21(2): 66~69
- [13] 邱东茹,吴振斌,贺锋. 内分泌扰乱化学品对动物的影响和作用机制. 环境科学研究, 2000, 13(6): 52~55
- [14] 李佳喜,顾继东,周毅频,蔡创华. 间苯二甲酸二甲酯的好氧微生物降解及其生化途径. 热带海洋学报, 2004, 23(5), 56~61
- [15] 吴畏,张晓枫. 土壤/沉积物中多氯代有机物的生物降解行为及修复. 辽宁城乡环境科技, 2004, 21(2), 24-25

[24] Karpagam S , Lalithakumari D . Plasmid—mediated degradation of o—and P—phthalate by *Pseudomonas fluorescens* . *World J Microbiol & Biotechnol* , 2000 , 15 : 565 ~ 569

[25] J uneson C , Ward OP , Singh A. biodegradation of bis (2 - ethylhexyl) phthalate in a soil slurry - sequencing batch reactor. *Process Biochem* , 2001 , **37** : 305 ~ 313

[26] Wang YY(手莹莹) , Fan YZ(范延臻) , Gn JD(顺继力) Degradation of phthalic acid and dimethyl phthalate by aerobic microorganisms. *Chin J Appl Environ Biol(应用与环境生物学报)* , 2003 , 9 : 63 ~ 66

[27] WHO/ IPCS. Environmental Health Criteria 189 ,Di-n-butyl phthalate[M] . Geneva :World Health Organization ,2000.

[28] Kavlock R J , Daston G P , Dero sa C, et al. Researchneeds fo r risk assessment of health and environmentaleffects of endocrine disrup ters: A repo rt of the U. S. EPA sponso red wo rk shop [J] . *Environ Health. Perspect*, 2000, 104: 715 ~ 740.

[29] Jara S , Lyube C , Greibeck T, et al. Determination of phthalates in water samples

环境微生物新技术——生物毒性检测与基因诊断

1 引言

目前，世界各国对人接触、使用、排放的各类化学物质的生物安全性都予以高度重视，大多采用毒性测试的方法进行分析评价，毒性试验在预测和评价化学品的环境效应方面起着重要作用。

传统毒性测试常以实验动物(如小鼠、大鼠、家兔等)为实验受体，用 LC_{50} （半数致死浓度）或 EC_{50} （半数有效浓度）等来表征物质急性毒性，存在周期长、成本高、方法复杂等局限性，随着生命科学、环境、新材料等科学的发展，生物学、信息科学、计算机技术的引入，环境污染分析手段进入了一个新的发展阶段。以微生物为检测手段时多称为生物毒性(biotoxicity)，常选择微生物的某一项或几项生理指标作为指征(如细胞生长、呼吸、酶活性等)，根据待测物影响这些指征的程度来判断毒性的强度，此外，以基因这一分子水平上的物质作为污染检测手段的发展也十分迅速。这些方法因其快速、灵敏、经济等特点得以迅速发展，已经成为国内外科学工作者研究的热点。

但如今生物发光检测技术正与生物传感器技术、细胞固定化技术以及计算机技术紧密结合，内容逐步完善，自动化水平也日趋提高，下面将有详细介绍。

2.2 生物传感器

随着生物技术及电子科技的迅速发展，生物传感技术已逐渐形成一个新兴的高科技领域。由于传感器具有高度自动化、微型化与集成化的特点，能提供有效而快速的分析手段而代替传统的实验室技术，从而为生物医药、环境监测、食品工业等领域带来新的技术革命。近年来利用生物传感器检测环境中的污染物，特别是用于现场检测日益为人们所青睐。

生物传感器是由分子识别单元(敏感材料)和转换器2个部分构成，以生物分子去识别被测目标，然后通过信号系统将生物分子所发生的物理或化学变化转化为相应的电信号予以输出放大，从而得到检测结果。根据敏感材料的不同相应地分为酶传感器、微生物传感器、细胞传感器和免疫传感器。本文重点介绍微生物传感器。

根据微生物的种类分类，目前，研究的生物毒性分析微生物传感器有以下几类：

2.2.1 发光微生物(luminous microbes)传感器

前面已有介绍，发光微生物指自然界存在、细胞内具有生物发光代谢系统的原核和真核微生物，近来还包括导入发光基因而使原本不发光的微生物具备发光特性的基因工程发光微生物。与光电检测手段相结合，自动化程度高、结果客观、人为误差少。目前，国外报道了

CO₂电极检测呼吸作用CO₂的产生或添加氧化还原介质(mediator),如苯醌类、铁氰化钾([Fe(CN)₆]^{3-/4-}),测定细胞转化介质过程中电极产生的电流变化。基于氧化还原介质的传感器选用的假单胞菌株有洋葱假单胞菌(*Pseudomonas cepacia*)、恶臭假单胞菌(*Pseudo—monas putida*)等。检测的污染物有氯芬磷、氯氰菊酯、溴氢菊酯、乐果、硫丹等,毒物可显著抑制工作电极上电流的产生;而以大肠杆菌构建的氧化还原介质传感器检测的污染物有壬酚、三氯苯酚、苯磺酸盐、萘磺酸盐等,EC₅₀值检测水平可达10⁻²mg/L。

2.2.4 蓝细菌(cyanobacteria)与藻类(algae)传感器

蓝细菌与藻类虽然在分类地位上有差异,但其的共同特点是可进行产氧型光合作用,叶绿素吸收光量子转变为激发态,回到基态时产生荧光;此类光合作用与绿色植物一致,而除草剂等毒物可阻断光合作用的电子传递链而产生抑制乃至致死效应。目前,有两种类型蓝细菌、藻类传感器:一类是检测毒物对光合作用产物(如O₂和NADPH)生成的影响;正常情况NADPH脱氢酶可使铁氰化钾等还原,毒物由于干扰NADPH的生成继而抑制介质氧化还原过程而被检测,如Preuss等人报道的聚球藻(*Synechococcus*)传感器。同时,毒物对O₂生成的抑制效应也可被氧电极检测,如Campanella等人报道的盐泽螺旋藻(*Spirulina subsalsa*)传感器。第二类是检测毒物对叶绿素荧光发生强度的影响,毒物通过阻断光合作用的电子传递链导致叶绿素的荧光强度增高,增加的幅度与污染物浓度相关。Naessens等人依据类似原理构建了栅藻(*Scenedesmus subspicatus*)传感器,激发光和荧光均通过光纤传导。上述两类传感器

PCR技术(Polymerase Chain Reaction)即聚合酶链式反应,是在体外合成特异性DNA片段的方法。其原理类似于生物体内DNA的复制。只要在试管内提供DNA体外复制所需的原料(DNA聚合酶、模板核酸、寡核苷酸引物、四种三磷酸脱氧核苷酸),在合适的反应条件下(缓冲体系、 Mg^{2+} 、变性、复性、延伸的温度与时间及循环数),就可以进行了。反应的基本过程是:首先加热,使持扩增模板DNA变性,解链为单链DNA,然后在复性温度下,一对引物分别与模板DNA的两条单链的两翼序列特异复性。此时,两引物的3'端相对,5'端相背。当反应温度降至延伸温度时,由DNA聚合酶催化引物引导的DNA合成,即引物的延伸。整个过程是由温度控制。这种热变性-复性-延伸的过程就是一个PCR循环。PCR就是在合适条件下,这种循环的不断重复。由于前一轮反应中新合成的DNA又可作为下一轮反应的模板,所以,从理论上讲,扩增DNA的产量是呈指数上升的,即n个循环后产量为 2^n 个拷贝;而扩增产物的特异性是由两个引物序列决定的。所谓引物就是与DNA片段两翼互补的寡核苷酸,其本质是ssDNA片段。

DNA损伤是评价污染物遗传毒性的一个很重要的生物指标,PCR技术可以更快的测出这些突变或损伤,所以PCR技术的应用提高了在分子水平上分析DNA突变的速度,一般说来应用PCR技术检测环境中的生物污染(病原菌、病毒及其他一些有害生物)。

检测过程主要包括以下几个步骤:环境样品中模板核酸的提取、环境样品核酸的PCR扩增靶序列、PCR扩增产物的检测与分析。Niedrhauser利用PCR技术检测了食品中易导致人类

片技术能够初步筛选出甲基汞对大鼠脑基因表达影响的相关基因。Fritzsche用纳米金标记DNA—芯片检测环境中的污染物，芯片耐用、可靠、具备更好的稳定性和专一性，而且转化为光学信号时受环境影响较小、易操作。此外，Rudolph报道了一种新颖的可提供潜在的、高通量信息的细胞芯片和组织芯片，与基因芯片和蛋白质芯片相比，可以提供更多的、复杂的应答信息，为应用于环境检测提供了可能。下面将详细介绍基因芯片。

基因芯片(gene chips)，又称DNA芯片(DNA chips)，属于生物芯片(biochip)中的一种，是综合微电子学、物理学、化学及生物学等高新技术，把大量基因探针或基因片段按特定的排列方式固定在硅片、玻璃、塑料或尼龙膜等载体上，形成致密、有序的DNA分子点阵；因固相载体常用硅玻片或硅芯片，故称之为基因芯片。基因芯片技术的原理是分子生物学中成熟的核酸分子原位杂交技术，即DNA的碱基配对和序列互补原理其关键是将寡核苷酸或短肽固定在固相支持物上。应用DNA芯片可以对与环境影响相关的200多个基因进行全面监测。

尽管基因芯片在医学领域等已经有了大量的研究报道，但是应用于环境微生物研究还处于起步阶段。美国橡树岭国家实验室的Jizhong Zhou等分别构建了世界上第一块用于土壤环境检测的功能基因芯片和用于微生物群落鉴定的群落基因组芯片。

基因表达分析可以用于了解微生物在环境中的功能活动。mRNA是转录基因表达的中间产物，基因芯片可以通过对mRNA的检测来分析基因的表达情况。研究者用基因芯片对

酶是否受抑制以及抑制的程度，以此来判断检测环境污染物是否存在以及含量的多少。

酶免疫测定技术是生物酶技术、免疫技术应用于环境检测领域的一门新技术，主要依据抗原和抗体之目的特异性反应来进行。

速测试纸条技术是20世纪90年代以来在单克隆技术、胶体金免疫层析技术和新材料基础上发展起来的一项新型速测技术。将特异性的抗原(或抗体)以条带状固定于硝酸纤维素膜，将胶体金标记试剂吸附到结合垫上，当待测样品加到试纸条一端的样品垫后，通过毛细作用向前移动，溶解固化在结合垫上的胶体金标记试剂后相互反应，再移动至固定的抗原(或抗体)的区域时，待测物和金标试剂的复合物又与之发生特异性结合而被截留，聚集在检测带上，通过可目测的胶体金标记物得到直观的显色结果，目前，该技术在医学检测和毒品检测中已得到广泛应用。

3 发展前景预测：

迄今为止，现代生物技术用于环境检测，由于受到生物材料和方法本身的限制，都存在一定的局限性。如生物酶抑制技术保证了对污染物检测的特异性和敏感性，实现了在线单份样本检测，但必须要求开发廉价的酶源，并有待进一步提高酶的固化技术；酶免疫测定技术的灵敏度相对其他方法较高，但对温度的依赖性强，不便于在线检测；金标试纸条的开发解

5 参考文献

- [1] 张于光, 李迪强, 等. 基因芯片及其在环境微生物研究中的应用[A]. 微生物学报, 2004, 44 (3): 406 - 410 .
- [2] 黄正, 任恕. 微生物传感器在污染物生物毒性分析中的应用. 传感器技术(Journal of Transducer Technology), 2004, 23 (9): 4—6 .
- [3] 朱江, 陆贻通. 现代生物技术在环境检测中的应用. 上海环境科学, 2003, 22 (10): 717—721 .
- [4] 林秀菊. PCR 技术基本原理及其在环境污染监测中的应用. 福建环境, 2000, 17(1): 36—39 .
- [5] 刘春龙, 李忠秋, 等. 生物芯片技术应用及其趋势展望. 农机化研究, 2003, (4): 13—16 .
- [6] 刘彦华. 生物芯片技术及其应用前景[J]. 中华医学检验杂志, 2002, (5): 17—19 .
- [7] 李英丽. 生物芯片及其应用[J]. 标记免疫分析与临床, 2002, (2): 6—8 .
- [8] 谢晓东, 蒋蓉芳, 宋伟民. 蝎形引物 FCR 快速检测环境水样中沙门菌方法研究. 环境与职业医学, 2003, 4 (2): 115-120 .

- [24] Dennis P , Edwards E A , Liss S N . Monitoring gene expression in mixed microbial communities by using DNA microarrays . *Appl Environ Microbiol* , 2003 , 69 (2) : 769—778
- [25] Belkin S . Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants[J] . *Curr Opin Microbiol* , 2003 , 6 : 206—212 .
- [26] Inui T , Tanaka Y , Okayas Y , et al . Application of toxicity monitor using nitrifying bacteria biosensor to sewerage systems[J] . *Water Sci Technol* , 2002 , 45(11—12) : 271 — 278 .
- [27] 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—3495 .
- [28] Shao C Y , Howe C J , Porter A J R , et al . Novel Cyanobacterial Biosensor for Detection of Herbicides *Applied and Environmental Microbiology* 2002 , 68(10) : 5026—5033 .
- [29] Rudolph , Alan S , Reasor , et al . Cell and tissue based technologies for environmental detection and medical diagnostics . *Biosensors and Bioelectronics* , 2001 , 16(7—8) : 429—431 .