

前 言

环境科学是一门综合性很强的大学科,涉及社会科学、自然科学和技术科学等广泛领域。在环境问题成为全球性重大问题时,微生物学工作者运用微生物学的理论和方法,来认识环境问题的实质并探寻解决环境问题的有效途径,于20世纪60年代末建立了环境微生物学这门新兴的边缘学科。至今,环境微生物学已渗透到环境科学的众多领域,成为认识 and 解决环境问题的锐利武器。了解和掌握环境微生物学的理论、方法和技术,将使环境工作者终生受益。

有关环境微生物学的专著和教材,国内外尚无统一的体系和结构。本书编者取各家所长,结合自己的教学与科研,对现有的环境微生物学成果进行了认真的筛选,编写了这本《环境微生物学》教材,以满足环境类专业本科生的教学之需。环境类专业通常不单独开设普通微生物学课,为了弥补这一不足,本书前八章介绍微生物学的基础知识。第九章介绍微生物对环境的污染与危害,包括病原微生物、水体富营养化以及代谢产物对环境的污染与危害,引进了微生物的风险评价。第十章介绍污染环境的微生物净化与修复,阐述了环境自净和生物修复的微生物学原理。第十一章介绍废水生物处理的微生物学原理,重点讨论微生物在有机废水好氧与厌氧生物处理以及生物脱氮除磷中的种种作用。第十二章介绍环境监测中的微生物学方法。

本书由郑平(第一、二、七、八章)、徐向阳(第十、十一章)、胡宝兰(第三、四、五、六章)、钟文辉(第九、十二章)编写,郑平负责统稿。俞秀娥副教授认真地审阅了教材的全稿,浙江大学教务部和浙江大学出版社对本教材的出版给予了热心的支持,在此深表感谢。由于编者的水平及时间有限,教材中疏漏和不足在所难免,恳请有关专家、老师、同学以及其他读者批评指正。

郑 平

2001年8月

目 录

第一章 绪论	(1)
第一节 微生物与微生物学	(1)
一、微生物	(1)
二、微生物学	(3)
第二节 环境科学与环境微生物学	(3)
一、环境与环境科学	(3)
二、环境微生物学	(4)
复习思考题	(6)
第二章 微生物的起源与进化	(7)
第一节 微生物的起源与化学进化	(7)
一、Oparin-Haldane 生命起源假说	(7)
二、生命起源假说的实验证据	(7)
第二节 微生物细胞的进化	(8)
第三节 微生物细胞器的进化	(9)
第四节 微生物生理的进化	(10)
第五节 微生物进化的遗传基础	(11)
第六节 大地女神假说	(12)
复习思考题	(13)
第三章 微生物的主要类群(I)	(14)
第一节 病毒	(14)
一、病毒的一般特征与分类	(14)
二、病毒的化学组成和结构	(15)
三、噬菌体	(16)
四、亚病毒	(19)
第二节 原核微生物	(20)
一、细菌	(20)
二、放线菌	(29)
三、蓝细菌	(32)
四、古菌	(33)
复习思考题	(34)

第四章 微生物的主要类群(I)	(35)
第一节 真菌	(35)
一、真菌的细胞结构	(35)
二、真菌的菌丝和菌丝体	(36)
三、真菌的繁殖	(37)
四、真菌的菌落特征	(38)
五、真菌的分类	(39)
第二节 藻类	(46)
一、藻类的形态与构造	(46)
二、藻类的生理特征	(46)
三、藻类的分类	(47)
第三节 原生动物	(50)
一、原生动物的形态与构造	(50)
二、原生动物的营养与繁殖	(51)
三、原生动物的分类	(51)
第四节 微型后生动物	(55)
一、轮虫	(55)
二、线虫	(56)
三、颤体虫	(56)
复习思考题	(57)
第五章 微生物的营养与代谢	(58)
第一节 微生物的营养物质	(58)
一、能源	(58)
二、碳源	(58)
三、氮源	(59)
四、无机盐	(59)
五、生长因子	(60)
六、水	(60)
第二节 微生物的营养类型	(60)
一、光能自养型	(60)
二、光能异养型	(60)
三、化能自养型	(61)
四、化能异养型	(61)
第三节 微生物的营养吸收	(61)
一、简单扩散	(61)
二、促进扩散	(61)
三、主动运输	(62)
四、基团转位	(62)

第四节	培养基	(63)
一、	配制培养基的原则	(63)
二、	培养基的种类	(63)
第五节	微生物的能量代谢	(64)
一、	呼吸	(64)
二、	厌氧呼吸	(65)
三、	发酵	(65)
第六节	微生物的物质代谢	(66)
一、	糖酵解途径	(66)
二、	三羧酸循环	(66)
第七节	微生物的代谢调控	(68)
一、	酶活性的调节	(69)
二、	酶合成的调节	(70)
复习思考题	(73)
第六章	微生物的生长繁殖与遗传变异	(74)
第一节	微生物生长的测定	(74)
一、	总菌数的测定	(74)
二、	活菌数的测定	(75)
三、	霉菌生长的测定	(75)
四、	生长量的测定	(76)
第二节	微生物的生长	(76)
一、	分批培养	(76)
二、	连续培养	(79)
三、	好氧培养	(81)
四、	厌氧培养	(83)
第三节	微生物的遗传	(84)
一、	DNA 与基因	(85)
二、	DNA 的复制	(85)
三、	RNA 的合成	(86)
四、	蛋白质的合成	(87)
第四节	微生物的变异	(87)
一、	非遗传型变异	(87)
二、	遗传型变异	(87)
三、	原核微生物的基因重组	(88)
四、	真核微生物的基因重组	(89)
复习思考题	(89)
第七章	微生物的生态	(90)
第一节	非生物因素对微生物的影响	(90)

一、最小因子定律和耐受性定律	(90)
二、温度	(90)
三、酸碱度	(93)
四、水的可给性	(93)
五、氧气	(94)
第二节 种群内微生物的相互作用	(96)
一、阿利规律	(96)
二、正相互作用	(96)
三、负相互作用	(97)
第三节 种群间微生物的相互作用	(97)
一、中立	(97)
二、栖生	(98)
三、互生	(98)
四、共生	(99)
五、竞争	(99)
六、偏生	(100)
七、捕食	(100)
八、寄生	(100)
第四节 微生物群落的形成与发展	(101)
一、r 对策和 K 对策	(101)
二、群落的形成与演替	(101)
三、群落结构	(102)
第五节 微生物的生态系统	(102)
一、生态系统的组成	(102)
二、食物链与营养级	(103)
三、生态系统的能流与物流	(103)
复习思考题	(103)

第八章 微生物与生物地球化学循环	(104)
第一节 碳素循环	(104)
一、概述	(104)
二、有机物质分解的一般途径	(105)
三、纤维素的分解	(106)
四、半纤维素和其他糖类化合物的分解	(107)
五、脂肪的分解	(108)
第二节 氮素循环	(108)
一、概述	(108)
二、生物固氮	(109)
三、氨的同化	(111)
四、氨化作用	(111)

五、硝化作用	(112)
六、硝酸盐还原作用	(114)
第三节 硫素循环	(115)
一、概述	(115)
二、硫的同化	(116)
三、脱硫作用	(116)
四、硫化作用	(116)
五、硫酸盐还原作用	(117)
第四节 磷素循环	(118)
一、概述	(118)
二、磷的同化	(118)
三、有机磷化物的分解	(119)
四、难溶磷化物的溶解	(119)
五、磷酸盐的还原	(120)
复习思考题	(120)
第九章 微生物对环境的污染与危害	(121)
第一节 环境中病原微生物的传播与危害	(121)
一、大气微生物污染	(121)
二、水体微生物污染	(122)
三、土壤微生物污染	(123)
第二节 水体富营养化	(124)
一、水体富营养化的概念	(124)
二、富营养化水体中的主要生物种群	(124)
三、水体富营养化的形成和影响因素	(125)
四、水体富营养化的评价	(126)
五、水体富营养化的危害	(126)
六、水体富营养化的防治	(127)
第三节 微生物代谢产物的污染	(127)
一、生物毒素	(127)
二、气味代谢物	(129)
三、酸性矿水	(130)
四、甲基汞	(130)
第四节 微生物的风险评价	(131)
一、风险与风险评价的概念	(131)
二、风险评价的基本内容	(131)
三、微生物的风险评价	(132)
复习思考题	(135)
第十章 污染环境的微生物净化与修复	(136)

第一节 有机污染物的微生物降解与转化	(136)
一、微生物降解的潜力	(136)
二、工程菌的构建	(137)
三、有机污染物的可生物降解性	(139)
四、几种典型有机污染物的微生物降解	(141)
第二节 污染环境的自净作用	(146)
一、污染水体的自净	(146)
二、污染土壤的自净	(147)
第三节 污染环境的生物修复	(149)
一、生物修复概述	(149)
二、生物修复的技术要点	(150)
三、生物修复工艺	(152)
复习思考题	(154)
第十一章 废水生物处理的微生物学原理	(155)
第一节 废水生物处理的作用与类型	(155)
一、废水生物处理的作用	(155)
二、废水生物处理的类型	(156)
第二节 废水好氧生物处理的微生物学原理	(157)
一、好氧活性污泥法	(157)
二、好氧生物膜法	(161)
第三节 废水厌氧生物处理的微生物学原理	(163)
一、厌氧生物处理的工艺条件	(164)
二、厌氧生物处理的特点	(164)
三、厌氧生物处理的发展	(164)
四、UASB 反应器	(165)
第四节 废水生物脱氮的微生物学原理	(167)
一、硝化作用	(168)
二、反硝化作用	(168)
三、废水生物脱氮工艺	(169)
四、A/O 生物脱氮工艺	(170)
第五节 废水生物除磷的微生物学原理	(170)
一、聚磷细菌及其过度摄磷作用	(170)
二、废水生物除磷工艺	(171)
复习思考题	(172)
第十二章 环境监测中的微生物学方法	(173)
第一节 水质的细菌学检测	(173)
一、细菌总数	(173)
二、腐生细菌数	(173)

三、粪便污染的指示菌	(174)
第二节 空气的细菌学检测	(176)
一、空气中细菌的检测方法	(176)
二、空气中细菌的总数指标	(177)
第三节 污染物毒性的细菌学检测	(177)
一、污染物毒性检测(发光细菌检测法)	(177)
二、污染物致突变性检测(Ames 试验法)	(177)
第四节 应用 PCR 技术检测环境微生物	(178)
一、PCR 技术	(178)
二、应用 PCR 技术检测致病菌	(180)
三、应用 PCR 技术检测基因工程菌	(180)
复习思考题	(181)
参考文献	(182)

第一章 绪 论

第一节 微生物与微生物学

一、微生物

(一) 微生物的定义

微生物(microorganism)不是分类学上的名词,它是一切肉眼看不见的或看不清楚的微小生物的总称。微生物包括非细胞型微生物和细胞型微生物,后者又包括原核型微生物和真核微生物。微生物种类繁多,形态各异,营养类型庞杂,但都表现为简单、低等的生命形态;在研究方法上,所采用的技术和设备也大致相同。微生物的主要类群如图 1-1 所示。

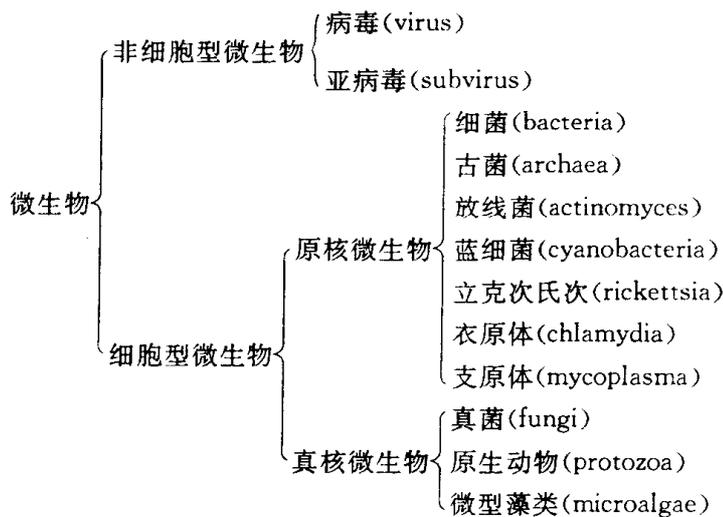


图 1-1 微生物的主要类群

(二) 微生物的特点

1. 个体微小、结构简单 微生物形体微小,必须借助于显微镜,甚至用电子显微镜把它们放大几十万倍才能看到。

测量微生物需用测微尺,细菌以微米(μm)为计量单位;病毒比细菌还小,用纳米(nm)为计量单位。在微生物世界,个体最小的是类病毒和朊病毒,它们大约是病毒大小的 1/100。

微生物结构简单,多数是单细胞生物,一个细胞就是一个生物个体。病毒没有细胞结构,由核酸和蛋白质组成;类病毒仅由核酸组成;朊病毒仅由蛋白质组成。

2. 代谢活跃、类型多样 微生物代谢活跃。由于个体小,相应的比表面积很大,能迅速地从环境中吸取各种营养物质,排出大量代谢产物。例如,乳酸杆菌每小时可产生相当于其体重 1 千至 1 万倍的代谢产物——乳酸。

微生物代谢类型多样,具体表现为:① 基质广泛。既能利用二氧化碳,也能利用各种有机物质作为碳源。② 能源谱宽。既能利用太阳能,也能利用各种化学能作为能源。③ 适应性强。既可在有氧环境下生长,也可在无氧环境下生长。④ 代谢产物多样。既可产生无机产物,也可产生有机产物;既可产生小分子有机产物,也可以产生大分子有机产物。

3. 繁殖迅速、容易变异 微生物具有极高的繁殖速度。在生长旺盛时,有些细菌每 20 分钟就能增殖一代,24 小时可增殖 72 代。如果没有其他条件限制,经过一昼夜 1 个细菌就可增至 4 万亿亿个。

微生物对环境条件敏感,容易发生变异。在外界条件出现剧烈变化时,多数个体死亡,少数个体可发生变异而适应新的环境。

4. 抗逆性强、休眠期长 微生物具有很强的抗逆性。例如,高温菌可在 265 个大气压(26.8 MPa)和 300℃ 的高压高温条件下生长;嗜酸菌可在 pH 0.5 的强酸性条件下生长;嗜盐菌则可在盐含量高达 23%~25% 的“死海”中生活。

在不利条件下,微生物容易进入休眠状态,有些种类可形成特殊的休眠体(如芽孢和分生孢子)。这些休眠体的休眠期很长。据报道,在休眠几百年甚至上千年后,有些芽孢仍有活力。

5. 种类繁多、数量巨大 如前所述,微生物种类繁多,包括细菌、古菌、放线菌、真菌、藻类和原生动物等类群。每一类群又由相当可观的种组成,现已发现的真菌有 10 万多种,细菌达 2000 多种,放线菌 1500 多种。

微生物数量巨大。在温度和湿度适宜、营养丰富的土壤耕作层中,每克土壤的微生物含量高达数亿个。

6. 分布广泛、分类界级宽 微生物分布广泛。在自然界,不论是土壤、水体和空气,还是植物、动物和人体的内部或表面,都存在大量微生物。上至 8 万多米的高空,下至 3 千多米的油井,冷至南北极地,热至几百度的深海火山口内,都有微生物的踪迹,真可谓无孔不入,无所不在。

微生物的分类界级很宽。在反映生物系统发育的六界(动物界、植物界、真菌界、原生生物界、原核生物界和病毒界)分类系统中,微生物包括了除动物界和植物界以外的其他四界。

(三)微生物的分类和命名

1. 微生物的分类 目前所知的微生物已超过 10 万种,而且,新种还在不断地被发现。为了识别和研究微生物,通常根据它们的生物学特性以及彼此之间的亲缘关系,将它们安排成一个条理清楚分类系统。

从大到小,这个分类系统的各级分类单位是界(kingdom)、门(phylum)、纲(class)、目(order)、科(family)、属(genus)、种(species)。其中,种是分类的基本单位。在两个分类单位之间,常加进次要分类单位,如亚门、亚纲、亚科、亚属、亚种、变种。

除上所述,人们还常用一些非分类学单位,如采用类群(group)和菌株(strain)来表示微生物在分类系统中的地位。类群是非正式地指定一组具有某些共同性状的微生物。菌株则表示任何一个独立分离的单细胞(或单个病毒粒子)繁殖而成的纯种群体及其后代。

2. 微生物的命名 每种微生物都有自己的名称,名称有俗名(common name)和学名(scientific name)两种。俗名指普通的、通俗的、地区性的名称,具有简明和大众化的优点;但往往涵义不确切,易于重复,使用范围受到限制。例如,俗名“绿脓杆菌”指的是“铜绿假单胞菌”(Pseudomonas aeruginosa)。

学名是一个菌种的科学名称,它是按照国际学术界的通用规则命名的。学名采用拉丁词或

拉丁化的词构成。在出版物中,学名应排成斜体(在书写或打字时,在学名之下应划一横线,以表示它是斜体)。根据双名法规则,学名通常由一个属名(第一个字母大写)加一个种名(第一个字母小写)构成。出现在分类学文献上的学名,在双名之后往往加上首次定名人(放在括号内)、现名定名人和现名定名年份。即

$$\text{学名} = \underbrace{\text{属名} + \text{种名}}_{\text{必要(斜体)}} + \underbrace{(\text{首次定名人}) + \text{现名定名人} + \text{现名定名年份}}_{\text{可省略(正体)}}$$

例如大肠埃希氏菌(简称大肠杆菌)的学名为 *Escherichia coli* (Migula) Castellani et Chalmers 1919。

在少数情况下,当某菌株为一个亚种[subspecies, 简写 subsp. (正体)]或变种[variety, 简写 var. (正体)]时,学名应按“三名法”构成。即

$$\text{学名} = \underbrace{\text{属名} + \text{种名}}_{\text{必要(斜体)}} + \underbrace{(\text{subsp. 或 var.})}_{\text{可省略(正体)}} + \underbrace{\text{亚种或变种名}}_{\text{必要(斜体)}}$$

例如苏云金芽孢杆菌蜡螟亚种的学名为 *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleria*。

二、微生物学

微生物学是在分子、细胞或群体水平上研究微生物的形态构造、生理代谢、遗传变异、生态分布和分类进化等生命活动的基本规律,并将其应用于工业发酵、农业生产、医学卫生和生物工程等领域的科学。

微生物学的根本任务是发掘、利用或改善有益微生物,控制、消灭或改造有害微生物。

经过长期的发展,微生物学涌现了许多分支学科。依据研究的生命现象,可将微生物学划分为微生物形态学、微生物分类学、微生物生理学、微生物生物化学以及微生物遗传学等。依据微生物的生态环境,则可将微生物学划分为土壤微生物学、水体微生物学、海洋微生物学、环境微生物学和宇宙微生物学等。按照不同的标准,还可将微生物学划分为多个其他分支学科。环境微生物学是微生物学的重要分支学科之一。

第二节 环境科学与环境微生物学

一、环境与环境科学

从词意上说,“环境”泛指某一中心项(或叫主体)周围的空间及其空间中存在的事物。

不同学科对“环境”这一概念有不同的理解和认识。环境科学中的“环境”是指以人类为主体的外部世界,即人类赖以生存和发展的物质条件的综合体。人类环境包括自然环境和社会环境。按组成要素,可把整个自然环境(地球环境)区分为大气环境、水体环境、土壤环境和生态环境。有时形象地称它们为大气圈、水圈、岩石圈和居于三圈交界面上的生物圈。

大气、水体、土壤和生物圈都是地球长期演化形成的,具有特定的组成、结构和运行规律。这些性质构成了环境的质量要素。环境质量是环境对人类生存和发展适宜程度的标志,环境问题实质上是环境质量的变化问题。人类是环境的产物,必须依赖自然环境而生存和发展;同时人类又是环境的改造者,通过社会性生产活动来利用和改造环境,使其更适合人类的生存和发展。然而,人类活动也可使环境发生不利于人类的变化,影响人类的生产和生活,给人类带来灾难。在解决各种环境问题的过程中,环境科学应运而生。

环境科学是研究人类与环境之间相互关系的科学。在宏观上研究人类社会经济发展与环境之间的相互作用和影响;在微观上研究环境中的物质,尤其是污染物质在生物体内的迁移、转化和蓄积规律。重点研究与人们健康直接相关的生活环境和生产环境,因污染所致环境质量变化规律及其综合整治技术与方法。

环境科学综合性很强,涉及社会科学、自然科学和技术科学。仅依据所涉及的学科,即可将环境科学划分为多个分支学科,如环境社会学、环境法学、环境管理学、环境经济学、环境地理学、环境地质学、环境物理学、环境化学、环境生物学、环境医学、环境毒理学、环境工程学等。按不同标准,还可划分出众多其他分支学科。环境微生物学作为环境生物学的重要组成部分,在环境科学中扮演着极其重要的角色。

二、环境微生物学

(一)环境微生物学的定义

如上所述,环境微生物学不仅是微生物学的一个分支,同时也是环境科学的一个分支。它是微生物学与环境科学相互渗透而产生的一门新兴的边缘学科。若下一个定义,可表述为:环境微生物学是研究微生物与环境之间的相互关系和作用规律,并将其应用于污染防治的科学。通俗地说,环境微生物学就是要利用微生物学的理论、方法和技术来探讨环境现象,解决环境问题。

虽然环境微生物学原理的应用可追溯到19世纪末城市污水生物处理的实践,但作为一门独立的学科,环境微生物学的发展历史并不长。20世纪60年代末,美国将《应用微生物学》杂志更名为《应用与环境微生物学》,可作为环境微生物学从其母体学科(微生物学)脱颖而出的标志。20世纪70年代以后,环境微生物学得到了飞速的发展。

环境微生物学之所以能在短期内异军突起并备受关注,主要是因为:①随着工农业生产的发展和人民生活水平的提高,污染物的种类和数量迅猛增加,给人类环境带来了巨大的冲击,而这些污染物的降解和转化主要依靠微生物的作用。②微生物中的病原菌、微生物生长所致的水体富营养化以及微生物转化形成的毒性产物,给人类环境带来了不少危害,迫切需要深入研究并加以有效控制。③分子生物学技术的发展一日千里,为检测和分析环境微生物创建了很好的工作平台,有力推动了环境微生物学的研究。

(二)环境微生物学的研究内容

明确研究内容,有助于加深对环境微生物学的理解。根据本书编者的体会,环境微生物学应当包含如下内容。

1. 自然环境中的微生物背景 自然环境(大气、水体、土壤和生物圈)中的微生物背景状况,是环境微生物学研究的基础和出发点。地球上的一切生物都是在特定的环境中产生和发展的,经过长期的相互作用和相互适应,生物与环境间形成了和谐的关系。自然环境中的微生物背景,反映了微生物与环境间的动态平衡,因此可作为环境质量变化的基准。一些学者将这部分研究内容纳入“自然环境中的微生物生态学”,主要研究自然环境与微生物种群间的相互关系,以及微生物在生物地球化学循环中的各种作用。环境微生物学与微生物生态学的差别在于它们的研究目的不同。微生物生态学研究微生物之间以及微生物与微生物环境(以微生物为主体的外部世界,把人类看成环境的组成部分)之间的相互关系和相互作用,着重考虑微生物环境对微生物及其活动的影响;而环境微生物学则着重考虑微生物及其活动,通过改变人类环境(以人类为主体的外部世界,把微生物看成环境的组成部分)对人类生活和生产的影响。

2. 微生物对环境的污染与危害 微生物污染是指有害微生物(如病原菌)污染水体、大气、土壤和食品,影响生物产量和质量,危害人类健康的现象。水体、大气、土壤和食品中的有害微生物主要来源于生活污水、医院污水、屠宰污水、食品加工污水、未经无害化处理的垃圾和人畜粪便,以及大气中的飘浮物和气溶胶。这些有害微生物对人类和生物的危害程度主要取决于微生物的病原性、人类和生物的感受性以及环境条件三个因素。1993年,美国密尔沃基市发生了原生动物(隐孢子虫,*Cryptosporidium*)所致的水介疾病的暴发流行,造成40多万人得病,100多人死亡。事后调查发现,这种致病菌竟然存在于经消毒处理的饮用水中。更令人担忧的是,最近研究发现有10%~50%的水介痢疾是由目前无法确认的致病菌引起的。饮用水中频繁检出新的病原菌,已引起公众的严重不安。

有害微生物污染食品,可产生毒素,使人食后中毒。例如,黄曲霉污染粮食(如玉米、花生、大豆、稻米、小麦、高粱、小米等),极易产生食物中毒。黄曲霉污染饲料,则可使鱼和哺乳动物诱发原发性肝癌。常见的污染食品并产生毒素的有害微生物有肉毒梭菌和葡萄球菌,诱发胃肠道急性炎症的致病菌有肠炎沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌和猪霍乱沙门氏菌等。

污染源释放的营养物质(如氮、磷等)大量进入湖泊、河口、海湾等缓流水体,可引起藻类和浮游生物迅速繁殖,造成水体富营养化,导致环境质量的下降。这也是微生物污染的一种现象。

此外,微生物的转化作用可提高某些污染物的毒性。例如,在1953年日本发生的水俣病事件中,氮肥厂将含汞废水排入水体,无机汞在受纳水体的底泥中富集,通过微生物的作用,转化为毒性更大的甲基汞,甲基汞被鱼吸收后,当地居民因食用被甲基汞污染的鱼而患病,患者达数百人,死者达几十人。

研究有害微生物在环境中的生存方式和危害途径,并提出行之有效的防治措施,是环境微生物学的重要内容。

3. 微生物对“污染环境”的净化与修复 在生活和生产活动中,人类向环境排放大量含污染物的废水、废气和废渣,造成空气、水体、土壤的严重污染和生态环境的破坏,直接威胁着人类的健康和生物的安全。人们所熟知的1968年发生的日本米糠油事件,因多氯联苯(PCB)污染米糠油,致使1万多人受害,16人死亡。据估计,全世界已生产的和应用中的PCB超过100万吨,其中1/4至1/3进入人类环境,造成危害。多氯联苯之类有害污染物质进入环境,可对环境中微生物的种类、数量和活性产生重大影响。

反之,微生物对污染物也具有强大的适应和降解潜力。生物降解是指土壤、水体和废水处理系统中的微生物对天然的和合成的有机物的破坏或矿化作用。污染物的可生物降解性是评判其污染性质和程度的重要指标。有些污染物能够在较短的时间内通过微生物降解成为无害物质,对环境质量的影响较小;另一些污染物则难以被微生物降解,在环境中具有持久性,对人类和生物危害极大。

生物净化是指生物类群通过代谢作用(异化作用和同化作用)使环境中污染物的数量减少,浓度下降,毒性减轻,直至消失的过程。水体、空气和土壤的污染,只要不超过生态系统的负载能力,污染物就可以通过物理的、化学的和生物的作用得到净化,其中微生物起着十分重要的作用。随着人类社会的进步和生产力的发展,微生物净化的功能将在更大的规模上得到利用,并将发展成环境生物工程的重要组成部分。

由于多种原因,许多土壤、地面水、地下水遭受了有机物和无机物的污染,要净化这些“污染环境”,需投入巨大的资金。仅美国,用于清理和净化“污染环境”的费用就高达1万多亿美元。与传统的理化法修复相比,生物净化(修复)具有明显的经济优势。1989年,美国发生了有

史以来最为严重的油轮泄漏事故,Exxon Valdez 号油轮在威廉王子海湾泄漏原油 1100 万加仑。生物修复使该被原油污染的海湾得到逐渐净化。这是生物修复技术首次在净化“污染环境”上的大规模应用,意义深远。

生物净化现象在陆地、淡水和海洋生态系统中普遍存在,但净化能力有一定限度。环境微生物学的重要任务之一就是要了解和掌握自然界生物净化的基本规律,并加以人工控制,以强化微生物的净化功能。

4. 微生物在污染控制工程中的应用 环境微生物学的研究,实际上是从水处理微生物学的研究和应用开始的。早在 19 世纪,人们就对水介病原菌进行研究,并通过过滤和消毒等措施,大大降低了伤寒和霍乱的发病率。至今,由水体自净过程发展而来的废水生物处理,已在环境工程上广泛应用。对各种污水生物处理系统(人工环境)中的微生物状况的研究,不仅为污水生物处理技术的改进和提高打下了基础,也有力地推动了整个环境微生物学的发展。其中,对好氧活性污泥的研究和对厌氧颗粒污泥的研究,在废水生物处理上产生了重大的影响。随着人们环境保护意识的增强,在有机物达标排放的前提下,对脱氮除磷和微量有毒物质的处理也提出了更高的要求,迫切需要环境微生物学工作者加倍努力:① 针对特定的污染物,寻找和筛选高效的微生物菌群;② 采用现代基因工程技术将多种有益的特性基因重组成具有多功能、高降解能力的“超级菌株”;③ 探讨污染物与生物降解的关系,推动节能、高效、新型的生物处理技术的开发。

5. 微生物在环境监测与评价中的应用 一些微生物种群对环境质量变化或污染物的性状具有指标作用,可作为环境监测的指标和手段。微生物监测是利用微生物个体、种群或群落对环境污染或环境变化所产生的反应,阐明环境污染状况,从微生物学角度为环境质量的监测和评价提供依据。微生物评价,则是用微生物学方法评价环境质量的现状及其变化趋势。各种生物对环境因素的变化都有一定的适应范围和反应特点。微生物的适应范围越小,反应越典型,对环境因素变化的指示越有意义。

在环境微生物学中,涉及大量原位研究,需要建立新的技术和方法来揭示微生物在自然生境(如土壤和水体)中的行为。以核酸为基础的分子生物学技术,例如 PCR 技术、基因探针技术、基因克隆技术、报告基因技术、DNA 序列分析技术等,为环境微生物学工作者探索自然生境中的微生物秘密,提供了强有力的检测工具。

现代环境微生物学的研究内容远非局限于上述方面,它还包括众多其他方面,例如废物的资源化利用[如生产酒精、单细胞蛋白和能源(氢气和沼气)],微生物冶金,以及发掘具有环保、保健等商业价值的新的微生物资源和新的微生物产品等。

复习思考题

1. 何谓微生物? 微生物主要包括哪些类群?
2. 微生物有哪些特点?
3. 微生物的分类单位有哪些? 什么是基本分类单位?
4. 微生物是如何命名的? 举例说明。
5. 何谓环境、环境科学、环境微生物学?
6. 环境微生物学的主要研究内容有哪些?

第二章 微生物的起源与进化

根据放射性同位素计时技术测定,地球年龄大约已有 45 亿年。通过对古化石的考证,类似细菌的生物大约出现在 35 亿年前。可见,微生物与地球相伴度过了漫长的历史过程。

生物是地球演化的产物,它们依靠地球而生存和发展;生物也是地球的改造者,通过种种活动来改造地球,使其更适合自己的生存和发展。有人认为,生物之所以能够在地球上发生和发展,是因为地球的环境优于其他星球。但有证据表明,许多有利于生物生存和发展的条件并不存在于生物发生之前,而是形成于生物出现之后。对于现有地球环境的形成和维持,作为生物的先鋒,微生物作出了不可磨灭的巨大贡献。

第一节 微生物的起源与化学进化

一、Oparin-Haldane 生命起源假说

原始地球呈熔化状态。物质从熔化状态冷却,逐渐形成由地核、地幔和地壳构成的地球。地球冷却时,二氧化碳、甲烷、氨、氮气、氢气、硫化氢、水蒸气等气体被挤压出地壳表面,形成地球周围的大气圈。水蒸气的冷凝还形成了地壳表层的水圈。地壳表面的水圈和大气圈与生命的起源密切相关。

据考证,生命起源以前,地球经历了大约 10 亿年的演变过程。当时的地球究竟是什么样的?生命又是怎样在地球上产生的?对于这两个问题,目前普遍接受俄罗斯科学家 Oparin 和英国科学家 Haldane 于 1925 年和 1930 年独立提出的生命起源假说。根据 Oparin-Haldane 生命起源假说,生命出现之前,地球周围的大气圈处于厌氧状态;由于原始大气中不存在氧气,没有臭氧层的遮护作用,太阳辐射中的紫外线直入地表;地表温度的昼夜、季节和区域性变化都远远大于现在。然而就是在如此恶劣的环境中,地球表面开始了生命的化学进化。通过各种能量(如太阳能、地热能、雷电能、放射性同位素衰变能等)的作用,小分子无机物质被转化成小分子有机物质,再由小分子有机物质聚合成大分子有机物质。其中,一些大分子有机物质具有原始催化活性,由此演变形成酶;另一些大分子有机物质具有聚集形成细胞膜状界面的趋势,可将液态物质包围在内,由此演变产生细胞。历经数百万年,化学进化最终导致了原始生命的诞生。

二、生命起源假说的实验证据

在 20 世纪 50 年代,Oparin-Haldane 生命起源假说得到了实验证据的支持。Miller 和 Urey 等人模拟古地球环境,采用装有水和还原性混合气体的简单设备,通过加热、放电或紫外线照射,产生了许多有机物,其中包括组成生物所必需的氨基酸和核酸碱基。在 Miller 和 Urey 的实验中,首先由甲烷转化成甲醛和氰化氢,接着这些化合物结合产生尿素和甲酸,最后产生

氨基酸(包括甘氨酸、丙氨酸、谷氨酸、缬氨酸、脯氨酸、天冬氨酸),而氨基酸则是生命活动的物质基础——蛋白质的必要成分。

在液态条件下,氨基酸聚合成蛋白质的反应不易进行,因为它需要脱水并吸收能量。若将氨基酸置于悬浮的粘土颗粒表面,这一反应便易于进行。粘土颗粒的主要成分是硅酸盐和氧化铝,既带负电荷也带正电荷,兼有吸附性能和原始催化性能。在这种粘土表面,高能氨基酸(如氨基酰腺苷酸)可聚合成蛋白质状的多肽链。在古地球的还原性大气中,蛋白质和核酸(构成生物的重要物质)的合成可能是以类似的方式进行的。

另外,Fox 发现,在干燥状态下适度加热氨基酸,可自动形成“嗜热类蛋白(thermal proteinoid)”。这种嗜热类蛋白能自发聚集成微球(microsphere)。一些非生物形成的类蛋白和其他多聚物具有原始的催化活性(酶的功能)。在外部化学条件或这些类蛋白的催化作用下,一些类蛋白可用作模板进行自我复制(类似核酸的功能)。

第二节 微生物细胞的进化

除了从事化学进化的理论工作外,Oparin 及其同事还着迷于微球性质的研究。含有两种有机多聚物(例如,阿拉伯树胶和组蛋白)的胶体溶液可自发形成微球。这些微球被 Oparin 称为团聚体(coacervate)。将磷脂放入水中,也可自发形成团聚体,呈双分子层,类似细胞膜。这种团聚体能够吸收外面的液体而生长,并能缢断凸出物而形成新的团聚体,后者很像酵母菌的芽殖。在团聚体的空穴内则可进行化学反应。由此可见,团聚体具有某些细胞的性状:从环境中选择吸收基质,并能生长和分裂。若把酶、电子载体或叶绿体结合至这些团聚体内,还可模拟一些生活细胞的代谢过程、电子传递过程或光能利用过程。但是,这些模拟系统只能证明有机聚合物具有非凡的自我组织能力,并不能证明它们是化学进化产生的细胞的中间形态。

Fox 认为,嗜热类蛋白所形成的微球及其有限的催化能力和自我复制能力,更加接近化学进化产生的细胞的中间形态。在没有核酸时,能够自我复制的蛋白质微球可看成是最原始的细胞(朊病毒就只有蛋白质一种成分)。这些最原始的细胞称为始祖生物(progenote)。

核酸的获得和利用促进了细胞结构与功能的发展。细胞先利用核糖核酸(RNA),后来利用核糖核酸和脱氧核糖核酸(DNA)作为模板合成蛋白质。细胞膜、酶活性和核酸组织在一起,导致了原始原核生物(eugenote)的产生。在地龄大约 35 亿年的沉积岩中,已发现原始原核生物的化石证据。

由于原核生物的形态较简单,再加上地层保存亚细胞结构的困难,有关微生物进化的化石证据很不完整。在某种程度上,进化过程的分子记载可弥补化石证据的不足。假设所有生物都来源于一个共同的祖先,而且这个祖先又含有诸如 RNA、DNA 和蛋白质之类的生物大分子,那么可以认为这些大分子序列相似的生物具有较近的亲缘关系,而大分子序列不同的生物没有亲缘关系。在后一种情况下,生物之间的分异较早,各自独立进化。有人对多种生物的 RNA、DNA 和蛋白质序列作了比较,发现 RNA 序列与生物亲缘关系的相关性最好。根据 16S rRNA 序列,生物学工作者创建了原核生物的进化树。进一步通过 RNA 序列比较,证实真核生物是一类嵌合体(由两种或两种以上不同细胞组成),其中汇合了多条进化路线。

在以 16S rRNA 序列为基础的进化树中,假设始祖生物是所有生物的共同祖先。从始祖生物出发,沿着三条不同的进化路线,分别形成了古菌、真细菌和原始真核生物(图 2-1)。

古菌是比较原始的原核生物,能够在恶劣的古地球环境中生长。古菌进化产生了许多极端

微生物,如产甲烷细菌(严格厌氧)、极端嗜盐菌(耐高盐)和嗜热嗜酸菌(耐高温和强酸)。古菌与其他生物的主要差别在于:独特的细胞膜化学组成。在古菌中,组成细胞膜的基本成分是一类异戊二烯植烷甘油二醚和二植烷二甘油四醚,由甘油和烃以醚键连接而成;以二植烷二甘油四醚构成细胞膜时,单位膜只有一个分子层。在其他生物中,组成细胞膜的基本成分是磷酸甘油二酯,由甘油和直链脂肪酸以酯键连接组成,单位膜具有双分子层。此外,古菌还有一些独特的辅酶,如产甲烷细菌的辅酶 M、F420、甲烷呋喃、四氢甲烷喋呤、7-巯基庚酰苏氨酸磷酸盐等。

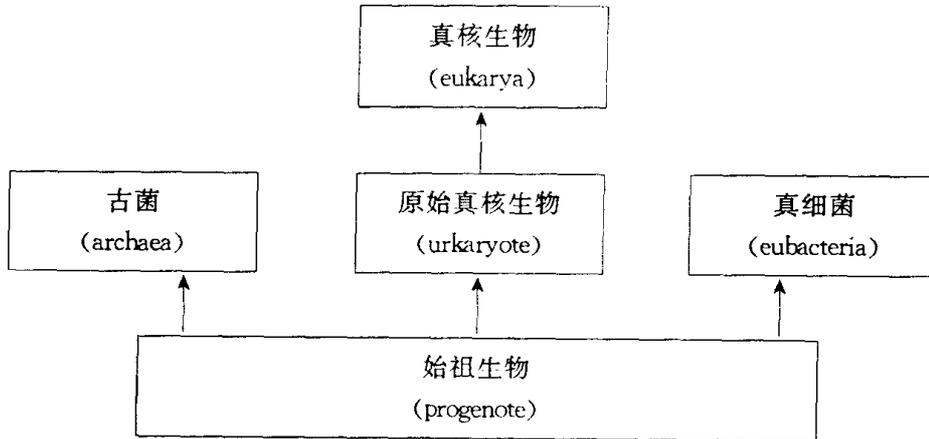


图2-1 古菌、真细菌和真核生物的进化

除古菌外,其他原核微生物(如蓝细菌和革蓝氏阳性细菌)都是由真细菌进化而来的。原始蓝细菌可能只有光合系统 I,不释放氧气。革蓝氏阴性细菌出现较晚,它们可能是光合紫细菌的后代。

化石证据指出,真核生物产生于 13 亿~14 亿年以前。真核细胞和有性繁殖的出现大大加速了生物的进化。真核细胞进化产生了原生动物、藻类、真菌、植物和动物。大约 6 亿年以前,产生了第一批多细胞植物和动物。在此之前,生物进化与微生物进化是同义词。

第三节 微生物细胞器的进化

真核细胞具有多个特殊的结构,其功能类似于高等生物的器官。这些特殊的结构称为细胞器。最引人注目的细胞器是线粒体(电子传递和氧化磷酸化的场所)和叶绿体(光合作用的场所)。两者都存在于细胞质中,但与细胞质有明显分界。有人认为,这些结构由细胞膜内陷而成,最后成了位于原生质内的细胞器(细胞膜内陷学说)。但是,这两种细胞器都有自己的核酸,且序列不同于细胞核内的核酸序列;都有自己的核糖体,且不同于细胞质中的核糖体。它们不能在细胞质内从无到有地合成,总是通过现有线粒体或叶绿体的分裂增殖。所有这些现象均无法用细胞膜内陷学说来解释。

鉴于上述情况,Margulis 提出了内共生学说,认为这些细胞器来源于原核微生物,原核微生物永久地共生在真核细胞内就成了细胞器。线粒体可能来源于好氧细菌,后者定居在发酵性真核细胞内,使其拥有呼吸系统而更有效地利用有机物质。同样,蓝细菌可共生于异养型真核细胞内而使它获得光合作用的能力。一般认为,在与真核生物共生过程中,线粒体和叶绿体会丧失一些但不是所有遗传物质,会丧失部分但不是全部生物合成能力。

有些真核微生物具有鞭毛和纤毛。有人认为这些鞭毛和纤毛也来自原核微生物的共生,但证据不足。真核微生物的鞭毛明显不同于原核微生物,直径较粗,结构也更复杂。此外,鞭毛和

纤毛内都没有核酸或核糖体,也不以分裂的方式增殖。之所以提出真核微生物的鞭毛起源于原核微生物的观点,是因为碰巧见到原生动物 *Mixotricha paradoxa* 与螺旋体(细菌细胞)联合。*Mixotricha* 的鞭毛不能运动,但它可借助于“纤毛”运动。仔细观察发现,这些“纤毛”实际上是一些粘附在 *Mixotricha* 表面的螺旋体。螺旋体的协同运动推动了 *Mixotricha*。内共生学说认为,这样附着的螺旋体会失去遗传和代谢功能而成为鞭毛或纤毛。尽管这种想法很有创意,但因缺少有力的证据而没有像线粒体和叶绿体那样被普遍接受。

对真核生物细胞核的起源,更具推测性。有人认为,随着原核细胞的分化以及形态和生化复杂性的增加,需要增加基因来编码这些性状和功能。在细胞分裂时,这些基因组的复制也更加复杂,因此产生核膜将基因组与细胞质隔开。内共生学说则认为,原核生物共生于真核生物内,两者的基因组相互结合,原核生物丧失细胞质和营养功能,成为原始真核细胞的核,包围该核的核膜可能来自细胞膜或液泡膜。

第四节 微生物生理的进化

在地球生物的进化过程中,非生物起源的有机物质是古菌生长的初始基质。古菌逐步形成降解这些有机物质的能力,从中获得生长和维持的能量。产甲烷细菌(古菌)则能利用还原性大气中的氢气和二氧化碳,以氢气来还原二氧化碳而产生能量。细胞内能量转化的中心是合成 ATP。

为了更有效地产生 ATP,酶催化反应逐渐组织成序列反应(代谢途径)。糖酵解途径就是这样组成的序列反应。在它出现以后的 30 多亿年中,这种代谢途径一直没有太大的变化。

糖酵解无需外源电子受体,可在古地球的厌氧条件下进行。由于在糖酵解中每摩尔(mol)基质产生的 ATP 较少,基质的消耗量较大,能量利用不经济。

早期细胞也建立了硫呼吸途径(以硫为电子受体来氧化有机物质)。硫呼吸可看成是厌氧呼吸的早期形态。在³²S 和³⁴S 之间,生物优先利用³²S,可造成³²S 的富集。岩石证据表明,27 亿年前即存在³²S 的富集。

由于非生物来源的有机物质有限,迫使生物建立直接利用太阳能的机制,即利用太阳能来产生 ATP,以海洋(当时生物的生存场所)中存在的硫化氢作为供氢体来还原二氧化碳合成有机物质。这就是早期的不产氧光合作用。至今,不产氧光合作用仍然存在于厌氧光合细菌(如红螺菌科, *Rhodospirillaceae*)中。这些细菌只有光合系统 I,缺少光合系统 II,不能以水作为供氢体,只能以氢气或硫化氢作为供氢体。由于水比硫化氢稳定(裂解水的 O—H 键要比裂解硫化氢的 S—H 键花费更多的能量),从硫化氢中获得氢所消耗的能量相对较少。在光合细菌中,通过化学渗透(光合磷酸化)机制产生 ATP,合成效率大大提高。

化石证据表明,蓝细菌的产氧光合作用大约出现于 20 亿~25 亿年前。这些蓝细菌拥有光合系统 I 和光合系统 II。它们不但能通过光合磷酸化产生 ATP,还能通过水的光解作用产生还原二氧化碳所需的氢,同时释放出能够改变地球大环境的氧气。光合作用为生物提供了一个保障能量供给且循环利用碳素的机制。能源与碳源(参见第五章)解决后,氮源(参见第五章)上升为生长限制因子。尽管大气中存在大量氮气,但生物不能直接利用。为此,一些微生物逐渐产生了固氮能力,将氮气转化为生物能够利用的氨。

由于光合作用利用二氧化碳并释放氧气,蓝细菌出现后,地球大气的性质发生了根本性的变化,原来一直呈还原性的大气(以二氧化碳为主,氧气含量微不足道)被逐渐转化成氧化性的

大气(二氧化碳含量下降,氧气含量升高)。它为能量利用率更高的好氧微生物的发生和发展开辟了广阔的天地。首先,在强烈的紫外线和雷电的作用下,大气中的氧被转化为臭氧,在 20~25km 的高空形成臭氧层。臭氧层有效地削弱了太阳紫外线对地面生物的杀伤力,使生物的生存环境得以从岩石底下或海洋深处逐渐转移至地面或海洋表面,从而促进了全球生物的繁茂。其次,氧加快了地球表面的岩石风化,为生物发展提供了大量的矿质营养元素。反之,在氧积累于大气之前,紫外线可能是驱动有机物质非生物性合成的主要能量,臭氧层形成后,这种来源的有机物质大大减少。氧对厌氧微生物有毒害作用,氧出现后,厌氧微生物不是惨遭灭绝,就是被困于特殊的厌氧环境中。固氮酶对氧敏感,固氮微生物也不得不产生防氧保护机制,以免遭其害。

由于在厌氧条件下生物的产能效率较低,大气积累一定浓度的氧气后,生物进化便朝着产能效率更高的需氧呼吸的方向发展。这是生物进化史上的一次飞跃。一些生物形成化能自养能力,将无机物用于产生 ATP。另一些生物则形成呼吸代谢途径,大大提高了有机物质产生 ATP 的效率。至今,大气中的氧浓度经历了三个水平的变化:① 1% PAL(PAL 指现在空气中的氧水平),大约距今 6 亿年,允许近代代谢系统发挥作用,生物迅速趋向繁盛。② 10% PAL,大约距今 4 亿年,大气中有足够的臭氧层来遮护地面,防止紫外线对生物的伤害(在此之前,生物需要靠水来防护),植物开始在陆地上生长,形成的植被又为动物提供了栖息地。③ 20% PAL,大约距今 3.4 亿年,陆生动物出现。

从生理的角度看,大多数近代生物都直接或间接地依赖于两个密切相关的代谢:光合作用和需氧呼吸作用。回顾整个生物进化过程,可以认为地球上生物进化的前 1/3 历史依靠光合作用的进化,后 2/3 历史依靠需氧呼吸的进化,其中微生物都起着不可替代的重要作用。

第五节 微生物进化的遗传基础

Darwin(1860)早就指出,在特定环境中,最适合的生物具有选择上的优势。这个原理称为自然选择法则。生物种群基因库的多样性是选择与进化的基础。基因突变可导致细胞内酶的改变。这种变化能通过基因从一代传给下一代,并传递给整个种群。由于倍增时间短,微生物遗传基因的传播速度很快。

尽管在大多数情况下,基因突变对微生物有害,甚至能致死或条件致死微生物,但基因突变也可带来有利的遗传信息,使微生物更适合其生存环境,在竞争上占据优势。在自然选择法则的作用下,不能适应环境的生物种群被淘汰,幸存的生物种群都有较好的遗传基因。

基因突变是生物遗传信息产生变异的基础,基因重组和基因交换则是生物遗传信息重新分配的关键。生物种群内基因重组能产生新的等位基因组合,从而提高生物的适应性。改变种群内遗传信息(基因)的组织方式,则为生物种群定向进化创造了条件。种群内基因交换可产生兼有多种特性的个体,有利于整个生物种群的生存。生物种群的长期稳定取决于它们吸纳优质基因并将其整合至自身染色体中的能力。

种群间相互重组能使两个生物种群产生进化上的联系。非相互重组则能使获得外源基因的生物种群产生进化上质的飞跃。没有亲缘关系的基因组能够相互重组表明,生物进化上的多条路线可以突然汇合。

各生物种群对环境的适应能力决定着生物群落的变化与稳定。根据自然选择原理,最适合的微生物种群将在群落中占优。Beijerinck 指出,“生物无处不在,环境起选择作用”。一些微生

物拥有某些特性,因而更适于在某些特殊的环境中生存。在环境不断变化的情况下,跟不上变化节奏的微生物将被淘汰出局。基因库过度特化的生物种群可在某一环境中暂居优势,但最终会因适应性差而遭排挤。因为微生物生活的环境是不断变化的,种群和群落中的基因也必须跟着变化。

代谢途径的进化也遵循 Darwin 自然选择法则。由于代谢途径的多步性与复杂性,Horowitz 提出了逆向进化概念。例如,一种微生物 M_A 需要 A 作为细胞组分,表明它具有从化合物 E 合成这种组分的能力。在代谢途径的进化前, M_A 直接从环境中吸收化合物 A。当化合物 A 变得稀少时, M_A 中能把类似物 B 转化成 A($B \rightarrow A$)的突变株 M_B 在种群中占据优势。当化合物 B 也变得稀少时, M_B 中能把化合物 C 转化为化合物 B($C \rightarrow B \rightarrow A$)的突变株 M_C 取得优势。依此类推,直到 M_E 能把化合物 E 转化为必需的化合物 A($E \rightarrow \dots \rightarrow C \rightarrow B \rightarrow A$)。遗传基因的转移和重组,特别是当某一代谢途径的基因定位于转移性很强的质粒或定位于转座子上时,它的进化和分化速度可以大大加快。

第六节 大地女神假说

地球上原来没有生物。在漫长的演化过程中,地球强大的孕育力造就了生物,并为生物的进化提供了巨大的舞台,使生物从无到有,从简单到复杂,逐渐走向繁荣。但是,这个舞台最初并不适合人类的生存。是其他生物艰苦卓绝的铺垫工作,为人类在地球上登台亮相创造了条件。在生物进化的历史长河中,种种生命活动极大地改善了地球环境,为生物的进一步发展提供了更好的机会。早在 20 世纪 70 年代初期, Lovelock 就提出了大地女神假说(Gasia hypothesis),认为地球与生物是一个密不可分的系统,这个系统犹如一个“超级生物”,在进化过程中形成了自我调节能力。作纵向比较,如果没有生命活动,那么地球就会保持富含二氧化碳的原始大气,导致地表温度高达 290°C ;作横向比较,拥有生命活动的地球的表面温度是 13°C ,而没有生命活动的金星和火星(均为太阳系中地球的近邻)的表面温度则分别是 477°C 和 -53°C (表 2-1)。根据大地女神假说,造成当今地球适合生命活动,而金星和火星不适合生命活动的根本原因是“超级生物”的自我调节作用。地球孕育生命并通过生命活动,逐渐改变了地球环境,使之越来越有利于生物的生存和发展。

表 2-1 火星、金星和地球大气组成与表面温度的比较

比较项目		火星	金星	无生物的地球	有生物的地球
大气组成(%)	CO_2	95	98	98	0.03
	N_2	2.7	1.9	1.9	79
	O_2	0.13	微量	微量	21
表面温度($^{\circ}\text{C}$)		-53	477	290 ± 50	13

(引自 Atlas & Bartha)

微生物是地球上资格最老的居民,地球上有了生命,就有了微生物。在漫长的进化过程中,微生物的形态、结构、种类和数量都得到了很大的发展。特别值得一提的是,微生物(蓝细菌)的光合作用使地球的原始大气组成发生了根本性的变化:

①光合作用将大气中的二氧化碳转化为有机物质,大大降低了地球大气中的二氧化碳含

量(由 98%降至 0.03%)。众所周知,太阳辐射为短波辐射,最大能量在 $16\ \mu\text{m}$ 。大气中的二氧化碳和其他微量气体(如甲烷和一氧化二氮)可使短波几乎无衰减地通过,但可吸收长波辐射,因此能产生“温室效应”。光合作用消耗二氧化碳,有效地控制了“温室效应”,降低了地球的表面温度(由 290°C 降至 13°C),为生物的生存和发展创造了必备的条件。

② 光合作用光解水释放氧气,使氧气逐渐在地球大气中积累(由 1.9%提高至 21%)。在紫外线和雷电的作用下,大气中的氧被转化为臭氧,在 20~25 km 的高空形成臭氧层。臭氧层有效地削弱了太阳紫外线对地面生物的杀伤力,使生物的生存环境得到了空前的改善。

综上所述,对于现有地球环境的形成和维持,微生物功不可没。

复习思考题

1. 简述 Oparin-Haldane 生命起源假说及其实验证据。
2. 为什么说在很长的地质年代中生物进化与微生物进化是同义词?
3. 微生物进化可分为哪几个阶段? 生理进化的表现有哪些?
4. 举例说明 Horowitz 提出的逆向进化概念。
5. 简述大地女神假说。
6. 简述微生物光合作用改变地球原始大气组成的意义。

第三章 微生物的主要类群(I)

如第二章所述,微生物是环境发展到一定阶段的产物,它们的物质组成与环境的物质组成具有很高的统一性,并且保持着良好的平衡关系。地球环境是一个非常复杂的体系,地球环境中的微生物也可谓无所不在,极其多样。

本教材拟分两章来介绍环境中微生物的主要类群,本章先介绍病毒与原核微生物。

第一节 病 毒

病毒(virus)是一类体积微小,没有细胞结构,但有遗传、变异、复制、增殖、侵染等多种生物特征的微生物。病毒的分布极为广泛,感染的寄主几乎遍及所有生物。作为病原菌,病毒对人类的危害极大。

一、病毒的一般特征与分类

(一)病毒的大小

病毒的形体极其微小,直径为10~300 nm。由于病毒能通过细菌滤器,故称之为“滤过性生物”。又因为病毒在光学显微镜下不能看到,必须借助电子显微镜才能观察,所以也称为“超显微”生物。在动物病毒中,个体最大的是痘病毒(Poxvirus),尺寸为100 nm×200 nm×300 nm;最小的是口蹄疫病毒(foot and mouth disease virus),直径为10~22 nm。一些代表性病毒的形态和大小如图3-1所示。

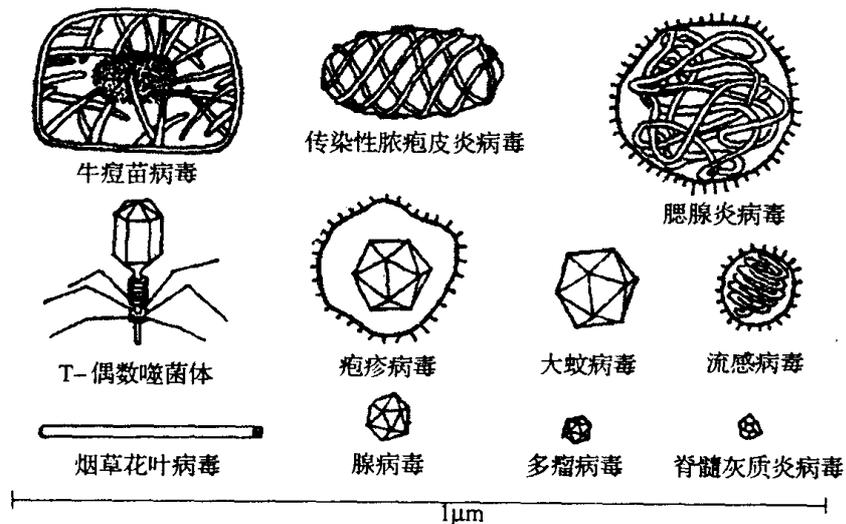


图 3-1 几种病毒的形态和相对大小

(二) 病毒的形态

病毒的形态因种而异(图 3-1)。动物病毒的形态有球形、卵圆形、砖形等。植物病毒的形态有杆状、丝状和球状。噬菌体的形态有蝌蚪状和丝状。

(三) 病毒的分类

根据寄生的宿主,病毒可分为动物病毒、植物病毒、细菌病毒(噬菌体)、放线菌病毒(噬放线菌体)、藻类病毒(噬藻体)、真菌病毒(噬真菌体)等。

根据所致的疾病,病毒可分为流行性感冒病毒、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒等动物性病毒,以及烟草花叶病毒、水稻矮缩病毒、番茄丛矮病毒等植物性病毒。

根据所含的核酸种类,病毒可分为 DNA 病毒和 RNA 病毒。

二、病毒的化学组成和结构

(一) 病毒的化学组成

大多数病毒由核酸和蛋白质组成,少数较大的病毒还含有脂类和多糖等成分。脂类以磷脂为主,占 50%~60%;多糖常以糖脂、糖蛋白形式存在。

(二) 病毒的结构

病毒的基本结构包括核酸内芯(core)和蛋白质衣壳(capsid)。核酸内芯又称核髓,即 DNA 或 RNA,每种病毒只含一种类型的核酸。蛋白质衣壳也叫衣壳,由称为衣壳粒的蛋白质亚单位组成。核髓与衣壳合称为核衣壳(nucleocapsid)。病毒核酸的功能是决定病毒的遗传性、变异性和对敏感宿主细胞的感染力。病毒蛋白质的功能是保护病毒免受环境因素的影响,决定病毒感染的特异性,并与病毒的致病性、毒力和抗原性有关。

完整的具有感染力的病毒体叫病毒粒子。仅由核衣壳构成的病毒体,称为简单病毒粒子(图 3-2)。核衣壳外包有囊膜(envelope)(或称被膜)的病毒体,称为复杂病毒粒子。囊膜由类脂质和糖蛋白组成,与病毒对宿主细胞的特异性和亲和力有关(图 3-2)。

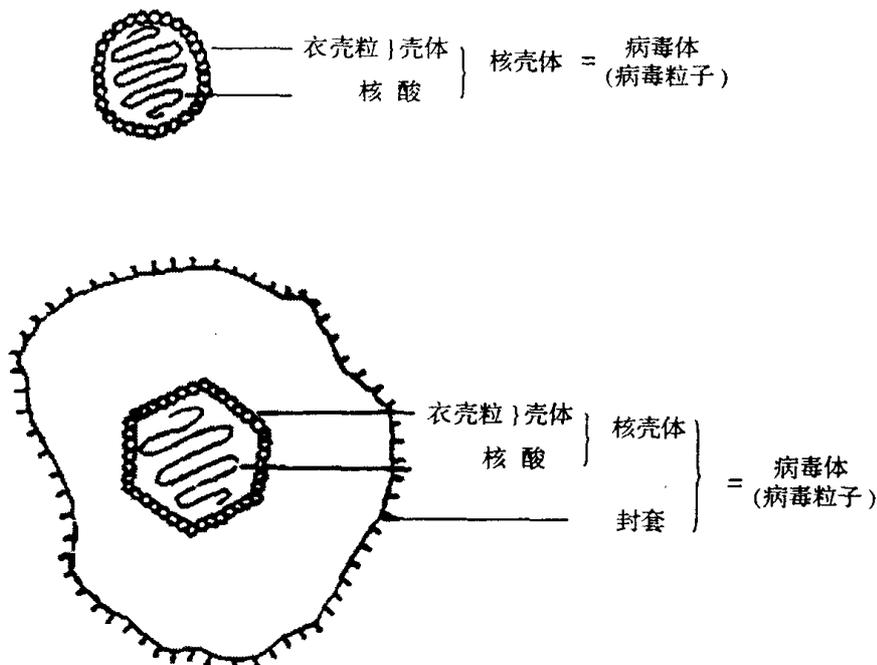


图 3-2 病毒结构示意图

由于衣壳粒的排列不同,病毒可呈现三种不同的立体结构(图 3-3):① 螺旋对称。衣壳粒一个挨一个地排列成衣壳,衣壳呈螺旋对称,核酸位于螺旋体内。如烟草花叶病毒(Tobacco mosaic virus)、流感病毒(Influenza virus)、狂犬病毒(Street virus)。② 立体对称。外观呈球状,实际为立体对称的廿面体。如腺病毒(Adenovirus)、疱疹病毒(Herpes virion)、脊髓灰质炎病毒(Poliovirus)。③ 复合对称。如大肠杆菌 T 系噬菌体,头部呈立体对称,尾部呈螺旋对称。

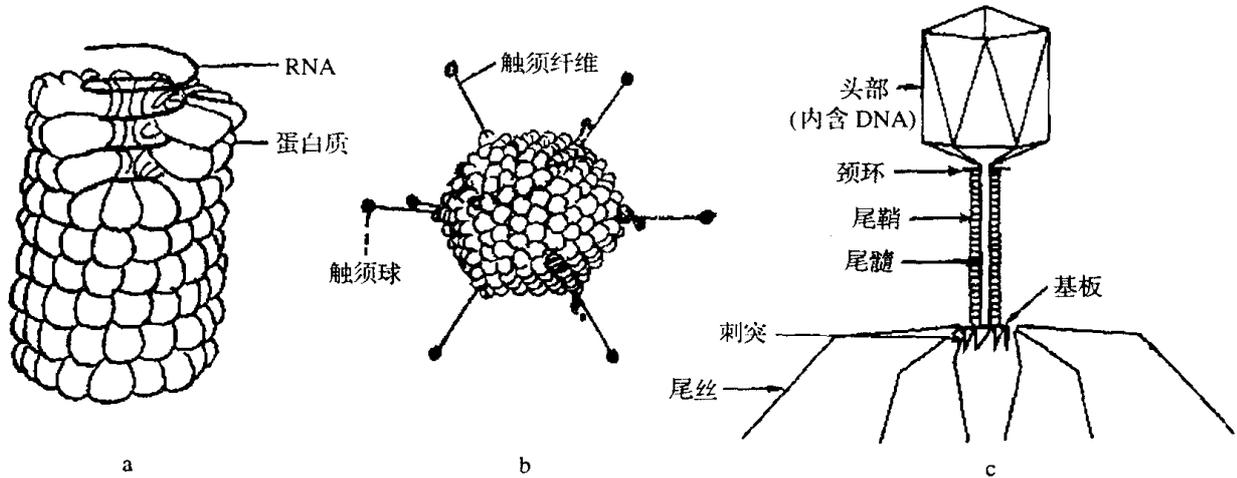


图 3-3 病毒的三种排列方式

a. 烟草花叶病毒; b. 腺病毒; c. 大肠杆菌 T₄ 噬菌体

三、噬菌体

根据与宿主细胞的关系,噬菌体可分为烈性噬菌体和温和噬菌体两种。凡是侵入宿主细胞后,能增殖并导致宿主细胞裂解的噬菌体,称为烈性噬菌体(virulent phage)。侵入宿主细胞后,与宿主细胞 DNA 同步复制,并随宿主细胞的繁殖而传给子细胞,一般情况下不引起宿主细胞裂解的噬菌体,称为温和噬菌体(temperate phage)。

(一) 噬菌体的生活周期

大肠杆菌 T 系偶数噬菌体是烈性噬菌体。人们对这种烈性噬菌体的生活周期研究得较早,也较深入,因此下面以它为例介绍噬菌体的生活周期。

烈性噬菌体的生活周期(也称侵染过程)可分为如图 3-4 所示的五个阶段。

1. 吸附 病毒对宿主的吸附具有高度的特异性。吸附过程一方面取决于细胞表面受体位点的结构,另一方面也取决于噬菌体的吸附器官——尾部吸附位点的结构。当噬菌体与敏感细胞混合时,可发生碰撞接触,噬菌体的吸附位点与细菌表面的受体位点互补结合。吸附过程受环境因子的制约,如 pH、温度、阳离子浓度等都会影响吸附的速度。

2. 侵入 指噬菌体注入核酸。大肠杆菌 T 系噬菌体以其尾部吸附到敏感菌表面后,将尾丝展开并固着于细胞上。尾部的酶水解细胞壁的肽聚糖,使细胞壁产生小孔。然后,尾鞘收缩将头部的核酸通过中空的尾髓压入细胞内,蛋白质外壳留在细胞外。通常,一种细菌可以吸附几种噬菌体,但只允许其中一种侵入,即进入细菌的噬菌体会排斥或抑制第二种噬菌体的侵入。

尾鞘并非为噬菌体侵入所必需。有些噬菌体没有尾鞘,不能收缩,也能将核酸注入细胞。但尾鞘收缩可明显提高噬菌体注入核酸的速度。如 T₂ 噬菌体注入核酸的速度可比 M₁₃ 快 100 倍左右。

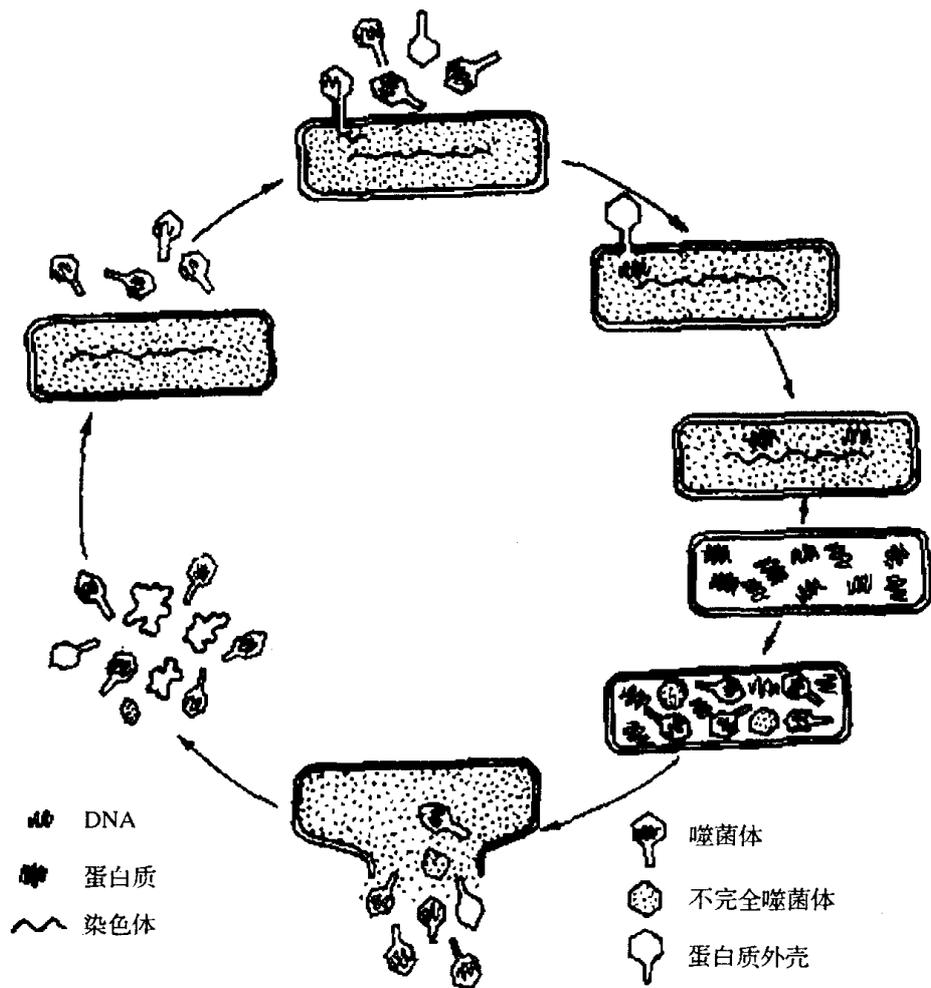


图 3-4 噬菌体侵染过程示意图

3. 复制 指噬菌体 DNA 和蛋白质外壳的复制。噬菌体 DNA 进入宿主细胞后,立即利用宿主细胞原有的 RNA 聚合酶,以噬菌体 DNA 为模板转录早期的 mRNA,由早期的 mRNA 翻译噬菌体复制所需的酶类以及抑制宿主细胞代谢所需的调节蛋白。在这些酶的催化下,以噬菌体 DNA 为模板,采用半保留复制的方式,合成子代 DNA。噬菌体 DNA 开始复制后,DNA 继续被转录,产生晚期的 mRNA;由晚期的 mRNA 翻译组成噬菌体外壳的结构蛋白(如头部蛋白和尾部蛋白)。

4. 装配 当噬菌体的核酸、蛋白质分别合成后,就开始装配,形成大量成熟的、有感染力的子代噬菌体。例如,大肠杆菌 T₄ 噬菌体的 DNA、头部蛋白质亚单位、尾鞘、尾髓、基板、尾丝等部件合成后,DNA 收缩聚集,被头部外壳蛋白包围,形成廿面体的噬菌体头部。尾部部件也装配起来,再与头部连接,最后装配成子代噬菌体。

5. 释放 除 M₁₃ 等少数噬菌体外,成熟的噬菌体粒子均借宿主细胞裂解而释放。细菌裂解,可导致液体培养物由混浊变清;也可导致固体培养物出现噬菌斑。但是,丝状噬菌体 fd 成熟后并不破坏细胞壁,它可从宿主细胞中钻出来,宿主细胞可以继续生长。

大肠杆菌 T 系偶数噬菌体从吸附到粒子成熟释放大约需 15~30 min。在适宜条件下,被释放的子代噬菌体又能重复上述过程。

(二) 宿主细胞的溶原性

大肠杆菌 λ 噬菌体是一种温和噬菌体。温和噬菌体感染细菌细胞后,通常将其 DNA 整合

到寄主细胞的染色体 DNA 上,并随细菌的繁殖而复制。整合到寄主细胞染色体 DNA 上的噬菌体 DNA(基因组),称为原噬菌体(prophage)。大肠杆菌噬菌体 P₁ 也是一种温和噬菌体,但它的基因组并不被整合到细菌的染色体 DNA 上,而是附着在细胞膜上,以质粒状态存在。人们把含有原噬菌体的细菌细胞,叫做溶原性细胞(lysogenic cell);并把温和噬菌体侵入宿主细胞后所产生的相关特性,叫做溶原性。

溶原性细菌具有以下基本特性:

① 遗传性。子代细菌也含原噬菌体。

② 自发或诱发裂解。经过自发过程或理化因子的诱发过程,原噬菌体可被活化,产生具感染性的噬菌体粒子,并导致溶原性细胞裂解。

③“免疫性”。例如,含有 λ 噬菌体的溶原性细胞,对 λ 噬菌体的毒性突变株具有免疫性。即毒性突变株对非溶原性细胞有毒性,但对溶原性细胞却没有毒性。

④ 复愈(非溶原化)。原噬菌体从宿主细胞中消失,变成非溶原性细胞。

⑤ 溶原性转变。噬菌体被整合到宿主细胞染色体 DNA 后,可使细菌细胞的表型发生改变,如形态、抗原性、产毒素等的改变。

(三)一步生长曲线

将高浓度的敏感菌培养物与适量的噬菌体悬液相混[两者比例为(10:1)~(100:1)];经过短时间培养,使噬菌体吸附在细菌上;再用稀释、离心或抗病毒血清等方法除去未被吸附的噬菌体;然后用新鲜的液体培养基把吸附噬菌体的细菌悬液高倍稀释,以免二次吸附和感染。培养后定时取样,将含有噬菌体的样品与敏感细菌培养物混合培养,对每个样品在培养基平板表面产生的噬菌斑计数。以培养时间为横座标,噬菌斑数目为纵座标,可以绘出一步生长曲线(图 3-5)。一步生长曲线能够反映噬菌体的三个最重要特性参数——潜伏期、裂解期和裂解量。

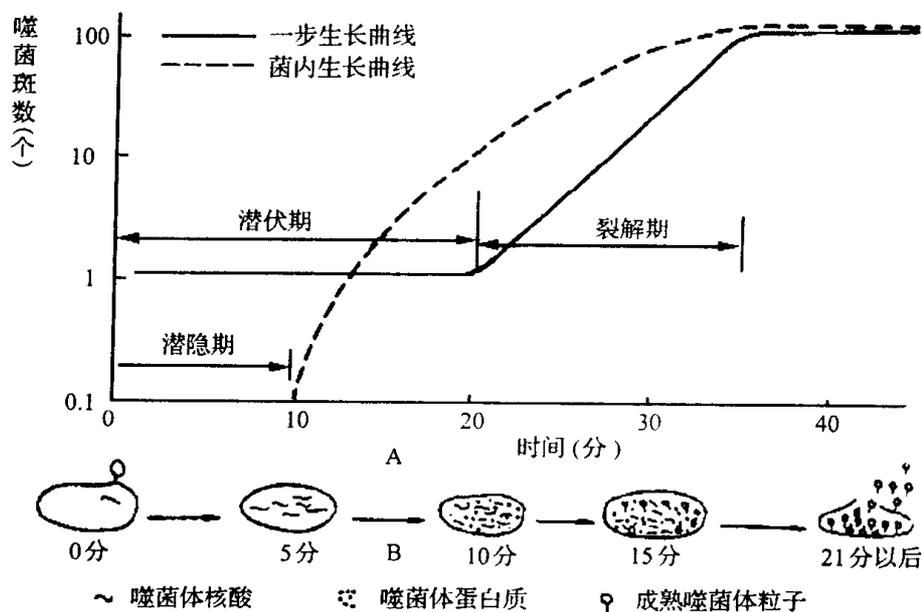


图 3-5 噬菌体 T₂ 的一步生长曲线

A. 一群噬菌体感染一群细菌细胞的结果;B. 单个噬菌体在一个细菌细胞内的增殖情况

人们将噬菌体吸附至寄主细胞表面开始到寄主细胞释放新的噬菌体为止的这段时间,称为潜伏期(latent period)。在整个潜伏期内,寄主细胞不释放噬菌体。潜伏期后,被感染的细菌

开始裂解,噬菌斑数突然增多,曲线上升;直至完全裂解,噬菌斑数基本恒定,曲线平稳。这段时间称为裂解期(lysis period)。每个被感染的寄主细胞所释放的新噬菌体的平均数,称为裂解量(burst size),定义为:

$$\text{裂解量} = \frac{\text{裂解期平均噬菌斑数}}{\text{潜伏期平均噬菌斑数}} \quad (3-1)$$

四、亚病毒

亚病毒(subvirus)是一类比病毒更为简单,仅具有某种核酸不具有蛋白质或仅具有蛋白质而不具有核酸,能够侵染动植物的微小病原体。1983年,在意大利召开的“植物和动物亚病毒病原、类病毒和朊病毒”国际会议上,建议把类病毒、拟病毒和朊病毒统称为亚病毒(表3-1)。

表 3-1 亚病毒类群的主要异同

名称	组成成分	相对分子质量(D)	独立感染性
类病毒	RNA	约 10^5	+
拟病毒	RNA	约 10^5	-
朊病毒	蛋白质	约 10^4	+

(一)类病毒

类病毒(viroid)是20世纪70年代初美国学者Diener在研究马铃薯纺锤形块茎病病原时首先发现的。它们是单链共价闭合环状RNA分子,相对分子质量约 1.0×10^5 ,能感染某些植物。严格专性寄生,只有在宿主细胞内才表现出生命特征——核酸的自我复制,并使宿主致病,死亡。迄今为止,报道的类病毒有十几种,只发现于植物中。

(二)拟病毒

20世纪80年代以来,在澳大利亚先后从绒毛烟、苜蓿、莴苣和地下三叶草上发现了4种新的植物病毒。这些病毒的蛋白质衣壳内都具有两种RNA分子,一种是相对分子质量约为 1.5×10^6 的线状RNA₁,另一种是相对分子质量约为 10^5 的环状RNA₂。RNA₂与类病毒有相似的理化性质和二级结构,称为拟病毒(virusoid)。拟病毒与类病毒的区别是:单独进入宿主后,拟病毒无致病性,类病毒有致病性。

(三)朊病毒

朊病毒(prion)又称蛋白质侵染因子。它是一类能侵染动物并在宿主细胞内复制的小分子疏水蛋白。相对分子质量 $2.7 \times 10^4 \sim 3 \times 10^4$ 。在电镜下,朊病毒呈杆状颗粒,成丛排列,每丛大小和形状不一。

朊病毒是在研究羊瘙痒病病因的过程中于1982年首先发现的。羊瘙痒病是一种神经性疾病,常致羊死亡。近年来流行的疯牛病亦是朊病毒感染所致,它以神经系统的缓慢退化以至发生紊乱为特征。

朊病毒的发现在生物学界引起震惊。朊病毒只含蛋白质,与核酸是遗传物质的经典理论不一致;朊病毒能增殖,与目前公认的“中心法则”相抵触。

第二节 原核微生物

根据细胞的存在与否,微生物可分为非细胞型微生物(如病毒和类病毒)和细胞型微生物。根据细胞核的存在与否,后者又可分为原核微生物与真核微生物。原核微生物与真核微生物的主要区别见表 3-2。

原核微生物(Prokaryomicrobe)包括细菌、放线菌、蓝细菌和古细菌等类群。

表 3-2 原核微生物与真核微生物的主要区别

比较项目	原核微生物	真核微生物
核膜	无	有
核仁	无	有
DNA	只有一条,不与 RNA 和组蛋白结合	一至数条,与 RNA 和组蛋白结合
核糖体	70S,在细胞质中	80S 在细胞质中;70S 在某些细胞器中
细胞器	无	有线粒体、高尔基体、内质网、叶绿体等
中间体	有	无
细胞膜中甾醇	无(除支原体外)	有
呼吸链位置	细胞膜的中间体	线粒体
细胞壁组成	肽聚糖或脂多糖	几丁质、多聚糖或寡糖
基因重组	通过接合、转导、转化进行	通过有性过程进行
细胞分裂	二分裂	有丝分裂、减数分裂
运动器官	较细的鞭毛(中空管状结构)	较粗的鞭毛或纤毛(9+2 结构)
胞吐现象	无	有
胞饮现象	无	有

一、细菌

(一)细菌的形态和大小

1. 细菌的形态 细菌的基本形态有球状、杆状和螺旋状三种,分别被称为球菌、杆菌和螺旋菌。

(1) 球菌 细胞呈球形或椭圆形,分裂后产生的子细胞常保持一定的空间排列方式(图 3-6)。在分类鉴定上,这些排列方式有重要意义。

(2) 杆菌 细胞呈杆状或圆柱形。各种杆菌的长宽比例差异很大,有的粗短,有的细长。短杆菌近似球状,长杆菌则近丝状(图 3-7)。一般来说,同一种杆菌的粗细相对稳定,长度变化较大,常因培养时间和培养条件而异。有的杆菌很直,有的则稍弯曲;有的菌体两端平齐,有的两端钝圆,还有的两端削尖。杆菌细胞常沿一个平面分裂,大多数菌体分散存在,也有一些杆菌呈长短不同的链状,有些杆菌则排列成栅状或“八”字形。在细菌中,杆菌的种类最多。

(3) 螺旋菌 细胞弯曲成弧状或螺旋状,弯曲不足一圈的称弧菌,如霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*),弯曲大于一圈的称为螺旋菌。螺旋菌的螺旋圈数和螺距大小因种而异。有些螺旋菌菌体僵硬,借鞭毛运动;有些螺旋菌则菌体柔软,借轴丝收缩运动,后者称为螺旋体(图 3-8)。

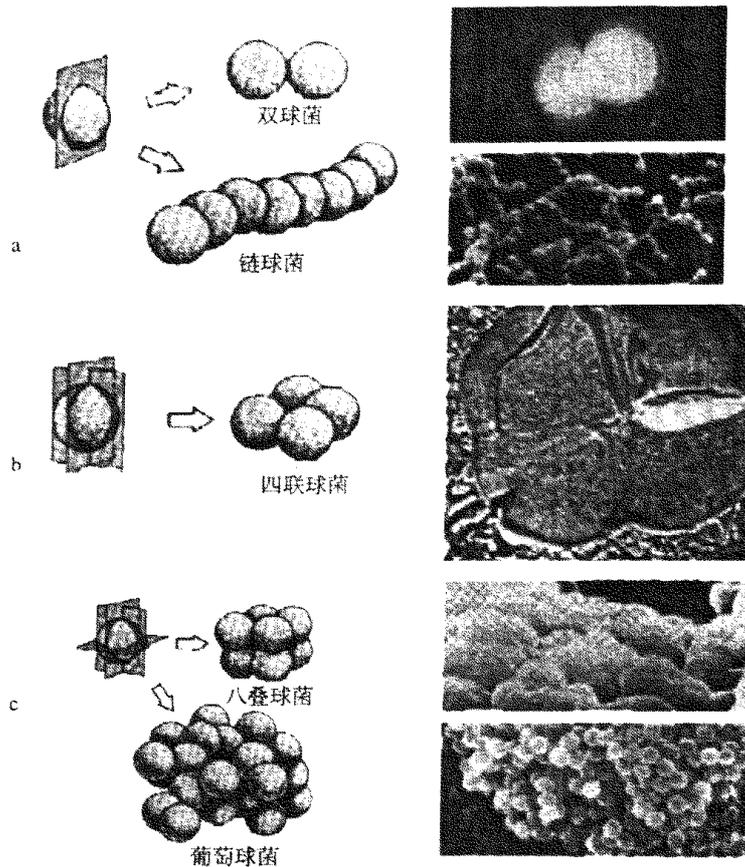


图 3-6 球菌的形态及排列方式

- (a) 细胞在一个平面分裂产生双球菌和链球菌；
- (b) 细胞在两个平面分裂产生四联球菌；
- (c) 细胞在三个平面分裂产生八叠球菌和葡萄球菌

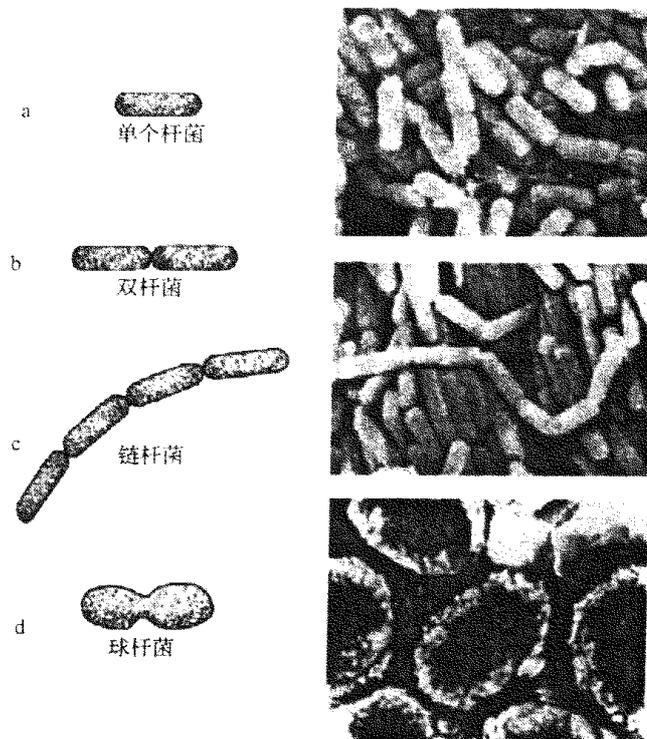


图 3-7 杆菌的各种形态

除上述三种基本形态外,细菌还有其他形态。例如柄细菌属(*Caulobacter*),细胞呈弧状或肾状并具有一根特征性的细柄,可附着于基质上;又如球衣菌属(*Sphaerotilus*),菌体形成衣鞘(sheath),在衣鞘内杆状细胞呈链状排列而成为丝状体。

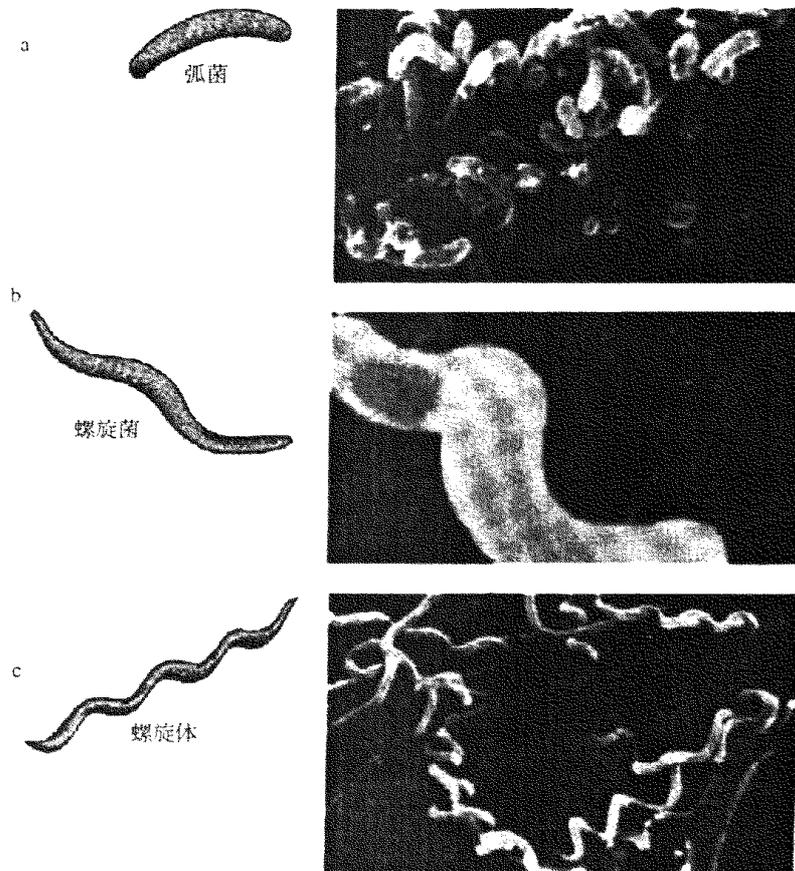


图 3-8 螺旋菌的各种形态

2. 细菌的大小 细菌的大小可用测微尺在显微镜下直接测量,也可通过投影或照相,按图中的大小和放大倍数间接测算。测量结果常以 μm 为单位表示。

球菌的大小以直径表示,一般为 $0.5\sim 2\ \mu\text{m}$;杆菌以宽度和长度表示,一般为 $(0.5\sim 1)\ \mu\text{m} \times (1\sim 8)\ \mu\text{m}$;螺旋菌也以宽度和长度表示,其大小为 $(0.5\sim 5)\ \mu\text{m} \times (5\sim 50)\ \mu\text{m}$,螺旋菌的长度是菌体两端间的距离。

菌体的形态和大小均受菌龄、培养条件等因素的影响。

(二) 细菌的细胞构造

细菌细胞结构模式如图 3-9 所示。几乎所有细菌都有细胞壁、细胞膜、细胞质、细胞核等结构,这些结构称为细菌细胞的基本结构。鞭毛、荚膜、芽孢、气泡等结构则为某些细菌所特有,这些结构称为细菌细胞的特殊结构。

1. 细胞壁 细胞壁是包在细菌细胞外表,坚韧而略带弹性的薄膜。细胞壁约占菌体干重的 $10\%\sim 25\%$ 。

(1) 细胞壁的功能:细胞壁的主要功能是:① 维持细胞的形状。如果用溶菌酶处理使细胞壁溶解,则任何形态的细胞均转变为圆球状。② 免受渗透裂解。没有细胞壁的细菌细胞会因吸水过度而裂解。在自然界,细菌一般生长于低渗溶液中,如果没有细胞壁的保护,细菌难以生存。③ 支撑鞭毛。细胞壁为鞭毛提供支点,是鞭毛运动的必要条件。失去细胞壁后,细菌虽仍

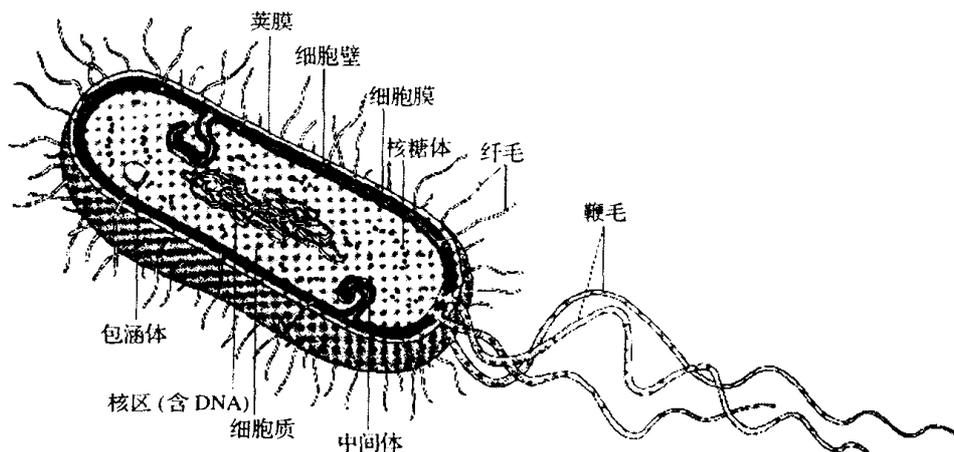


图 3-9 细菌细胞结构图

具鞭毛,但不能运动。④ 具有分子筛的作用。细胞壁多孔,可让小分子物质通过,但不能让大分子物质穿过。

(2)细胞壁的结构:细菌细胞壁的主要成分是肽聚糖。肽聚糖由 N-乙酰氨基葡萄糖(G)、N-乙酰胞壁酸(M)以及短肽组成。N-乙酰氨基葡萄糖和 N-乙酰胞壁酸相互交替以 β -1,4-糖苷键连接成多聚糖。多聚糖中的 N-乙酰胞壁酸能以肽键与短肽相联,并通过短肽架桥使多聚糖联结成网状。

肽聚糖纵横交错的网状结构赋予细胞壁坚硬牢固的性质,它是细胞壁能够维持细胞形态和抵御渗透裂解的基础。也正因为肽聚糖联结成一个严密的网状结构,肽聚糖中任何键的断裂,都可能使细胞壁的结构受损,从而丧失对细菌细胞的保护作用,导致细菌死亡。

溶菌酶和青霉素之所以能杀死一些细菌,就是因为溶菌酶能断裂肽聚糖中的糖苷键;青霉素能干扰短肽的架桥作用。

(3)细胞壁与革蓝氏染色:1884 年,丹麦细菌学家 Christain Gram 创造了一种鉴别染色法,称为革蓝氏(Gram)染色法。其操作步骤如下:

细菌涂片→草酸铵结晶紫初染(菌体呈深紫色)→路哥尔氏碘液媒染
 (使染色剂与菌体结合牢固)→乙醇脱色—
 →G⁻→蕃红复染(菌体呈红色)
 →G⁺→蕃红复染(菌体仍呈深紫色)

革蓝氏染色法是细菌分类鉴定的重要方法之一。根据革蓝氏染色,可把细菌区分为革蓝氏阳性(G⁺)细菌和革蓝氏阴性(G⁻)细菌。在结构和组成上,这两类细菌的细胞壁有很大差别(图 3-10,表 3-3)。



图 3-10 G⁺细菌和 G⁻细菌细胞壁的结构

表 3-3 G⁺与 G⁻细菌细胞壁结构和组成比较

G ⁺ 细胞壁结构与组成	G ⁻ 细胞壁结构与组成
单层,厚 20~80 nm	两层,薄,约 10 nm
主要由多层肽聚糖组成,占细胞壁干重的 40%~90%,网格紧密、坚固,与细胞膜连接不紧密。	内壁层为单层肽聚糖,厚 2~3 nm,只占细胞壁干重的 5%~10%,网格较疏松,紧贴细胞膜。
含磷壁酸,具有调节酶活性的作用	外壁层由脂多糖、磷脂和脂蛋白组成。脂多糖为 G ⁻ 细菌细胞壁所特有。
对青霉素、溶菌酶敏感	对青霉素、溶菌酶不敏感

一般认为,革蓝氏染色反应与细胞壁的结构和组成有关。在革蓝氏染色中,经过结晶紫初染和碘液媒染,菌体内形成了深紫色的“结晶紫-碘”复合物。对于革蓝氏阴性细菌,这种复合物可用酒精从细胞内浸出,而对于革蓝氏阳性细菌,则不易浸出。其原因是革蓝氏阳性细菌的细胞壁较厚,肽聚糖含量高,含脂量低,网格紧密,用酒精脱色时引起细胞壁肽聚糖层脱水,网状结构的孔径缩小以至关闭,从而阻止“结晶紫-碘”复合物的外逸,于是保留了初染的紫色;革蓝氏阴性细菌细胞壁的肽聚糖层较薄,肽聚糖含量较少,脂类含量较高,用酒精脱色时脂类物质溶解,细胞壁透性增大,“结晶紫-碘”复合物被抽提至胞外,结果细胞被蕃红复染成红色。

由于结构和组成上的差异,G⁺细菌与 G⁻细菌对溶菌酶和青霉素的反应也不相同。G⁺细菌的细胞壁以肽聚糖为主,肽聚糖的合成可受青霉素的干扰,合成的肽聚糖又会遭溶菌酶的破坏,因此 G⁺细菌对青霉素和溶菌酶敏感。G⁻细菌的细胞壁除含肽聚糖外还含有较多的脂多糖,脂多糖不受溶菌酶和青霉素的影响,因此 G⁻细菌对青霉素和溶菌酶不敏感。

2. 细胞膜和间体

(1)细胞膜:细胞膜(cell membrane)是紧靠着细胞壁内侧而包围着细胞质的一层柔软而富有弹性的半透性薄膜。它的重量占菌体干重的 10%,由 60%~70%蛋白质,30%~40%脂类以及 2%左右多糖组成。细胞膜的生理功能有:① 是分隔细胞内外环境的屏障,使细胞内维持正常的渗透压;② 是分布蛋白质载体的重要部位,使细菌能选择吸收所需的营养物质;③ 是细胞壁的合成部位,膜上拥有合成细胞壁及形成横隔的各种酶类;④ 是细菌产能代谢的重要部位,膜上分布着呼吸酶及 ATP 合成酶;⑤ 是鞭毛的着生部位。鞭毛与细菌运动有关,鞭毛的基粒着生细胞膜上。

(2)间体:除细胞膜外,许多细菌还具有其他细胞内膜系统。细胞质膜内陷形成的一个或数个较大而不规则的层状、管状或囊状物,称为间体(mesosome)。目前,对间体的功能还不完全了解,据推测它有以下功能:类似高等生物的线粒体,相当于真核细胞的内质网,与染色体分离及细胞分裂有关。

3. 细胞核 细菌的细胞核位于细胞质内,无核膜、无核仁,仅为一核区,因此称为原始形态的核(primitive form nucleus),简称原核或拟核(nucleoid)。原核只有一条染色体,主要成分是 DNA。染色体 DNA 一般呈环形,总长约 0.25~3 mm;核中尚有少量 RNA 和蛋白质,但没有真核生物所具有的组蛋白(结构蛋白)。在正常情况下,一个细菌只有一个核区;但在细菌处于活跃生长时,一个菌体内也可出现 2~4 个核区。原核携带大量遗传信息,是细菌生长发育、新陈代谢和遗传变异的控制中心。

除染色体 DNA 外,细菌还有一种能自我复制的小型共价闭环环状的 DNA 分子,称为质粒(plasmid)。质粒的相对分子质量较小,约 $2 \times 10^6 \sim 100 \times 10^5$;个数较多,每个菌体有一至数

个质粒。质粒不为生存所必需,它的消失不影响细菌的生活。质粒既可自行消失,也可人为去除。

质粒可使细菌产生一些特殊的性状,如致育性、抗药性、产生抗生素、降解某些化学物质等。

4. 细胞质及其内含物 细胞质是细胞膜内除核以外的无色透明的粘稠状胶体物质,由蛋白质、核酸、脂类、多糖、无机盐和水组成。幼龄菌细胞质稠密、均匀,富含 RNA,易被碱性染料染色,且着色均匀;老龄菌缺乏营养, RNA 被作为氮源和磷源利用,含量降低,着色不均匀。染色情况可在一定程度上反映细菌的生长状态。

内含物是细胞质中所含的颗粒状物质,包括细胞结构组分(如核糖体),颗粒状贮藏物(如异染粒和聚 β -羟基丁酸),以及气泡等。

(1)核糖体(ribosome):核糖体也称核糖核蛋白体,是蛋白质合成的场所。细菌的核糖体游离于细胞质中,其沉降系数为 70 S,由 50 S 和 30 S 两个亚基组成,化学成分为蛋白质与 RNA。核糖体常以游离状态或多聚核糖体状态分布于细胞质中。

(2)颗粒状贮藏物:营养物质丰富时,很多细菌可在细胞内积聚不同的贮藏颗粒;缺乏营养物质时,它们又能被分解利用。贮藏颗粒的多少可随菌龄及培养条件不同而改变。常见的颗粒状贮藏物有:① 异染粒(volutin 或 metachromatic granule),又称换转菌素,最早发现于迂回螺菌(*Spirillum volutans*)中。异染粒嗜碱性或嗜中性较强,用蓝色碱性染料(如甲苯胺蓝、甲烯蓝)可使该颗粒染成紫红色并由此得名。异染粒主要由多聚偏磷酸盐组成,还含有 RNA、蛋白质、脂类与 Mg^{2+} 。异染粒是储备的磷酸盐。

② 聚 β -羟基丁酸颗粒(poly- β -hydroxybutyric acid,缩写为 PHB):PHB 是 β -羟基丁酸的直链聚合物,为细菌所特有,可用作碳源和能源。在革蓝氏染色中,这类物质不着色,但易被脂溶性染料(如苏丹黑)着色,可在光学显微镜下观察。根瘤菌(*Rhizobium*)、固氮菌(*Azotobacter*)、肠杆菌(*Enterobacter*)等细菌体内均存在 PHB。

③ 肝糖粒(glycogen)和淀粉粒:肝糖粒和淀粉粒都是碳源和能源性贮藏物。肝糖粒较小,只能在电镜下看到。用稀碘液染色,肝糖粒成红褐色。淀粉粒较大,用碘液染色,成蓝色。

④ 硫粒(sulfur granule):某些氧化硫化氢的细菌可在细胞内积累硫粒,贝氏硫菌属(*Beggiatia*)、发硫菌属(*Thiothrix*)等均可在细胞内积累强折光性的硫粒。硫粒作为能源贮备物,需要时可被细菌再次利用。

(3)气泡(gas vesicle):气泡是某些水生细菌(如蓝细菌、不产氧光合细菌和盐细菌)细胞内贮存气体的特殊结构。气泡由许多小的气囊组成,气囊膜只含蛋白质而无磷脂。气泡的大小、形状和数量随细菌种类而异。气泡能使细胞保持浮力,有助于调节细菌在水体中的位置,以利获得光、氧和营养。

5. 荚膜 荚膜是某些细菌形成的、分泌于细胞壁外的粘液状物质(图 3-11)。按其覆盖在细胞壁外的厚度和形状,可分为以下几种情况:① 具有一定外形,相对稳定地附着于细胞壁外,厚约 200 nm,称为荚膜或大荚膜;② 厚度小于 200 nm,称为微荚膜;③ 无明显边缘,疏松地向周围环境扩散的,称为粘液层。若粘液层局限于细胞一端,就称为粘接物。粘接物可使细胞特异性地附着在物体表面。多个菌体外面的荚膜互相融合,连为一体,可组成共同的荚膜。多个菌体包埋于共同的荚膜中,即为菌胶团。

荚膜的化学组成主要是多糖,具体因菌种而异。荚膜可以保护细胞免受干燥的影响,可以作为细胞外的贮藏性碳源和能源,可以增强某些病原菌的致病能力,有的荚膜甚至本身有毒。

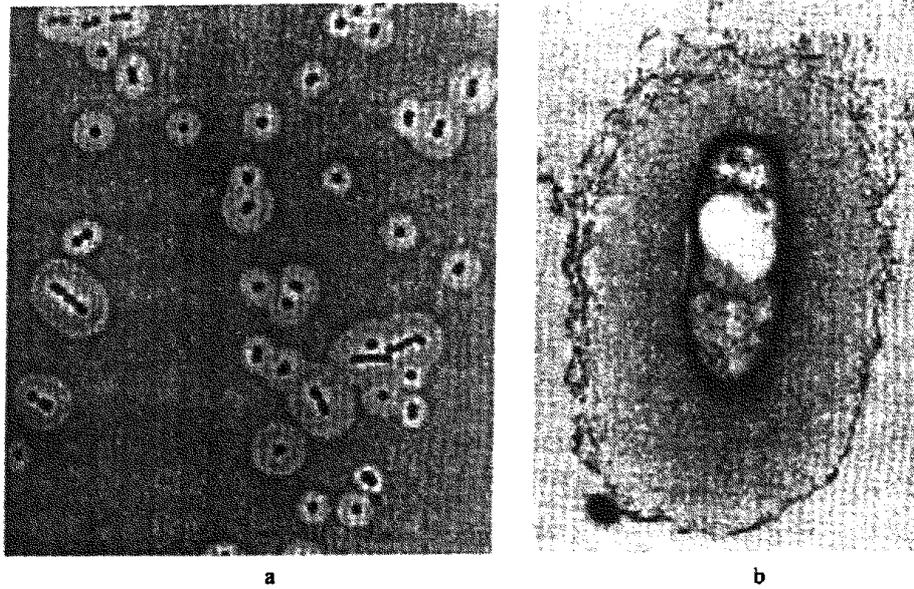


图 3-11 细菌的荚膜

a. 不动杆菌(*Acinetobacter* sp.)负染后的相差显微镜照片;

b. 三叶草根瘤菌(*Rhizobium trifolii*, 不包括荚膜的菌体直径 $0.7 \mu\text{m}$)的电子显微镜照片

在琼脂培养基上,产荚膜细菌所形成的菌落表面湿润,有光泽,粘液状,称为光滑型(S型)菌落。不产荚膜细菌所形成的菌落表面干燥、粗糙,称为粗糙型(R型)菌落。

产生荚膜是细菌的遗传特性。能产生荚膜的细菌并非在整个生活期内都有荚膜。荚膜的形成与环境条件密切相关,例如肠膜状明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)只有在含糖量高、含氮量低的培养基中,才能大量产生荚膜物质;炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)只有在侵染至动物体内时才能形成荚膜。荚膜可因突变而失去,也可人为去除,失去荚膜不会影响菌体的正常生长,但致病菌失去荚膜后,致病力大大降低。

6. 鞭毛和纤毛 鞭毛(flagellum)是某些细菌长在体表的细长、波曲的丝状物(图 3-12)。在鞭毛的化学成分中,蛋白质占 99%以上,碳水化合物、类脂和矿物质的总和不超过 1%。鞭毛长度是菌体的若干倍,直径很细,一般为 $10\sim 20 \text{ nm}$,需用电镜才能观察。特殊的鞭毛染色可将媒染剂与染料的复合物附着并积累在鞭毛上,使其直径加粗而能在普通光学显微镜下可见。除用显微镜直接观察外,还可通过其他方法证明鞭毛的存在。例如,将细菌穿刺接种于半固体培养基中,鞭毛细菌会沿穿刺线向周围扩散生长。又如,将细菌制成悬滴,在普通光学显微镜下,可见鞭毛细菌的翻滚或穿梭运动。

细菌鞭毛的功能是赋予细菌运动的能力。每个菌体的鞭毛数为一至数十根。鞭毛的着生方式多样,有一端单生,两端单生,一端丛生,两端丛生以及周生(图 3-12)。鞭毛的数目和着生方式是菌种特征,在细菌分类鉴定上有重要作用。

鞭毛细菌可藉鞭毛而运动。由于环境条件的刺激,能运动的细菌会改变原有的运动方向而趋向有利因子或避开有害因子,这种运动称为趋避运动。根据刺激因子的不同,可分为化学趋避运动和光趋避运动。

纤毛(fimbria 或 pilus)是长在细菌体表的一种纤细(直径 $7\sim 9 \text{ nm}$)、中空、短直、数量较多(250~300 根)的蛋白质附属物(图 3-13)。常见于革蓝氏阴性细菌,少见于革蓝氏阳性细菌。纤毛也有很多类型,具有不同功能,主要与吸附有关而与运动无关。

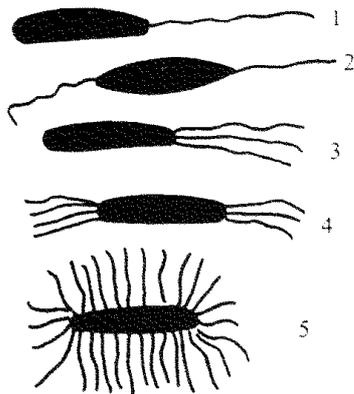


图 3-12 细菌鞭毛的类型

1. 一端单生鞭毛；2. 两端单生鞭毛；
3. 一端丛生鞭毛；4. 两端丛生鞭毛；
5. 周生鞭毛

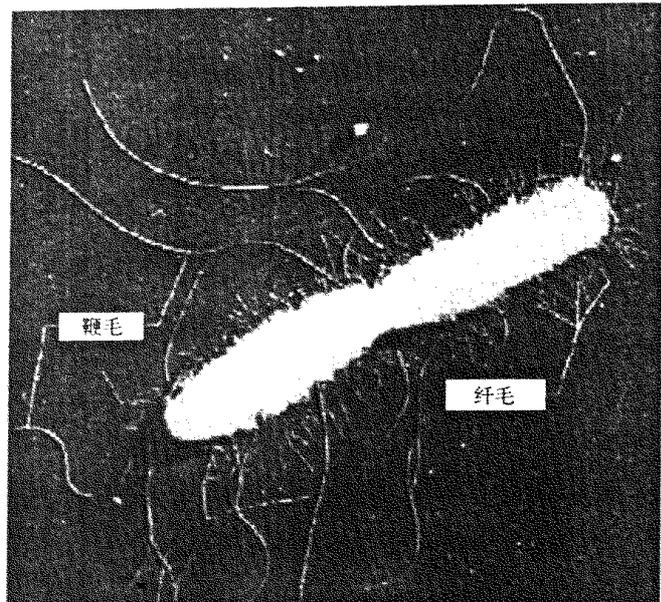


图 3-13 伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*, 直径约 $0.9 \mu\text{m}$)的鞭毛和纤毛

性纤毛的性状介于鞭毛与普通纤毛之间,是一种特殊的纤毛。每个细胞有1~4根性纤毛,其功能是在不同性别的菌株间传递DNA片断,有的性纤毛还是RNA噬菌体的吸附受体。

7. 芽孢 生长到一定时期,某些细菌的细胞质浓缩凝集,逐步形成一个圆形、椭圆形或圆柱形的抗逆性休眠体,称为芽孢或内生孢子(endospore)。芽孢壁厚而致密,折光性强,不易着色,通透性差,水含量低,酶含量少,代谢活力低,对高温、干燥、辐射、酸、碱和有机溶剂等具有极强的抵抗能力。

芽孢的抗逆性与芽孢的以下特性有关:① 芽孢壁厚而致密、不易透水。芽孢分三层:外层(外壳层)主要由硬蛋白组成,疏水性氨基酸含量很高;中层(皮层)由肽聚糖构成,含大量吡啶二羧酸;内层(孢子壁)由肽聚糖构成,较薄,包围芽孢的细胞质和核质。② 原生质高度脱水。芽孢的含水率低,一般只在40%左右,芽孢内代谢活动停止。③ 芽孢的皮层中含有大量吡啶二羧酸(dipicolinic acid,简称DPA),主要以钙盐形式存在,占芽孢干重的5%~15%。DPA的大量存在是芽孢具有抗热性的重要原因。④ 芽孢中酶含量少,且具有抗热性。

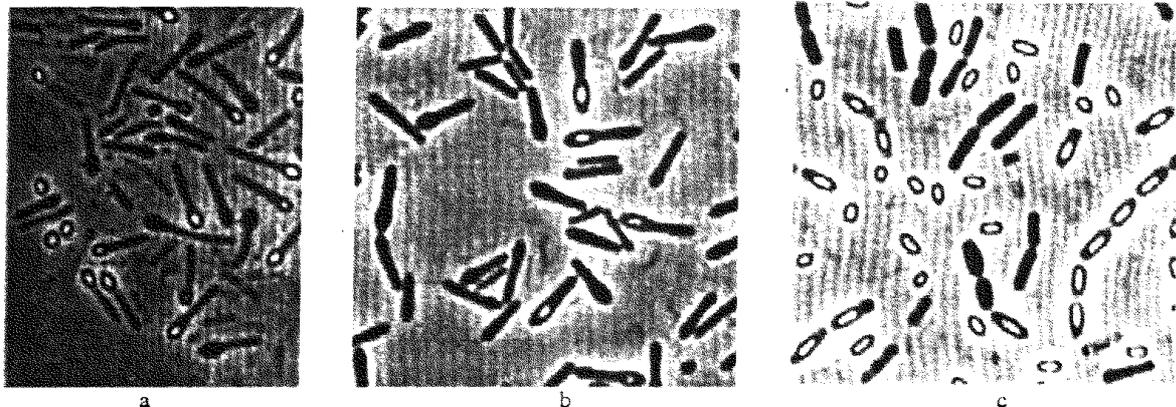


图 3-14 细菌芽孢的形态及位置

- a. 末端；b. 次末端；c. 中间位置

能否形成芽孢,芽孢的形状、大小及其在细胞内的位置(图 3-14)是菌种特征,在分类鉴定上有一定意义。能形成芽孢的细菌种类不多,主要是芽孢杆菌属(*Bacillus*)和梭菌属(*Clostridium*)。它们都是革蓝氏阳性菌,其中后者的芽孢膨大,宽度明显超过菌体(菌体呈梭状)。此外,革蓝氏阳性的芽孢八叠球菌属(*Sporosarcina*)和革蓝氏阴性的脱硫肠状菌属(*Desulfotomaculum*)和少数弧菌属(*Vibrio*)的细菌也能形成芽孢。

芽孢萌发可生成新菌体。一个细菌只形成一个芽孢,一个芽孢也只能产生一个菌体,因此芽孢不是细菌的繁殖体。

(三)细菌的繁殖与培养特征

1. 细菌的繁殖 裂殖是细菌最普遍、最主要的繁殖方式。球菌的分裂方式与其细胞的排列密切相关。

杆菌和螺旋菌在分裂前先延长菌体,然后垂直于长轴分裂。分裂后两个子细胞大小基本相等,称为同型分裂。若分裂后两个子细胞大小不等,则称为异型分裂,此种情况偶尔出现于陈旧培养基中。少数细菌进行出芽繁殖。还有少数细菌能进行有性结合,通过性纤毛传递遗传物质,但频率很低。

2. 细菌的培养特征 细菌在固体培养基、半固体或液体培养基里的生长特征是不同的:

(1)固体培养基上的培养特征:一个或少数几个细菌生长于固体培养基上所形成的肉眼可见的微生物群体,称为菌落(colony)。在一定条件下,细菌菌落具有一定的特征,且有稳定性和专一性,可用于判别细菌纯度,辨认和鉴定菌种。菌落特征(图 3-15)包括大小、形状、光泽、颜色、硬度、透明度等许多方面。

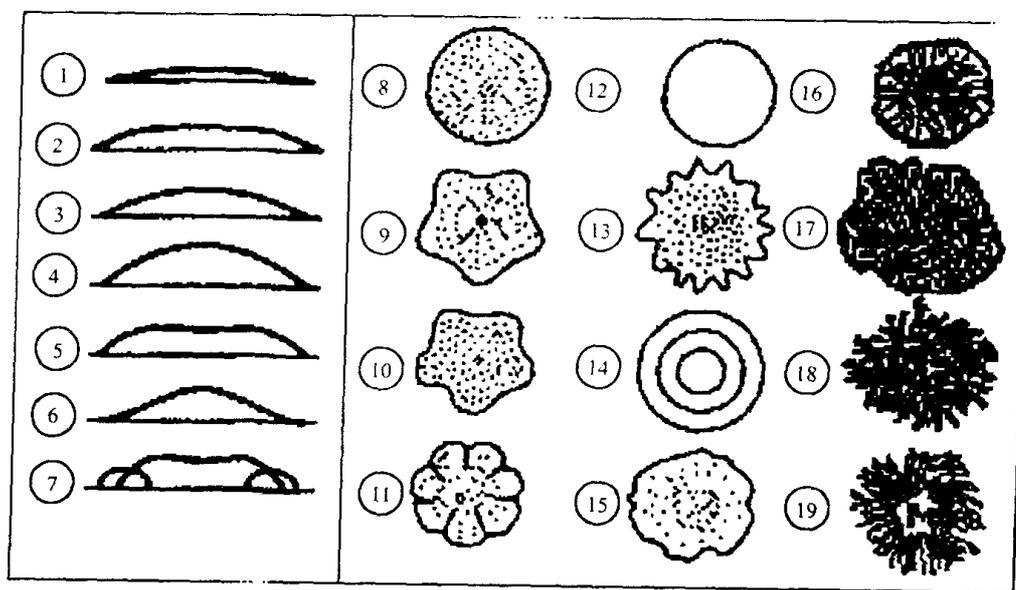


图 3-15 细菌菌落特征

纵剖面:①扁平;②隆起;③低凸起;④高凸起;⑤脐状;⑥草帽状;⑦乳头状

表面结构、形状及边缘:⑧圆形,边缘整齐;⑨不规则,边缘波浪;⑩不规则,颗粒状,边缘叶状;⑪规则,放射状,边缘花瓣形;⑫规则,边缘整齐,表面光滑;⑬规则,边缘齿状;⑭规则,有同心环,边缘完整;⑮不规则,似毛毯状;⑯规则,似菌丝状;⑰不规则,卷发状,边缘波状;⑱不规则,丝状;⑲不规则,根状

用含菌样品或菌种在平板或斜面上画线,经过培养,固体培养基上可出现密集的细菌细胞。这些长成一片的细菌群体,称为菌苔(lawn)。斜面菌苔(图 3-16)也可作为菌种鉴定的参考

依据。

(2)半固体培养基上的培养特征:以穿刺接种法将细菌接种至0.3%~0.5%琼脂半固体培养基中,如果细菌不长鞭毛,只能在穿刺线上生长;如果长鞭毛,则不但在穿刺线上生长,也在穿刺线的周围扩散生长。不同属、种的细菌有不同的扩散生长状态(图3-17)。

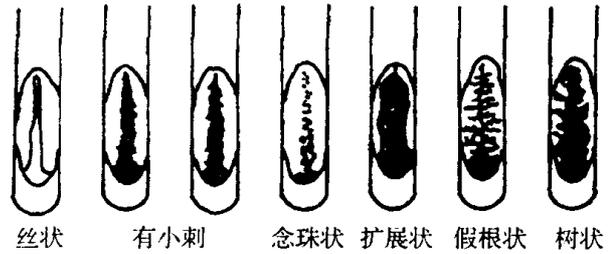


图 3-16 细菌斜面培养特征



图 3-17 细菌穿刺培养特征

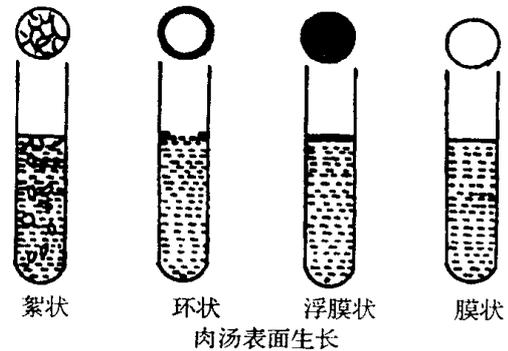


图 3-18 细菌液体培养特征

(3)液体培养基中的培养特征:在液体培养基中,细菌生长能使培养基混浊,混浊情况因细菌对氧气要求不同而有区别:需氧菌仅使培养液上部混浊,厌氧菌仅使培养液下部混浊,兼性厌氧菌使培养液均匀混浊。有的细菌可在培养液表面形成菌环或菌膜或在底部产生絮状沉淀,有的产生气泡、色素(图3-18)。细菌在液体培养基中的培养特征也是分类鉴定的依据之一。

二、放线菌

放线菌是原核微生物。菌体形态为分枝丝状,在固体培养基上呈辐射状生长并由此得名。革兰氏染色阳性,不能运动,大多数是腐生菌,少数是寄生菌。放线菌对国民经济具有十分重要的作用,许多医用和农用抗生素都是由放线菌产生的。

(一)放线菌的形态

大部分放线菌由分枝状菌丝组成。菌丝大多无隔膜,属单细胞,直径与杆状细菌差不多,大约 $1\mu\text{m}$ 。细胞壁含有N-乙酰胞壁酸与二氨基庚二酸,不含几丁质与纤维素。根据形态与功能的不同,放线菌的菌丝可分为基内菌丝、气生菌丝与孢子丝。

1. 基内菌丝 基内菌丝(substrate mycelium)又称营养菌丝(vegetative mycelium)或初级菌丝(primary mycelium),生长在培养基内,主要功能是从基质中吸收营养物质。链霉菌的基内菌丝无隔膜,多分枝,直径 $0.2\sim 1.0\mu\text{m}$,有的无色,有的产生色素,呈红、橙、黄、绿、蓝、紫、褐、黑等不同颜色。色素有水溶性的,也有脂溶性的。水溶性色素可渗入培养基内,将培养基染上相应的颜色;非水溶性色素仅使菌落呈现相应的颜色。放线菌基内菌丝的形态特征各不相同。例如,诺卡氏菌(*Nocardia* sp.)基内菌丝强烈弯曲如树根状,生长到一定菌龄后,产生横

隔膜并断裂成不同形状的杆状菌体。又如,束丝放线菌(*Actinosynnema*)的基内菌丝与气生菌丝一起扭成菌丝束,屹立在基质表面,好似刚出土的“竹笋”。

2. 气生菌丝 气生菌丝(aerial mycelium)又称二级菌丝(secondary mycelium),是指从基内菌丝长出培养基外伸向空间的菌丝。在显微镜下观察,气生菌丝颜色较深,直径也比基内菌丝粗,约 $1\sim 1.4\ \mu\text{m}$,直或弯曲,有的产生色素。

3. 孢子丝与分生孢子 放线菌生长至一定阶段,在气生菌丝上分化出产生孢子的菌丝,称为孢子丝。孢子丝的形状及其在气生菌丝上的排列方式因菌种而异。孢子丝的形状有直形、波浪形、螺旋形之分(图 3-19)。螺旋状孢子丝的螺旋结构与长度均很稳定,螺旋数目、疏密程度、旋转方向等都是菌种特征。有的孢子丝交替着生,有的丛生或轮生。孢子丝从一点分出三个以上的孢子枝,称轮生枝。它有一级轮生和二级轮生之分。轮生类群的孢子丝多为二级轮生。这些特征是放线菌菌种鉴定的重要依据。



图 3-19 放线菌孢子丝类型

孢子丝生长到一定阶段断裂为孢子,即称分生孢子(conidium)。孢子有球形、椭圆形、杆形、瓜子形等不同形状。在电镜下可见孢子表面结构,有的光滑,有的带小疣,有的生刺或毛发状。孢子常具有不同色素。孢子形状、表面结构、颜色特征等也是鉴定放线菌菌种的依据。

(二)放线菌的繁殖和培养特征

放线菌主要由孢子丝通过横割分裂的方式形成分生孢子,再由分生孢子进行繁殖;也可借菌丝断裂的片段形成新的菌体。后一种繁殖方式常见于液体培养中。

放线菌菌落可分为两类:

① 由产生大量气生菌丝的菌种所形成的菌落,以链霉菌的菌落为典型代表(图 3-20)。链

霉菌菌丝较细,生长缓慢,菌丝分枝互相缠绕,形成的菌落质地致密,表面呈紧密的绒状或坚实、干燥、多皱,菌落较小而不致广泛延伸。营养菌丝长在培养基内,菌落与培养基结合较紧,不易挑起或整个菌落被挑起而不致破碎。由于幼龄菌落的气生菌丝尚未分化成孢子丝,故菌落表面与细菌菌落相似而不易区分。当气生菌丝分化成孢子丝,并形成大量孢子而布满菌落表面时,就可产生外观为绒状、粉末状或颗粒状的典型放线菌菌落。有些种类的孢子含有色素,如果与基内菌丝颜色不同,则可使菌落表面与背面呈现不同颜色。

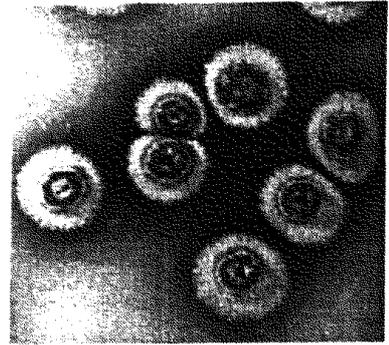


图 3-20 链霉菌菌落

② 由不产生大量气生菌丝的菌种所形成的菌落,以诺卡氏菌的菌落为典型代表。诺卡氏菌的菌落一般只有基内菌丝,结构松散,粘着力差,结构呈粉质状,用针挑起则易破碎。在光学显微镜下观察,放线菌菌落周围可见放射状菌丝。放线菌菌落常具土腥味。

用液体培养基静置培养放线菌,可在容器内壁液面处形成斑状或膜状培养物,或沉降到底部而不使培养基混浊。若振荡培养,则往往形成由菌丝体构成的球状颗粒。

(三)放线菌的代表属

1. 链霉菌属(*Streptomyces*) 链霉菌属有发育良好的分枝状菌丝体,菌丝无隔膜,直径约 $0.4\sim 1\ \mu\text{m}$,长短不一,多核。菌丝体有营养菌丝、气生菌丝和孢子丝之分。孢子丝再形成分生孢子。链霉菌主要借分生孢子繁殖,其生活史如图 3-21 所示。

链霉菌属包含 1 000 余种链霉菌。大多生长在含水量较低,通气良好的土壤中。链霉菌能分解纤维素、石蜡以及各种碳氢化合物。链霉菌是产生抗生素菌株的主要来源。许多常用的抗生素(如链霉素、土霉素、博来霉素、丝裂霉素、制霉菌素、卡那霉素,井冈霉素等)都是链霉菌的次生代谢产物。

2. 诺卡氏菌属(*Nocardia*) 诺卡氏菌属又称原放线菌属(*Proactinomyces*),在培养基上形成典型的菌丝体。菌丝纤细,多数弯曲如树根状,一般生长到十几小时开始形成横隔膜,并断裂成多形态的杆状、球状或带叉的杆状体。诺卡氏菌属中大多数种无气生菌丝,只有基内菌丝,菌落秃裸;有的则在基内菌丝体上覆盖一层极薄的气生菌丝。菌落小于链霉菌,表面多皱,致密干燥或平滑凸起不等,有黄、黄绿、红橙等颜色。

利福霉素由地中海诺卡氏菌(*N. mediterranei*)产生。有些诺卡氏菌可用于石油脱蜡、烃类发酵以及含脂污水处理。

3. 游动放线菌属(*Actinoplanes*) 游动放线菌属以基内菌丝为主,有的气生菌丝发达,有的气生菌丝少,菌丝有隔或无隔。在基内菌丝上生孢囊梗,梗顶端生孢囊,孢囊成熟,释放出有鞭毛、能在水中运动的游动孢子。

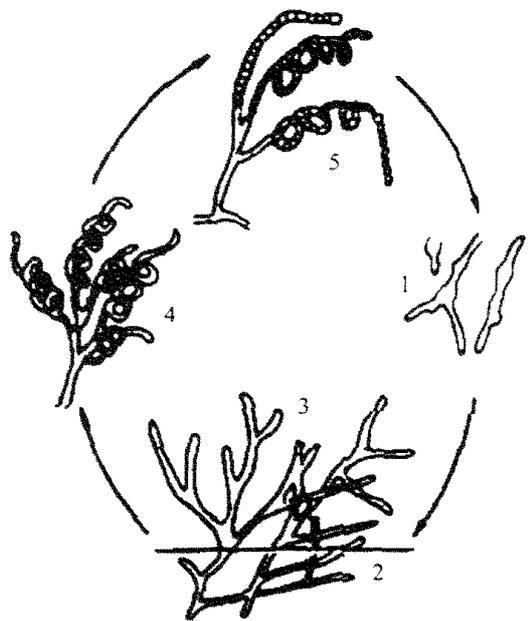


图 3-21 链霉菌的生活史简图

1. 孢子萌发; 2. 基内菌丝体; 3. 气生菌丝体;
4. 孢子丝; 5. 孢子丝分化为孢子

三、蓝细菌

蓝细菌(cyanobacteria)也称蓝藻或蓝绿藻(blue-green algae)。蓝细菌曾作为藻类的一群,现知它们的细胞核为原核,所以归入原核微生物。

(一) 蓝细菌的形态与构造

蓝细菌的基本形态有球状、杆状和长丝状。蓝细菌的最小直径为 $0.5\sim 1\ \mu\text{m}$,最大直径可达 $60\ \mu\text{m}$,巨颤蓝细菌(*Oscillatoria princeps*)是迄今已知的最大的原核生物。蓝细菌体外常具胶质外套,使多个菌体或菌丝集成一团(图 3-22)。蓝细菌没有鞭毛,但能借助于粘液在固体基质表面滑行。蓝细菌的运动有趋光性和趋化性。

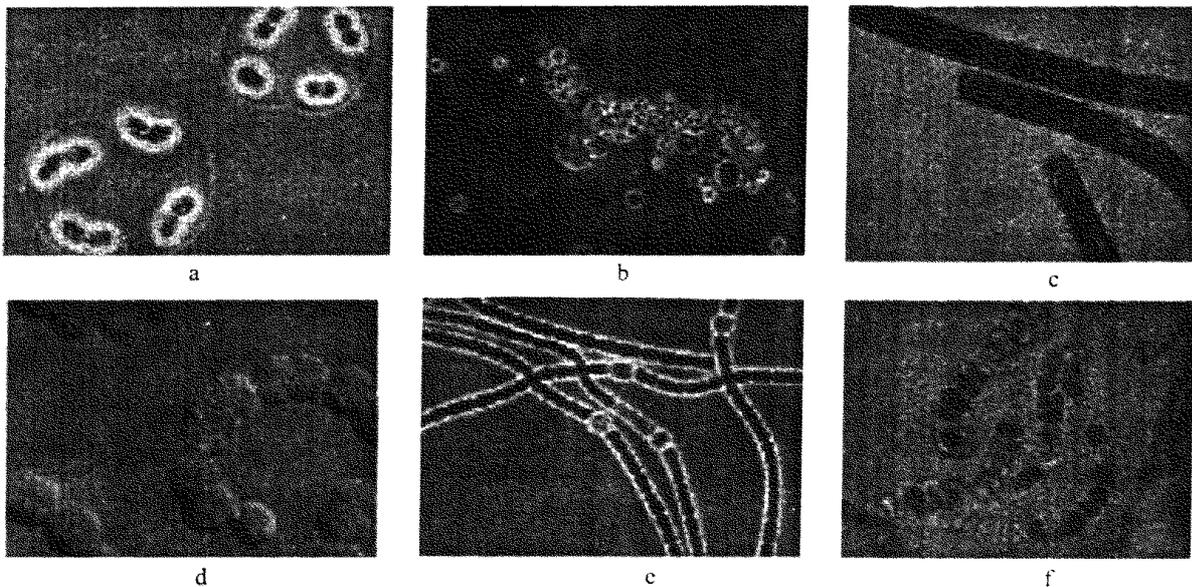


图 3-22 蓝细菌的形态

- a. 单细胞的粘杆菌属(*Gloeobacter*); b. 聚集生长的皮果蓝细菌属(*Dermocarpa*);
- c. 丝状的颤蓝细菌属(*Oscillatoria*); d. 鱼腥蓝细菌的异形胞;
- e. 丝状的、有异形胞的鱼腥蓝细菌属(*Anabaena*); f. 丝状的、分枝的飞氏蓝细菌属(*Fischerella*)

蓝细菌是光能自养型微生物,光合作用释放氧气。多数蓝细菌的光合色素位于类囊体(thylakoid)的片层膜上。类囊体外表整齐排列着由藻胆蛋白(phycobiliproteins)组成的藻胆蛋白体(phycobilisome)颗粒。藻胆素(phycobilin)是蓝细菌所特有的色素,在光合作用中起辅助作用。藻胆素包括藻蓝素(phycocyanobilin)和藻红素(phycoerythrin)。两种色素的比例会因生长条件,尤其是光照条件的变化而改变,菌体的颜色也随之而变。在大多数蓝细菌中,藻蓝素占优势,细胞呈特殊的蓝色,蓝细菌便由此得名。

许多蓝细菌内含气泡(gas vesicle),其作用可能是使菌体漂浮,并使菌体保持在光线最多的地方,以利光合作用。

蓝细菌细胞壁的化学成分与细菌相近,主要由肽聚糖构成,还含有二氨基庚二酸(DAP)。与其他原核生物相比,蓝细菌最独特之处是含有两个或多个双键的不饱和脂肪酸。在细菌中,则多为饱和脂肪酸和一个双键的不饱和脂肪酸。

许多蓝细菌生长异形胞(heterocyst)。它是丝状体中比一般营养细胞稍大、比较透亮的细胞,常为圆形,位于丝状体的中间或顶端,其功能是固定分子态氮。异形胞与相邻营养细胞之间

不仅有细胞接触,而且有物质交换,即光合产物从营养细胞转运至异形胞,而固氮产物则从异形胞转移至营养细胞。

蓝细菌的主要繁殖方式是裂殖。有些蓝细菌可以通过分裂,在母细胞内形成多个球形的小细胞,称为小孢子。母细胞破裂后,释放出小孢子,后者再形成营养细胞。有些蓝细菌可在顶端以不对称的缢缩分裂形成小的单细胞,称为“外生孢子”。由“外生孢子”长成营养细胞。

丝状蓝细菌则可通过无规则的丝状体断裂进行繁殖。有些丝状蓝细菌的营养细胞能分化形成大而厚壁的休眠细胞,称为静息孢子(akinetes)。静息孢子较一般营养细胞大,常含色素,并有贮藏性物质,能抗干燥和低温,可度过不良环境。当条件适宜时,静息孢子可以萌发而形成新的菌丝体。

(二) 蓝细菌的生活特征

蓝细菌是光能自养型微生物,能像绿色植物一样进行产氧光合作用,将二氧化碳同化为有机物。许多蓝细菌具有固氮能力,它们的生活条件、营养要求都不高,只要有空气、阳光、水分和少量无机盐类,便能大量成片生长。

此外,在菌体外面还包有胶质层外套,能耐干旱。例如,有的蓝细菌干标本被保存 80 余年后,再移至适宜环境中,仍能生活。

蓝细菌分布广泛,一般喜中温,但在 80℃ 的温泉及多年不融的冰山上亦可见其踪迹。在正常水体中,蓝细菌是水生生态系统食物链的重要成员。但当它恶性增殖时,可在淡水中形成水华(water bloom),在海洋中形成赤潮(red tide),造成水质污染。

四、古菌

古菌是一群独特的单细胞生物,多生活在地球上的极端生境中,营自养和异养生活。古菌具有特殊的生理功能,如耐超高温、耐高酸碱度、耐高盐以及极端厌氧等;具有独特的细胞结构,如细胞壁骨架为蛋白质或假胞壁酸,细胞膜含甘油醚键;具有独特的酶作用方式,既不同于细菌,也不同于真菌。

古菌可分为五个类群:产甲烷菌、硫酸盐还原菌、极端嗜盐菌、无细胞壁古菌、极端嗜热和超嗜热代谢元素硫的古菌。其中,产甲烷菌与有机污染物的厌氧降解以及废水厌氧生物处理关系密切。产甲烷菌是一群极端厌氧、化能自养或化能异养的微生物,其代谢产物无一例外包括甲烷,并由此得名。

(一) 产甲烷菌的分类

根据形态和所利用的基质,可将产甲烷菌分为三个亚群。亚群 I 呈杆状、柳叶状或球状,能利用 H_2/CO_2 、甲酸盐、甲醇产生甲烷,细胞壁含假胞壁酸,该亚群共有 5 个属。亚群 II 呈杆状、球杆状、螺旋状、盘状,能利用 H_2/CO_2 、甲酸盐、甲醇/ CO_2 产生甲烷;细胞壁不含假胞壁酸,可用去污剂裂解,该亚群共有 8 个属。亚群 III 呈假八叠状、球状、带鞘杆状,能生长于三甲基胺或乙酸盐培养基中,该亚群共有 6 个属。

(二) 产甲烷菌的特性

1. 形态特性 产甲烷菌的细胞壁结构与真细菌明显有别。在革蓝氏阳性的产甲烷菌中,细胞壁含有坚硬的球囊,细胞壁可分一层、二层或三层;在革蓝氏阴性的产甲烷菌中,细胞壁只有一层,没有球囊结构。而在真细菌中,革蓝氏阳性菌的细胞壁仅由一厚层组成(也含球囊结构),革蓝氏阴性菌的细胞壁由三薄层组成。

在真细菌中,革蓝氏阳性菌的细胞壁主要由肽聚糖组成,对青霉素和溶菌酶敏感;革蓝氏

阴性菌的肽聚糖含量较低,对青霉素和溶菌酶具有一定的抗性;产甲烷菌不含肽聚糖,对青霉素和溶菌酶没有反应。

产甲烷菌的细胞膜结构也与真细菌明显有别。产甲烷菌的细胞膜主要由植烷甘油醚或二植烷甘油醚组成,不易水解,耐热性强;而真细菌的细胞膜主要由脂肪酸甘油酯组成,易水解,耐热性差。

2. 生理特性 产甲烷菌的生理特性有以下几方面:

(1) 碳源:除索氏产甲烷杆菌(*Methanobacterium soehngenii*)(厌氧生物处理系统中常见的优势产甲烷菌)只能利用乙酸外,所有产甲烷菌都能利用 H_2/CO_2 作为生长基质,并产生甲烷;绝大多数产甲烷菌还能利用甲酸;产甲烷八叠球菌(厌氧生物处理系统中常见的优势产甲烷菌)不能利用甲酸,但能利用甲醇、甲胺、乙酸。总的来看,产甲烷细菌的碳源较窄,只能利用乙酸和一碳化合物。

(2) 生长因子:有些产甲烷菌必需某些维生素,尤其是 B 族维生素。

(3) 微量元素:一些产甲烷菌需要某些微量元素。添加镍、钴和钼等微量元素有利于它们的生长。

(4) 独特的辅酶:产甲烷细菌具有其他微生物所没有的独特的辅酶 F_{420} 、辅酶 M、二氧化碳还原因子等。

3. 产甲烷反应 产甲烷菌可以利用 H_2/CO_2 、甲酸、甲醇、乙酸及甲基胺形成甲烷。

(1) 由 H_2/CO_2 产生甲烷: $4H_2 + HCO_3^- + H^+ \longrightarrow CH_4 + 3H_2O$

(2) 由甲酸产生甲烷: $4HCOO^- + 4H^+ \longrightarrow CH_4 + 3CO_2 + 2H_2O$

(3) 由甲醇产生甲烷: $CH_3OH \longrightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2H_2O$

(4) 由乙酸产生甲烷: $CH_3COO^- + H^+ \longrightarrow CH_4 + 3CO_2$

(5) 由甲基胺产生甲烷: $4CH_3NH_3^+ + 3H_2O \longrightarrow 3CH_4 + H_2CO_3 + 4NH_4^+$

复习思考题

1. 简述病毒的结构。
2. 什么叫烈性噬菌体? 简述烈性噬菌体的生活周期。
3. 什么叫温和噬菌体? 简述溶原性细菌的特征。
4. 简述一步生长曲线的特征。
5. 亚病毒可分为哪三个类群? 各有什么特点?
6. 细菌的基本形态有哪些? 其中球菌有哪些排列方式?
7. 细菌的基本结构和特殊结构各有哪些?
8. 简述革兰氏染色与细菌细胞壁的关系。
9. 什么叫荚膜? 可分为哪几种类型?
10. 什么叫鞭毛和纤毛? 各有什么作用?
11. 为什么芽孢具有很强的抗逆性?
12. 什么叫菌落? 简述细菌在固体和液体培养基上的生长特征。
13. 简述放线菌菌丝的形态特征和固体培养基上的菌落特征。
14. 简述蓝细菌的形态和构造。
15. 简述产甲烷菌的特性。

第四章 微生物的主要类群(Ⅱ)

地球环境中的微生物资源极其丰富,除了第三章介绍的病毒和原核微生物外,还有真核微生物(eukaryotic microorganism)(图 4-1)。本章着重介绍真菌、藻类和原生动物。

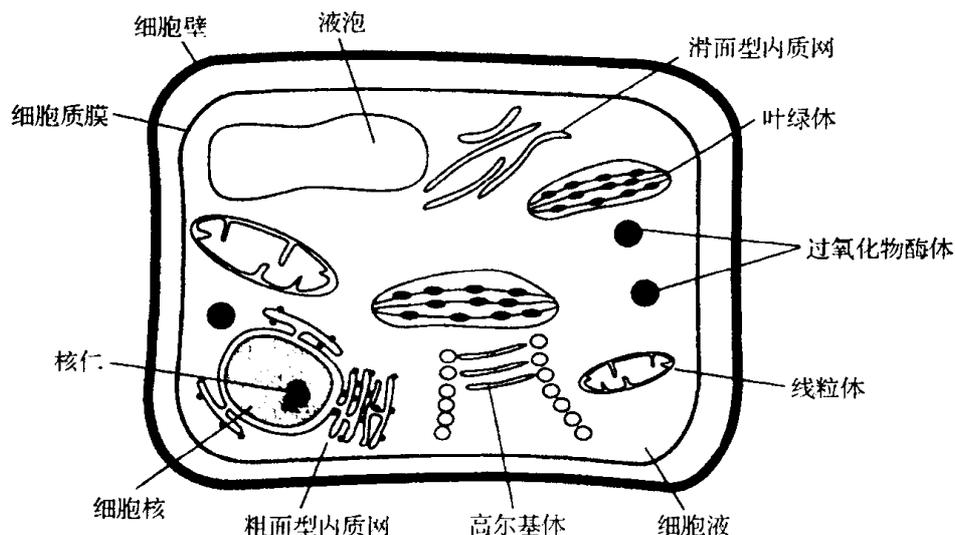


图 4-1 真核微生物的细胞结构模式图

第一节 真菌

一、真菌的细胞结构

真菌的细胞结构一般包括细胞壁、原生质膜、细胞核、细胞质、边体以及线粒体、核糖体、内质网、高尔基体、液泡等细胞器。

(1) 细胞壁:真菌细胞壁厚约 100~250 nm,占细胞干物质的 30%,起着维持细胞形状的作用。细胞壁的主要成分是己糖或氨基己糖构成的多聚糖(如几丁质、纤维素、葡聚糖、甘露聚糖等),此外还有蛋白质、类脂、无机盐等。

(2) 原生质膜:真菌细胞的原生质膜主要由脂类和蛋白质组成,含有甾醇。除原生质膜外,还有核膜、线粒体膜和液泡膜等。

(3) 细胞核:真菌细胞核通常为椭圆形,直径为 2~3 μm ,能通过菌丝隔膜上的小孔在菌丝中移动。核中有核仁,核仁除 DNA 外还含有 RNA。核膜一般为两层,厚 8~20 nm。

膜上有小孔,以利核内外物质交流。核膜孔径大小差异很大,孔的数量随菌龄而增多。外层核膜上常有核蛋白附着。

(4) 边体(lomasome):边体是某些真菌细胞的特殊膜结构,位于细胞壁和细胞膜之间。形

态变化很大,有管状、囊状、球状、卵圆形或多层折叠膜等。边体与细菌的间体相似,因而被称为“真菌间体”。

(5) 线粒体(mitochondria):线粒体是含有 DNA 的细胞器。它具有双层膜,内层较厚,常向内延伸形成嵴。线粒体的形态、数量和分布常因真菌种类和发育阶段而异。线粒体是细胞能量代谢的中心。

(6) 核蛋白体:真菌细胞中存在两种核蛋白体,即细胞质核蛋白体和线粒体核蛋白体。细胞质核蛋白体直径为 20~25 nm,由 RNA 和蛋白质组成,是蛋白质合成的场所。有的核蛋白体呈游离状态,有的与内质网和核膜结合。线粒体核蛋白体位于线粒体内。

(7) 内质网(endoplasmic reticulum):它是存在于细胞质中折叠的膜系统。核蛋白体附着在内质网表面,形成粗糙型内质网;没有核蛋白体附着的内质网,称为光滑型内质网。内质网沟通细胞的各个部分,它与细胞质膜、细胞核、线粒体等都有联系。内质网是细胞中各种物质的转运系统。

(8) 高尔基体(Golgi body):高尔基体仅发现于少数真菌中,大多呈网状,少数鳞片状、颗粒状或杆状,均匀分布于核的周围,往往与内质网相连。高尔基体与细胞的分泌机能有关,也与细胞膜的形成以及碳水化合物的合成有关。

二、真菌的菌丝和菌丝体

大多数真菌的营养体是由菌丝(hypha)构成的菌丝体(mycelium)。菌丝的宽度约 5~10 μm ,比细菌和放线菌宽几倍到几十倍。真菌的菌丝可分为无隔膜菌丝和有隔膜菌丝(图 4-2)。无隔膜菌丝是长管状的单细胞菌丝,没有隔膜,内含多个核;生长过程表现为菌丝的延长、细胞核的增多以及细胞质的增加。绝大多数卵菌和接合菌的菌丝为无隔膜菌丝。有隔膜菌丝是有隔膜分隔的多细胞菌丝,每个细胞内含有一个或多个细胞核,横隔膜上具有小孔,细胞质和细胞核都能自由流通,因此每个细胞的功能相同。子囊菌和担子菌的菌丝为有隔膜菌丝。

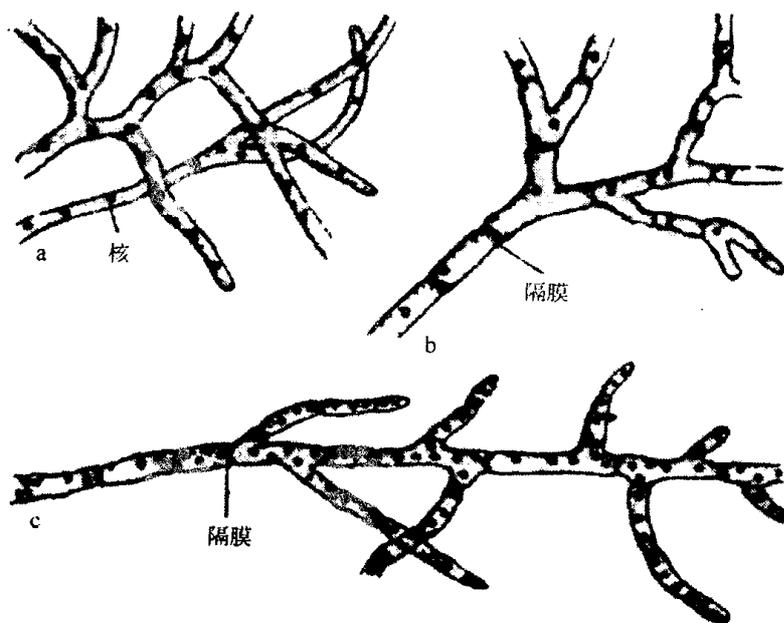


图 4-2 霉菌菌丝

a. 无隔膜多核菌丝; b. 有隔膜单核菌丝; c. 有隔膜多核菌丝

根据生理功能的不同,真菌的菌丝还可分为营养菌丝和繁殖菌丝。营养菌丝是伸入培养基内吸取营养物质的菌丝。真菌的营养菌丝可发生多种变态,以便更有效地摄取养料。常见的变态营养菌丝有匍匐菌丝、假根、吸器、菌环、菌网等。

三、真菌的繁殖

真菌的繁殖方式可分为无性繁殖和有性繁殖。无性繁殖是指不经过两性生殖细胞的结合,便产生新的个体的繁殖方式。有性繁殖则是指通过两性生殖细胞(如雄配子和雌配子)结合,产生新的个体的繁殖方式。

(一)无性繁殖

1. 无性繁殖的类型 真菌的无性繁殖包括:① 由菌丝体的断裂片段产生新个体,大多数真菌都能进行这种无性繁殖。② 由营养细胞分裂产生子细胞。③ 出芽繁殖,母细胞出“芽”,每个“芽”成为一个新个体。④ 产生无性孢子,每个孢子萌发为新个体。

2. 无性孢子 无性繁殖过程所产生的孢子称为无性孢子。无性孢子的形状、颜色、排列以及产生方式都是菌种特性,可作为鉴定菌种的依据。常见的无性孢子如图 4-3 所示。

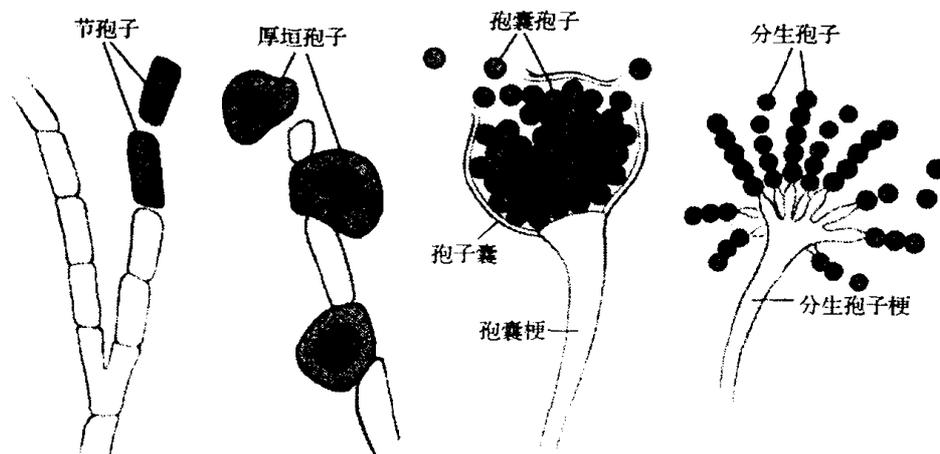


图 4-3 主要的真菌无性孢子

(1) 孢囊孢子(sporangiospore):孢囊孢子由孢子囊产生。孢子囊由气生菌丝顶端膨大,下方生隔与菌丝隔断而成。孢子囊下方的菌丝,称为孢囊梗,孢囊梗深入孢子囊内的部分,称囊轴。孢囊孢子成熟后,孢子囊破裂,孢子散出或从孢子囊上的管口或孔口溢出。产生孢囊孢子的霉菌有毛霉属(*Mucor*)和根霉属(*Rhizopus*)等。在液体培养基中,毛霉和根霉还能出芽繁殖,形成“酵母型”芽孢子(budding spore)。

(2) 分生孢子(conidium):分生孢子是菌丝顶端或分生孢子梗顶端细胞分割缢缩而形成的单个或成簇的孢子。青霉属(*Penicillium*)和曲霉属(*Aspergillus*)等可形成分生孢子。

(3) 节孢子(arthrospore):节孢子是菌丝生长到一定阶段,分隔断裂而成的孢子,又称粉孢子。

(4) 厚垣孢子(chlamydospore):厚垣孢子是在菌丝顶端或中间,一部分原生质浓缩、变圆,细胞壁加厚而形成的孢子,又称厚壁孢子。

(二)有性繁殖

1. 有性繁殖过程 有性繁殖以细胞核的结合为特征,通过配子、配子囊、菌体之间的结合来实现。有性繁殖过程一般包括以下三个阶段:① 质配,两个细胞的原生质融合;② 核配,

两个细胞的细胞核融合；③ 减数分裂，核配后进行减数分裂，使染色体由双倍体变为单倍体。真菌的有性生殖一般通过性细胞的结合，产生一定形态的有性孢子。

2. 有性孢子 常见的有性孢子如图 4-4 所示。

(1) 卵孢子(oospore): 卵菌的有性孢子为卵孢子。繁殖时菌丝生出藏卵器和雄器，雄器的核移入藏卵器并与其中的卵球结合形成双倍体的卵孢子。卵孢子可能一个，也可能多个，因种而异。

(2) 接合孢子(zygospore): 接合菌的有性孢子为接合孢子。来自不同菌丝的配子囊互相接触，接触处的胞壁溶解，双方的细胞质和细胞核彼此融合，即可形成一个双倍体的接合孢子。

(3) 子囊孢子(ascospore): 子囊菌的有性孢子为子囊孢子。双核菌丝产生幼小子囊，其中的双核先进行核配，接着进行减数分裂，产生四个新核，再分裂一次形成八个核，最后以核为中心逐步形成单倍体的子囊孢子。一个典型的子囊内通常有八个子囊孢子。

(4) 担孢子(basidiospore): 担子菌的有性孢子为担孢子。担孢子的形成过程与子囊孢子相似，不同的是：核配后减数分裂所形成的四个核不再分裂；以核为中心所形成的担孢子最终在担子外部形成；担子有生纵隔膜的，也有生横隔膜的，多数单室无隔。

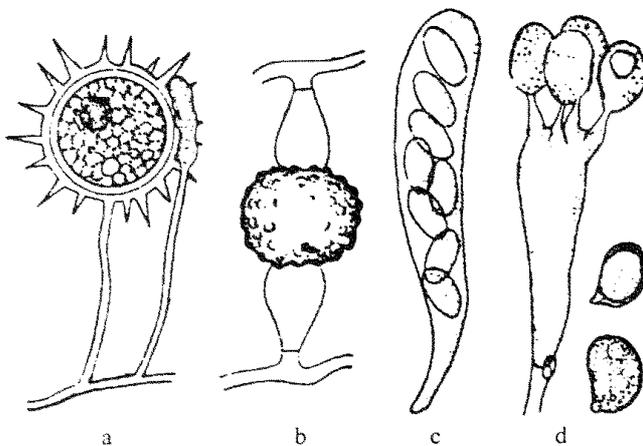


图 4-4 主要的真菌有性孢子

a. 卵孢子 b. 接合孢子 c. 子囊孢子 d. 担孢子

四、真菌的菌落特征

习惯上将真菌分为霉菌和酵母菌。前者的营养体多为丝状体，后者的营养体多为单细胞个体。与放线菌一样，霉菌的菌落也由分枝状菌丝组成；因菌丝较粗而长，形成的菌落较疏松，呈绒毛状、絮状或蜘蛛网状，一般比细菌菌落大几倍到几十倍(图 4-5)。有些霉菌生长很快，菌丝在固体培养基表面蔓延，以至菌落没有固定大小。有的霉菌菌落生长较慢，直径只有 1~2 cm 或更小。菌落表面常有肉眼可见的结构和颜色特征，这是因为霉菌孢子有不同的形状、构造和颜色。有的霉菌分泌水溶性色素，溶于培养基后使菌落背面呈现不同颜色。处于菌落中心的菌丝菌龄较大，位于边缘的菌丝则菌龄较小。霉菌菌落往往具有“霉味”。在不同培养基上，同一种霉菌的菌落特征稍有变化；但在特定培养基上，菌落特征(如形状、颜色等)相对稳定。菌落特征是鉴定霉菌的重要依据之一。

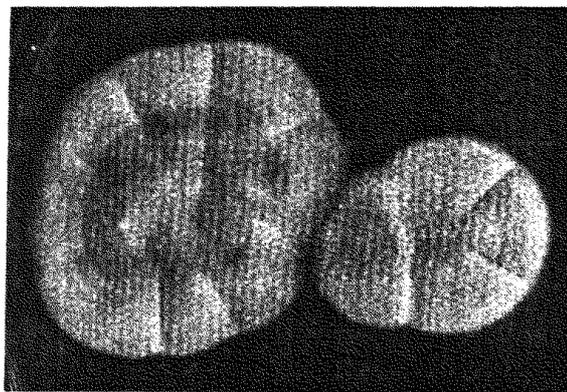


图 4-5 典型的霉菌菌落

酵母菌菌落与细菌菌落有些相似，但较细菌菌落大而厚，一般呈油脂或蜡脂状，表面光滑、湿润、呈乳白色或红色。培养时间过长会使菌落表面皱缩。酵母菌菌落往往有“酒香味”。

五、真菌的分类

(一)分类系统简介

1959年,魏塔克(Wittaker)在建立生物分类的四界系统时,首次将真菌从植物界中独立出来,创建了真菌界。1969年,魏塔克又将四界系统调整为五界系统,并确立了真菌在生物分类系统中的地位。

1995年,《真菌字典》(第八版)将原来的真菌界划分为原生动物界(Protozoa)、藻界(Chromista)和真菌界(Fungi);再将真菌界划分为壶菌门、接合菌门、子囊菌门和担子菌门,将原来的半知菌改称为有丝分裂孢子真菌。1996年,《真菌概论》(第四版)则将无丝分裂孢子真菌放在子囊菌门。

目前我国基本上采用了《真菌字典》(第八版,1995)的真菌分类系统。鉴于半知菌亚门(Deuteromycotina)已在我国实用多年并有其独立性,将其归入子囊菌门有些勉强,因此我国依然沿用半知菌类而独立论述。

本书采用壶菌门、接合菌门、子囊菌门、担子菌门和半知菌类的分类系统。

(二)真菌的代表属

1. 壶菌 壶菌大多水生,菌丝无隔膜,多核。无性繁殖时产生的无性孢子为有鞭毛的游动孢子,有性孢子为卵孢子。

腐霉属(*Pythium*)归入壶菌门,卵菌纲,霜霉目,腐霉科。腐霉菌丝体可在培养基上或瓜果上集生,呈白绒毛状,很像棉花。在显微镜下观察,菌丝无色透明、无隔多核、有分枝。孢子囊呈管状(或膨大的管状)和球状,没有孢囊梗的分化。当条件合适时,孢子囊上生出一个球形的泡囊,泡囊里的内含物迅速流入泡囊,在泡囊内分化成游动孢子。游动孢子常为肾形,侧面凹处生两根鞭毛,成熟时泡囊破裂,孢子四散(图4-6)。

有性生殖产生藏卵器和雄器。藏卵器分化为卵球与卵周质。藏卵器初期多核,分化后只留一核于卵球内,其余的核均在卵周质中分解。雄器最初也有多个核,分化后只留一核,其余逐渐解体。配合时,雄器的细胞核和细胞质通过授精管转入藏卵器内,两核结合形成卵孢子。卵孢子萌发产生芽管,在芽管顶端形成孢子囊。孢子囊产生游动孢子。

腐霉不仅对工农业生产有一定意义,同时也是生物学基础研究的理想材料和教学上常用的典型真菌代表之一。

2. 接合菌 接合菌的菌丝无隔多核。无性繁殖产生不能游动的孢囊孢子,有性繁殖产生接合孢子。

(1) 毛霉属(*Mucor*):归入接合菌门,接合菌纲,毛霉目,毛霉科。在基质上或基质内,毛霉的菌丝体能广泛蔓延,无假根和匍匐枝。孢囊梗直接由菌丝体生出,单生或分枝。分枝类型有两种:一种是单轴式(即总状)分枝,另一种是假轴状分枝。分枝顶端产生球形孢子囊。囊轴形

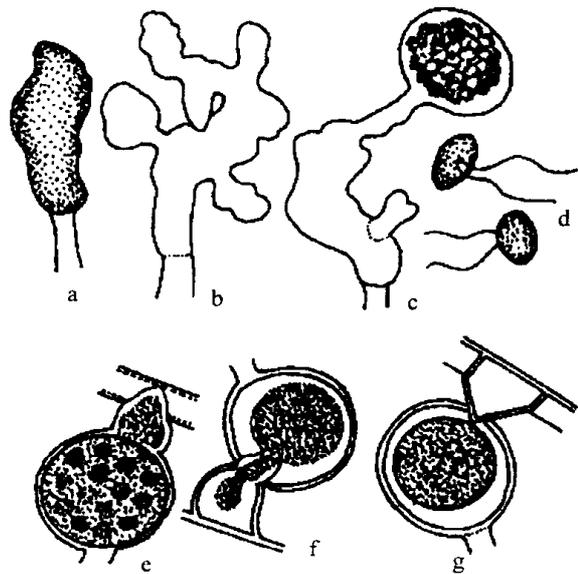


图4-6 瓜果腐霉(*Phythium aphanidermatum*)

a,b. 孢子囊; c. 孢子囊萌发形成泡囊; d. 游动孢子;
e. 藏卵器和雄器; f. 交配; g. 卵孢子的形成

状不一,囊轴与囊柄相连处无囊托。孢子囊成熟后,囊壁消失或破裂,释放孢囊孢子。孢囊孢子球形、椭圆形或其他形状,大多无色,无线状条纹,壁薄而光滑。有性生殖多异宗配合,也有同宗配合。配子囊柄上无附属物。某些种产生厚垣孢子。毛霉属的生活史见图 4-7。

毛霉在自然界分布广泛,土壤、空气中都有很多毛霉孢子。有些毛霉能引起谷物、果品和蔬菜的腐败。多种毛霉能产生蛋白酶,有分解大豆的能力,常用来做豆腐乳。四川豆豉就是用总状毛霉(*Mucor racemosus*)制作的。

(2) 根霉属(*Rhizopus*):分类上与毛霉属同科。根霉与毛霉的主要区别在于:根霉有假根和匍匐菌丝。根霉在培养基或自然基质上生长时,由营养菌丝产生匍匐菌丝向四周蔓延,并由匍匐菌丝生出假根与基质接触。与假根相对处向上长出孢囊梗,顶端形成孢子囊,内生孢囊孢子(图 4-8)。菌丝无隔,只有在匍匐菌丝上形成厚垣孢子时才形成隔膜。孢子囊成熟后,孢囊壁消解或破裂。囊轴明显,球形或近球形,囊轴基部有囊托。孢囊孢子球形、卵形或不规则,有棱角或有线纹、无色或浅褐色、蓝灰色等。接合孢子(图 4-9)由营养菌丝或匍匐菌丝生出配子囊,通过两个同形对生的配子囊结合而成。配子囊柄上无附属物。除有性根霉(*R. sexualis*)为同宗配合外,其他根霉均为异宗配合(图 4-10)。

根霉的用途很广,在我国将它们用于制曲酿酒已有悠久历史。例如,米根霉(*R. oryzae*)的淀粉酶活力很强,常用作糖化菌;匍枝根霉(即黑根霉 *R. stolonifer*)产生果胶酶,常用来生产酶制剂。

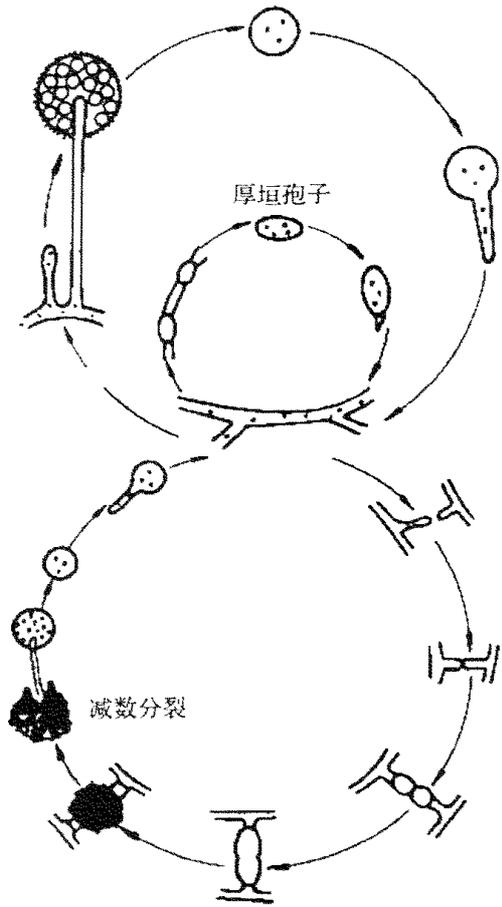


图 4-7 毛霉属的生活史

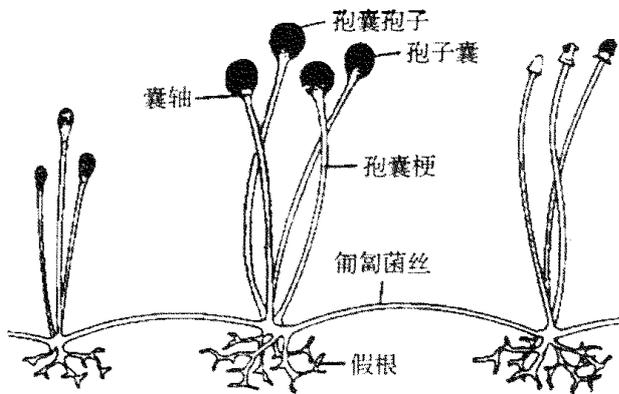


图 4-8 根霉



图 4-9 黑根霉的接合孢子

(3) 犁头霉属(*Adsidia*):也与毛霉属同科。犁头霉的菌丝体似根霉,产生弓形的匍匐菌丝向四周蔓延;并且在同基质接触的部位,生出许多带有分枝的假根。但它与根霉又有差异,犁头

霉的孢囊梗散生在匍匐菌丝中间,假根并不与孢囊梗对生。2~5根孢囊梗成簇,很少单生,而且常成轮状或不规则的分枝。孢子囊顶生,呈洋梨形。孢囊壁薄,成熟后易消失,并残留囊托,似漏斗状。囊轴锥形、近球形或其他形状。孢囊孢子小,单胞,大多无色,无线状条纹。接合孢子着生在匍匐菌丝上,配囊柄对生。由一个或两个配囊柄生出附属物,将接合孢子包围,但有些种没有附属物。异宗配合或同宗配合(图 4-11)。

犁头霉广泛分布在土壤、粪便和酒曲中。空气中也存在它们的孢子,在培养其他微生物时,常受犁头霉孢子的污染。

3. 子囊菌 子囊菌是真菌中最大的类群,它与担子菌被称为“高等真菌”。大多数子囊菌形成菌丝,菌丝有横隔膜。子囊菌的无性繁殖主要产生分生孢子,也有少数子囊菌(如酵母菌)进行芽殖和裂殖。子囊菌的有性繁殖

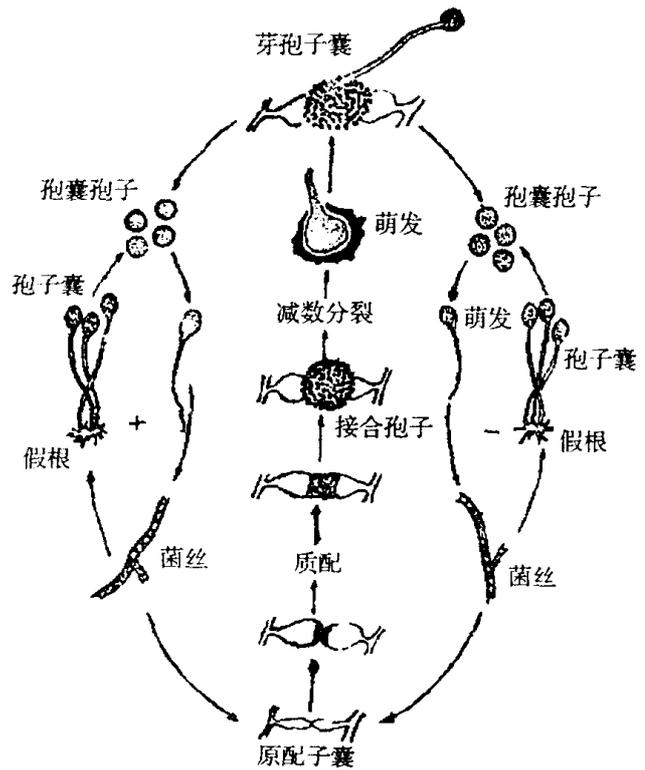


图 4-10 黑根霉(*R. stolonifer*)的生活史

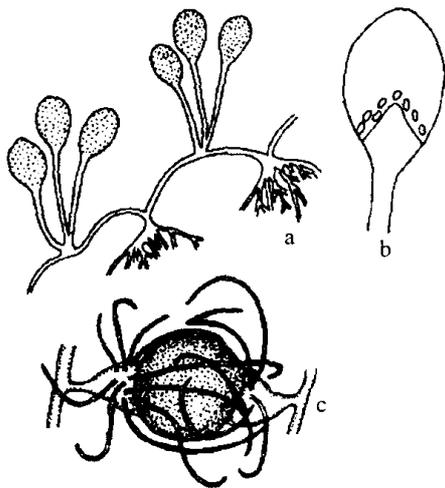


图 4-11 犁头霉属

- a. 孢子囊,孢囊梗,匍匐菌丝,假根;
b. 孢囊和囊轴;c. 接合孢子

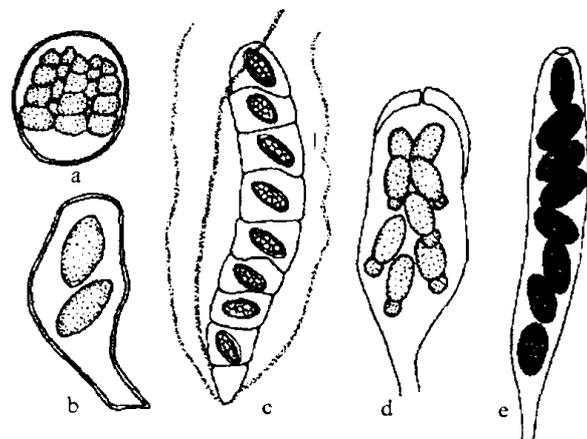


图 4-12 子囊的类型

- a. 球形;b. 广卵形(有柄);c. 有分隔的;
d. 棍棒形;e. 圆柱形

产生子囊孢子,子囊孢子生于子囊(ascus)内。子囊是一种囊状结构,球形、棒形或圆筒形,因种而异(图 4-12)。典型的子囊内有八个子囊孢子。子囊孢子的形状多种多样(图 4-13)。在子囊内,子囊孢子呈单行排列、双行排列或平行排列。

大多数子囊菌的子囊被包裹在一个由菌丝组成的包被内,形成具有一定形状的子实体,称为子囊果(ascocarp,图 4-14)。子囊果有五种类型:①子囊裸生,没有包被,称为裸果;②完全封闭,呈圆球形,称闭囊壳(peritheciun);③不完全封闭,留有孔口,称为子囊壳(perithecium);④开口呈盘状,称为子囊盘(apothecium);⑤子囊单独、成束或成排地着生于子座腔内,不形成真正的子囊果壁,称为子囊腔(locule)。

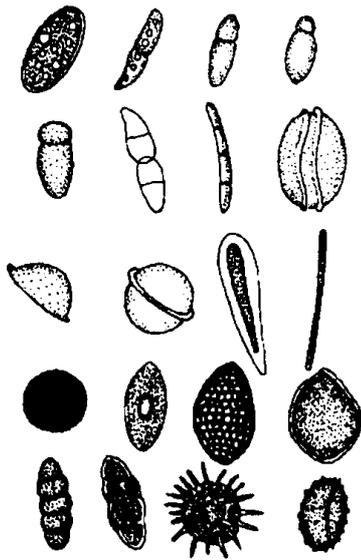


图 4-13 子囊孢子的类型

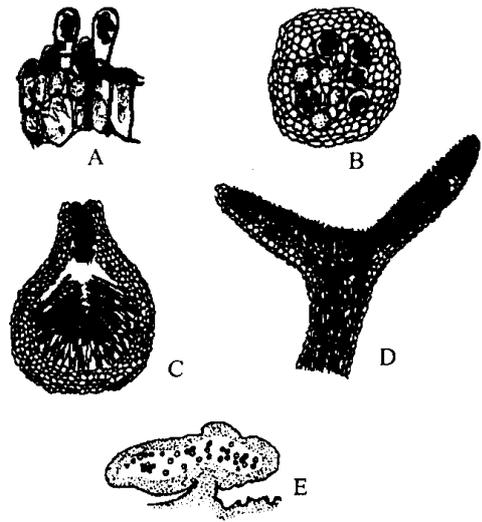


图 4-14 子囊果的类型

a. 裸果(缺子囊包被); b. 闭囊壳;
c. 子囊壳; d. 子囊盘; e. 子囊腔

(1) 酵母属(*Saccharomyces*): 归入子囊菌门, 半子囊菌纲, 内孢霉目, 酵母科。细胞圆形、椭圆形或腊肠形。多数酵母通过芽殖与裂殖进行无性繁殖。芽殖是指由一个母细胞产生一个小突起, 细胞核一分为二, 其中一个核进入小突起, 经过细胞壁逐渐紧缩, 最后脱离母细胞而成为独立个体的过程。母细胞上突起产生的新细胞即为芽孢子。若芽孢子不脱离母体又长新芽, 就形成假菌丝(图 4-15)。芽殖可分为一端芽殖、两端芽殖和多边芽殖等。酵母的裂殖与细菌相似: 首先母细胞伸长, 核一分为二, 在细胞中央长出细胞壁, 将母细胞横截为两个子细胞。酵母菌经有性生殖形成子囊和子囊孢子。子囊成熟时不破裂, 子囊孢子 1~4 个。酵母的发酵产物主要为乙醇和二氧化碳, 不同化乳糖和硝酸盐。

本属最著名的代表种为酿酒酵母(*S. cerevisiae*, 又名啤酒酵母), 分布在土壤、水果表皮、发酵果汁和酒曲中。酿酒酵母不但用于酿造啤酒、酒精以及其他饮料酒, 也用于发面制面包。酵母菌体的维生素和蛋白质含量高, 可食用、药用和饲用; 另外还用作提取核酸、麦角醇、谷胱甘肽、细胞色素 c、凝血质、辅酶 A、腺苷三磷酸等的材料。

(2) 赤霉属(*Gibberella*): 归入子囊菌门, 核菌纲, 球壳目, 肉座菌科。许多赤霉菌是植物的病原菌。赤霉菌的菌丝蔓延于寄主体内, 并在寄主表面产生大量白色或粉红色的分生孢子。在固体培养基上形成白色、较紧密的绒毛状菌落。

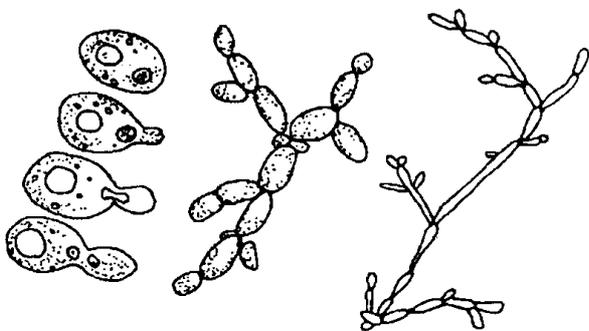


图 4-15 酵母菌的芽殖及假菌丝

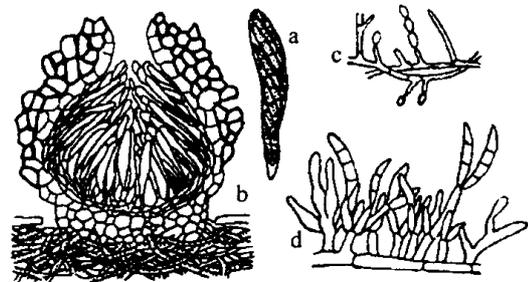


图 4-16 赤霉属

a. 子囊; b. 子囊壳; c. 分生孢子梗及小分生孢子;
d. 分生孢子梗及大分生孢子

赤霉菌的无性过程产生分生孢子。分生孢子有大、小两种,大型分生孢子为镰刀形,中间有3~5个隔膜。大小分生孢子都可萌发而形成新的菌丝体。赤霉菌的有性生殖产生子囊和子囊孢子。子囊长棒状,内含八个子囊孢子。子囊着生于子囊壳内(图4-16)。

赤霉菌能分泌赤霉素(gebberellin, 曾称“九二〇”),是一种植物激素,能促进各种作物和蔬菜的生长。

(3) 脉孢菌属(*Neurospora*): 归入子囊菌门,核菌纲,球壳目,粪壳科。脉孢菌因子囊孢子表面有纵形花纹,犹如叶脉而得名,又称链孢霉。

脉孢菌的菌落最初为白色粉粒状,很快变为桔黄色,绒毛状。分生孢子着生于直立、双叉分枝的分生孢子梗上,成链。分生孢子卵圆形、粉红色或桔黄色。分生孢子成熟后飞散出去,遇到适合的基质,萌发产生新的菌丝体。

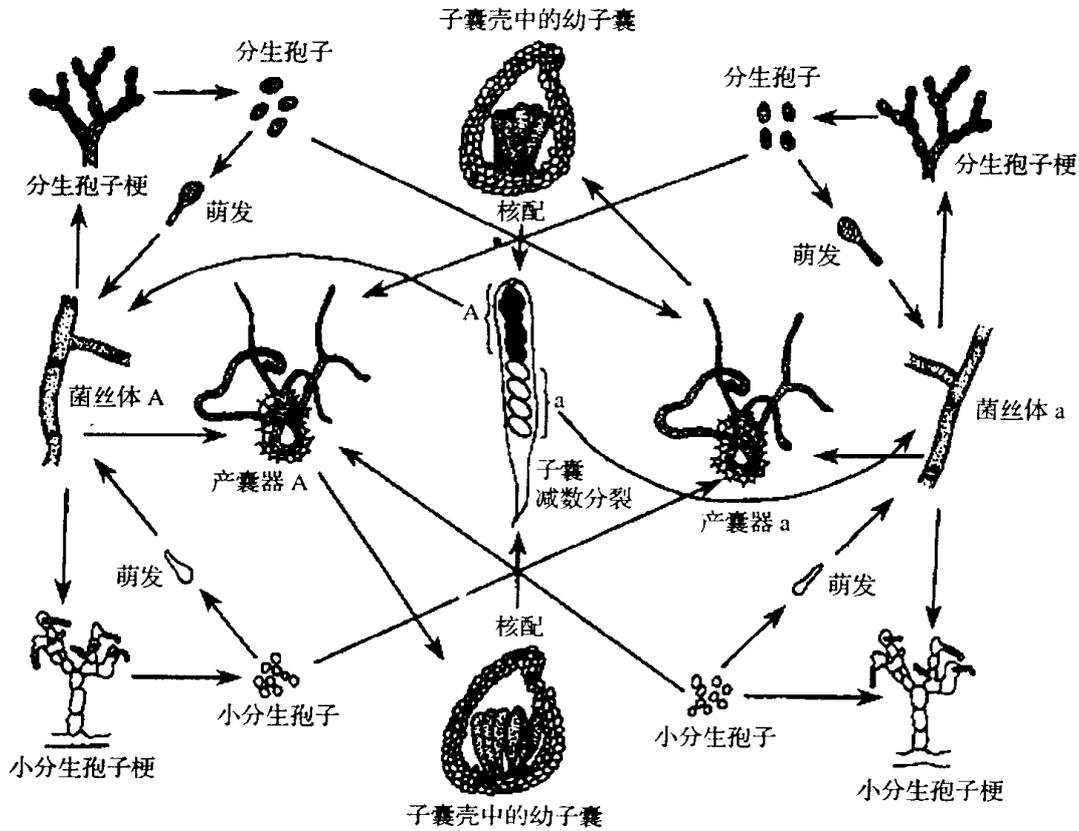


图 4-17 好食脉孢菌的生活史

在一般情况下,脉孢菌多靠分生孢子繁殖,很少进行有性繁殖。有性繁殖产生子囊和子囊孢子。好食脉孢菌异宗配合,需要 A 和 a 类菌丝交配后才能形成子囊壳。子囊内含有八个孢子,一半产生 A 类菌丝,另一半产生 a 类菌丝。产囊器卷曲,由许多细胞组成,每个细胞含多个核。产囊器基部细胞分枝,将产囊器包围成一拟薄壁组织的菌丝团。产囊器上部细胞延长并分枝成为受精丝,接受异宗的小分生孢子或分生孢子,或与异宗分生孢子的芽管结合。小分生孢子和分生孢子代替了雄器的作用,有时两种异宗菌丝的结合也可代替性器官的作用。

在子囊内,双倍体核经过两次分裂(一次为减数分裂)产生四个单倍体核;再经一次分裂,产生八个单倍体核。每个核发育成一个子囊孢子,每个子囊中有八个子囊孢子。由于子囊狭细,产生的单倍体核以及随后形成的子囊孢子严格按直线顺序排列,表现出有规律的遗传组合。脉孢菌常用作遗传和生化研究的材料。好食脉孢菌的生活史见图4-17。

(4) 虫草属(*Cordyceps*, 图 4-18) 归入子囊菌门, 核菌纲, 球壳目, 麦角菌科。冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*)寄生于鳞翅目幼虫体上, 把虫体变成充满菌丝的僵虫, 这是菌核部分。菌核萌发出有柄的棍棒形子座, 在子座顶端的膨大部分形成许多子囊壳。子囊孢子线形, 多胞, 常在隔膜处分裂为若干段。

冬虫夏草是我国特产, 是一种补药, 有益肺肾, 并有止血化痰的作用。主要分布在四川、云南、甘肃、青海、西藏等地。

4. 担子菌

担子菌是高等真菌。担子菌的特征为菌丝分枝有隔膜, 有性过程产生担孢子。大多数担子菌的无性过程不发达或不发生。

绝大多数担子菌的菌丝体发达, 并具桶状隔膜。在其生活史中, 菌丝可区分为三种类型:

- ① 初生菌丝(单倍体 n), 由担孢子萌发产生, 初期无隔多核, 不久产生横隔将细胞核分开, 形成单核菌丝。
- ② 次生菌丝(双倍体 $n+n$), 两条初生菌丝结合, 进行质配但不进行核配, 形成双核菌丝。次生菌丝常以锁状联合的方式来增殖细胞。
- ③ 三生菌丝(双倍体 $n+n$), 由次生菌丝特化形成。特化后的三生菌丝形成各种子实体。

伞菌属(*Agaricus*)归入担子菌门, 层菌纲, 伞菌目, 伞菌科。担子果(子实体)开裂如伞状。菌盖肉质, 菌盖腹面有辐射状的菌褶, 菌褶内形成担子和担孢子。菌柄肉质, 有菌环, 易与菌盖分离(图 4-19)。担孢子卵圆或椭圆形。

本属有几十种, 生长于田野和森林土壤上, 多数可食, 少数有毒。双孢蘑菇(*A. bisporus*)是最常见的栽培种。蘑菇的生活史一般包括三个阶段: ① 孢子萌发。一个健壮的蘑菇能产生亿万个孢子, 成熟时即从菌褶的两面散落。在适宜的环境条件下, 担孢子萌发, 先在一端伸出芽管, 芽管不断分枝和延长形成初生菌丝。② 菌丝繁殖。初生菌丝主要依靠贮藏在孢子中的养料生长, 存在时期很短; 初生菌丝很快相互交配, 使两个单核的细胞原生质聚合在一起, 形成次生菌丝。次生菌丝发育到一定阶段, 又会相互交接聚合而形成三生菌丝。三生菌丝体

已不是稀疏的细丝, 而是十分致密的菌丝组织。③ 形成子实体。蘑菇是由分化的次生菌丝体(原基)发育而来的。开始形成时, 只是在菌丝体上, 特别是在菌丝的连接点上产生许多小瘤状突起, 随后依靠菌丝体供给养料, 迅速膨大成菌蕾, 并进一步开伞成熟(图 4-20)。

5. 半知菌类

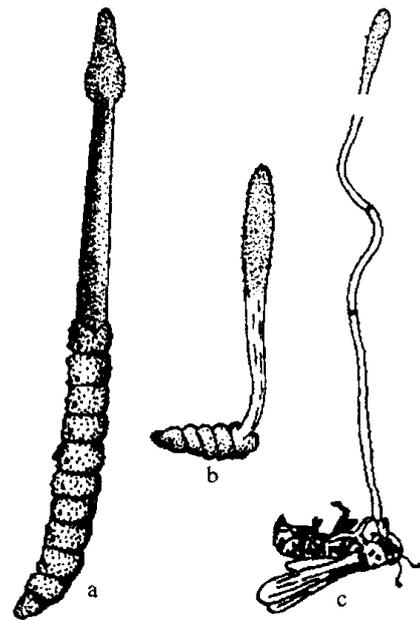


图 4-18 虫草属

- a. 冬虫夏草(*C. sinensis*);
b. 蛹虫草(*C. militaris*);
c. 蜂头虫草(*C. sphecocephala*)

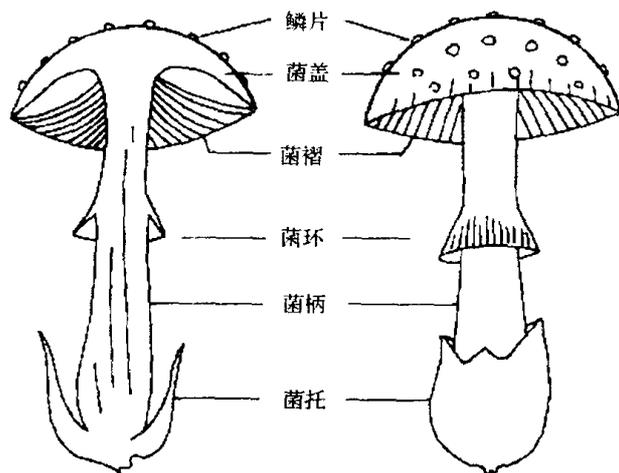


图 4-19 伞菌子实体结构

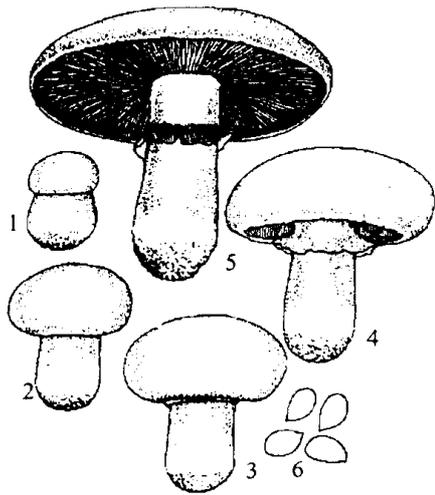


图 4-20 双孢蘑菇

1~5. 菌体生长发育过程; 6. 孢子

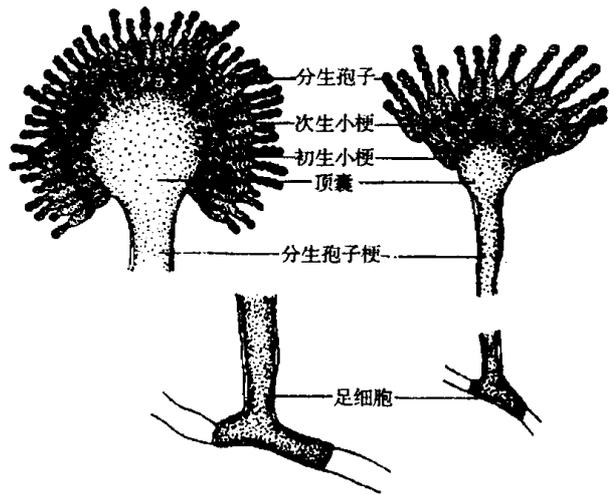


图 4-21 曲霉各部示意图

半知菌的菌丝有隔膜,大多只发现无性阶段,还没有发现有性阶段,所以称为半知菌。

(1) 曲霉属(*Aspergillus*) 归入半知菌类,丝孢目,丛梗孢科。曲霉菌丝体发达,多分枝,具隔膜,多核,无色或有明亮的颜色。分生孢子梗从足细胞(一种特化的菌丝细胞)上垂直长出,无横隔,顶部膨大形成顶囊(vesicle)。顶囊呈球形、梨形、棍棒形。顶囊表面长满一层(初生小梗)或两层辐射状小梗(初生小梗和次生小梗)。次生小梗上着生分生孢子,一般为球形。顶囊、小梗以及分生孢子链构成分生孢子头(图 4-21)。在曲霉属中,只有少数种进行有性繁殖,产生子囊孢子,大多数种还没有发现有性阶段。

曲霉与人类的生活和生产活动关系密切。它们是制酱、酿酒、制醋的重要菌种,也是工业生产多种酶制剂(如淀粉酶、蛋白酶、果胶酶)和有机酸(如柠檬酸、葡萄糖酸、五倍子酸)的重要菌种。农业上则将曲霉用作糖化饲料的菌种。

曲霉广泛分布于土壤、空气、水体、谷物及各种有机物品中。在湿热季节,曲霉常引起皮革、布匹以及其他工业产品的霉变,造成食物和饲料的腐败。曲霉还能感染人和动物而致病(称为曲霉病)。曲霉(如黄曲霉)产生的毒素,可引起家禽家畜严重中毒,以至死亡,也可诱发人和动物的肝癌。在实验室中,曲霉常引起污染,给工作带来很大的麻烦。

(2) 青霉属(*Penicillium*) 在分类上与曲霉同科。青霉的菌落呈密毡状或松絮状,大多为灰绿色。菌丝与曲霉相似,但无足细胞。分生孢子梗由基质菌丝或气生菌丝长出,单独直立或密集成束,具有横隔,顶端生有扫帚状的分枝,称为帚状枝。帚状枝由单轮、两轮或多轮分枝构成,有的对称,也有的不对称。最后一级分枝称为小梗。着生小梗的细胞称为梗基,支持梗基的细胞称为副枝。小梗上产生成串的分生孢子(图 4-22)。分生孢子呈球形、椭圆形或短柱形,多为青绿色。在青霉属中,少数种产生闭囊壳,还有少数种产生菌核。

青霉的分布广泛。许多青霉具有重要的工业应用价值,可用于生产有机酸和抗生素。例如久负盛名的青霉素就是利用产黄青霉(*P. chrysogenum*)的某些菌株生产的。但也有不少青霉可危害水果,侵染工业产品、食品和饲料,感染动物和人体而致病。青霉也是实验室中常见的污染菌。

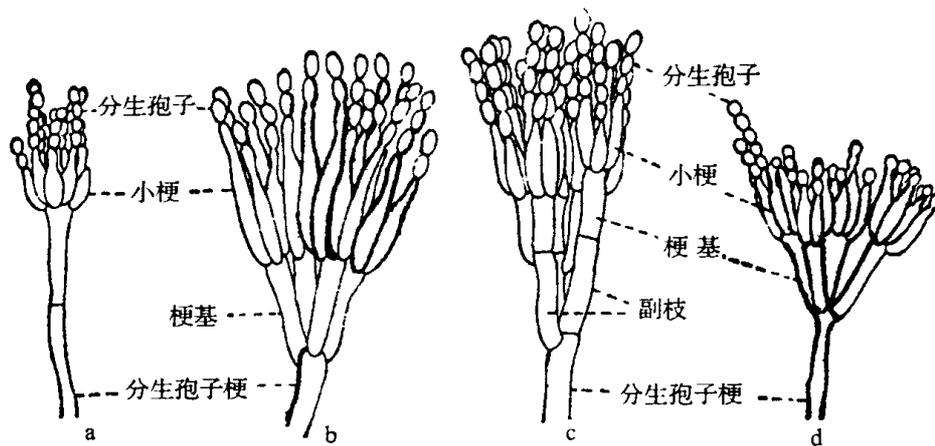


图 4-22 青霉的帚状枝

a. 单轮型; b. 对称二轮型; c, d. 非对称型

第二节 藻 类

藻类属于低等植物。大多数藻类个体微小,肉眼看不见或看不清,故列入微生物。藻类主要为水生生物,广泛存在于淡水及海水中。在自然界水生生态系统中,藻类是重要的初级生产者。在特定条件下,藻体异常增殖可造成水体污染,给人类生产与生活带来危害。

一、藻类的形态与构造

藻类的形态多种多样,有单细胞或多细胞藻类。多细胞藻类多呈丝状。藻类的细胞核为真核,具有真核细胞的一般特征。细胞壁由纤维素与果胶质组成。藻类含有叶绿体。叶绿体中含有叶绿素、类胡萝卜素、叶黄素等。在红藻体内,还含有藻胆素(藻蓝素和藻红素)。不同的光合色素使藻类呈现不同的颜色。

二、藻类的生理特征

藻类的光合作用与高等植物相同,可用下列通式表示:



这种光合作用的特点是以水作为供氢体并释放氧气。

(一)藻类的生活条件

1. 温度 各种藻类能够生活的温度范围不相同,可分为广温性和狭温性种类。广温性种类的生长温幅达 41°C ($-11\sim 30^\circ\text{C}$);而狭温性种类的生长温幅只有 10°C 左右。在正常河流中, 20°C 时,硅藻占优势; 30°C 时,绿藻占优势; $35\sim 40^\circ\text{C}$ 时,则蓝藻占优势。

2. 光照 在水表面,光照不致成为藻类生长的限制因素。但在水体深处或水体受悬浮物污染时,光照即可成为限制因素而影响藻类生长。

3. pH 值 藻类生长的 pH 值范围为 $4\sim 10$,最适值为 $6\sim 8$ 。有些种类在强酸、强碱下也能生长。

(二)藻类的营养特征

藻类是光能自养型微生物,能进行光合作用。有光照时,能利用二氧化碳合成细胞物质,同时

放出氧气。夜间无光照时,则利用光合产物进行呼吸作用,消耗氧气、放出二氧化碳。在藻类丰富的池塘中,白天水中的溶解氧很高,甚至过饱和;夜间溶解氧急剧下降,往往会造成水体缺氧。

(三)藻类的繁殖

藻类的繁殖方式有:营养繁殖、无性生殖和有性生殖。

三、藻类的分类

迄今为止,全球已知的藻类约有三万余种。根据藻类的光合色素、个体形态、细胞结构、生殖方式和生活史等,可将藻类分为10门:蓝藻门(Cyanophyta)、裸藻门(Euglenophyta)、绿藻门(Chlorophyta)、轮藻门(Charophyta)、金藻门(Chrysophyta)、黄藻门(Xanthophyta)、硅藻门(Bacillariophyta)、甲藻门(Pyrrophyta)、褐藻门(Phaeophyta)和红藻门(Rodophyta)。其中,蓝藻门、裸藻门、绿藻门、硅藻门的一些藻类与水体富营养化有关。

(一)蓝藻门

蓝藻门又称蓝细菌(有关蓝细菌的性状参见第三章有关小节)。蓝藻的繁殖方式主要有营养繁殖和无性繁殖。营养繁殖包括细胞分裂和多细胞群体或丝状体断裂。丝状蓝藻的营养繁殖可断裂形成藻丝片段,无性繁殖产生多种不同类型的孢子。单细胞蓝藻主要通过细胞分裂繁殖,未发现孢子的形成。

蓝藻是一般水体中的优势藻类之一。微囊藻属(*Microcystis*)和腔球藻属(*Coelosphaerium*) (单细胞蓝藻)能分泌果胶构成胶质膜,彼此融合成大的菌胶团(球状或块状);鱼腥藻属(*Anabaena*) (丝状蓝藻)能长出大量藻丝体,它们都可在富营养化水体中诱发水华。

(二)裸藻门

裸藻门的藻类简称裸藻。裸藻的形态见图4-23。裸藻因不具细胞壁而得名。除了柄裸藻

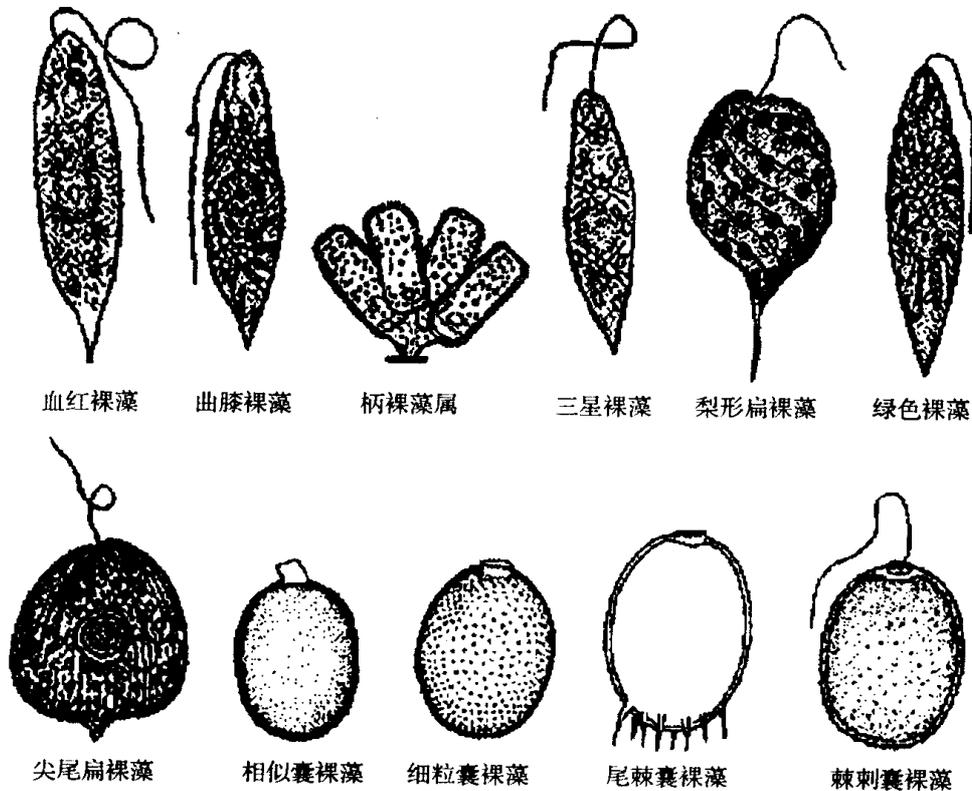


图 4-23 裸藻的形态

属(*Colacium*)以胶柄相连形成群体外,其他裸藻全是游动型的单细胞个体。裸藻具有1~3根鞭毛,鞭毛基部有高度分化的鞭毛器或神经运动器。绝大多数裸藻具有叶绿体,内含叶绿素a、叶绿素b、 β -胡萝卜素和三种叶黄素。这几种色素使叶绿体呈鲜绿色,易被误认为绿藻。含光合色素的裸藻能进行光合作用,不含光合色素的裸藻进行腐生生活。

裸藻的繁殖为纵裂,细胞核先进行有丝分裂,然后细胞由前向后纵向裂殖为二,一个子细胞接受原有的鞭毛,另一个子细胞长出一根新的鞭毛。当条件不适宜时,裸藻失去鞭毛形成胞囊。待环境好转时,胞囊壳破裂,重新形成个体。有时胞囊内的细胞质多次分裂,形成多个细胞的胶群体,每个细胞都能形成新个体。

裸藻对温度的适应范围广,主要生长在有机物丰富的静止水体或缓慢的流水中。大量繁殖时形成绿色、红色或褐色的水华。裸藻是水体富营养化的指示生物。

(三) 绿藻门

绿藻门的藻类简称绿藻。绿藻的形态见图4-24。绿藻的光合色素组成与高等植物相似,含

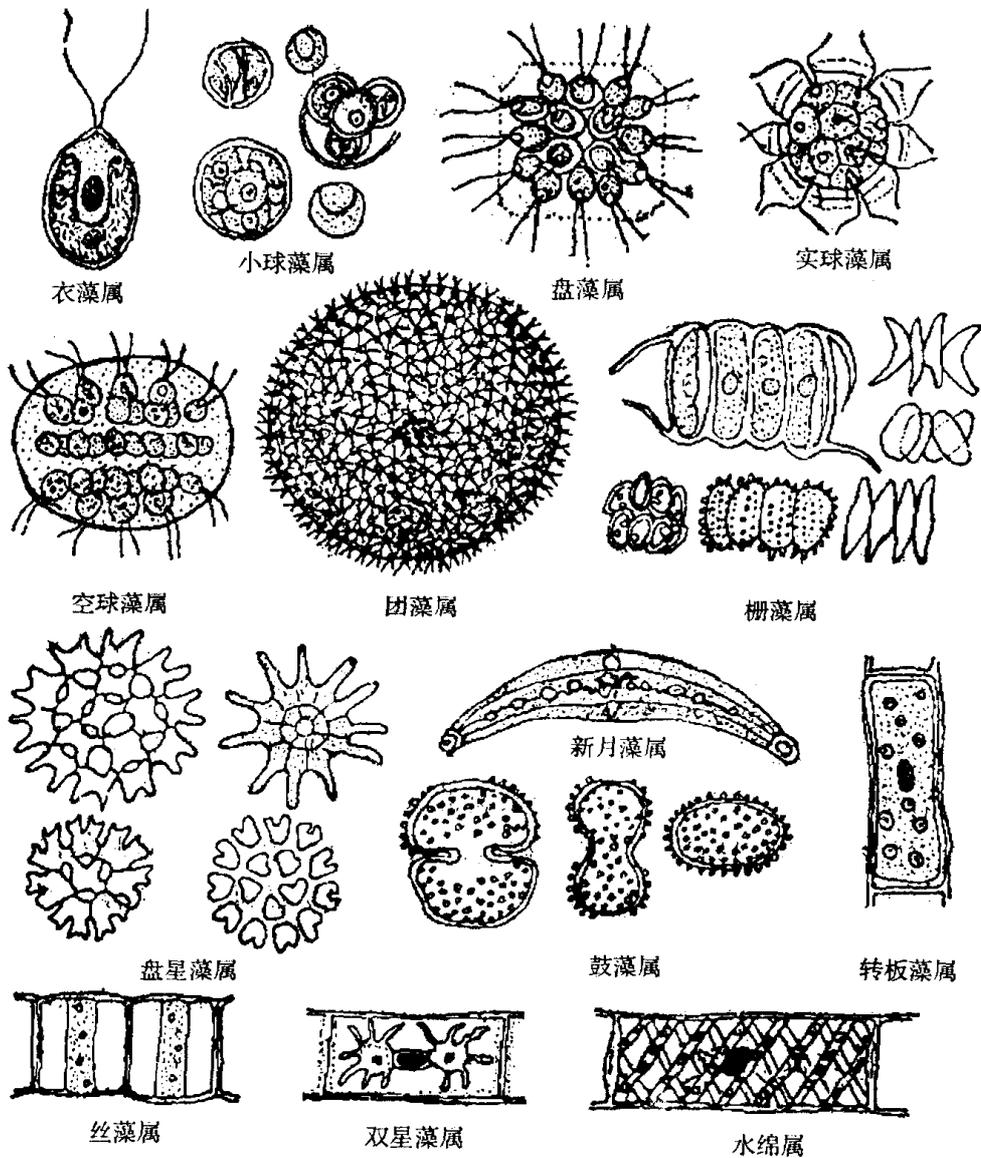


图 4-24 绿藻的形态

有叶绿素 a、叶绿素 b、叶黄素和 β -胡萝卜素。绝大多数为草绿色。藻体形态纷繁多样,包括单细胞、群体、丝状体、膜状和管状等。

绿藻细胞最显著的细胞器是色素体。色素体形态多种多样,是分类的重要特征之一。大多数绿藻的运动细胞具有等长、表面平滑的鞭毛(绿藻又称“等鞭藻类”)。鞭毛多为 2 条,少数 4~8 条,罕见 1 条。大部分绿藻细胞只有一个细胞核,少数绿藻细胞多核。绿藻的繁殖方式有营养繁殖、无性生殖和有性生殖。

一般水体中的藻类以硅藻和绿藻为主。在水体自净中,绿藻起着净化和指示生物的作用。

(四) 硅藻门

硅藻门中的藻类简称硅藻。硅藻的形态见图 4-25。硅藻最显著的特征是细胞壁高度硅质化而成为坚硬的壳体。壳体由两个“半壳”套合而成。套在外面,体积较大的“半壳”称为上壳;套在里面,体积较小的“半壳”称为下壳。壳体(上壳和下壳)可分为盖板和缘板两部分。上壳的盖板仍叫“盖板”,下壳的盖板则叫“底板”。缘板又叫“壳环带”,简称“壳环”。上下“半壳”壳环相互套合的部分叫“接合带”。

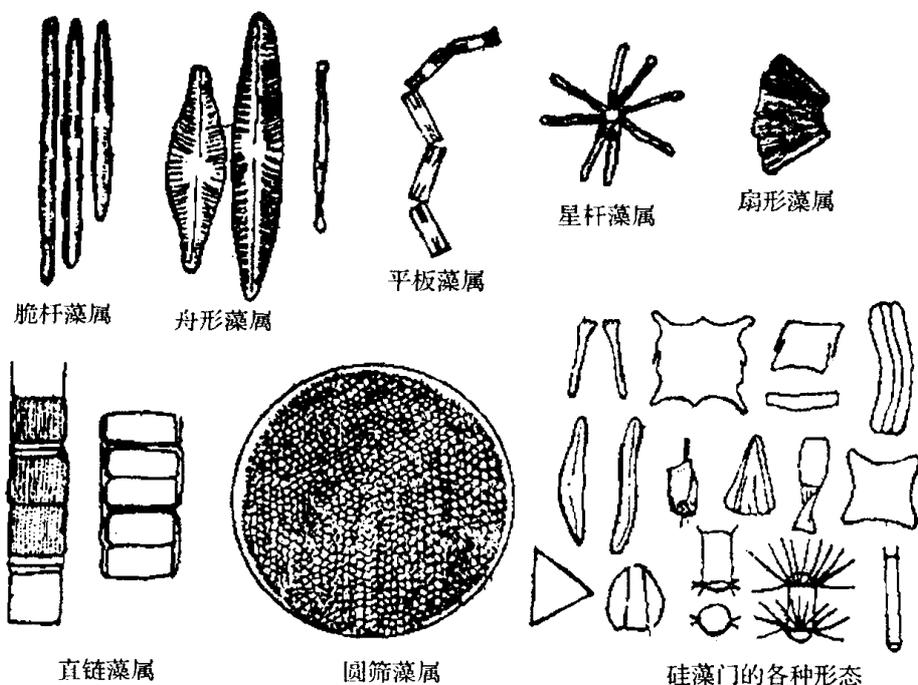


图 4-25 硅藻的形态

硅藻细胞的盖板有两种基本形态:① 盖板呈放射性对称的硅藻,多数种为圆形,少数种为三角形、多角形、椭圆形、卵形等。② 盖板呈长形、两侧对称的硅藻,有线形、披针形、椭圆形、卵形、菱形、舟形、新月形、棒形等。硅藻细胞的壳环多为长方形,也有鼓形、圆柱形或长圆柱形。盖板表面有各种细致的花纹,是分类的重要依据。硅藻细胞的色素体呈黄色或黄褐色。繁殖方式主要为纵向分裂,也可产生复大孢子(细胞经过多次分裂后,体积逐渐变小,产生复大孢子使细胞恢复原来的大小)和休眠孢子(环境不利时,母细胞形成厚壁休眠孢子,待环境适宜时萌发)。

硅藻全球性分布,有明显的区域种类,受气候、盐度和酸碱度的制约。硅藻是一般水体中的优势藻类之一,对水体的生产力有较大的贡献。发生“赤潮”时,高浓度的硅藻可使海水呈褐色。

(五) 甲藻门

甲藻门的藻类简称甲藻。甲藻多为单细胞个体,呈三角形、球形、针形,前后或左右略扁,

前、后端常有突出的角。少数甲藻为群体或具分枝的丝状体,多数有细胞壁。细胞核大,有核仁和核内体。细胞质中有大液泡,并有一个或多个色素体。色素体含叶绿素 a、叶绿素 c、 β -胡萝卜素、硅甲黄素、甲藻黄素、新甲藻黄素及环甲藻黄素。藻体呈棕黄色或黄绿色,偶尔红色。有的甲藻有眼点。多数有两条不等长、排列不对称的鞭毛,称为运动胞器。无鞭毛的甲藻作变形虫状运动或不运动。甲藻的繁殖方式主要为裂殖,也有一些通过游动孢子或不动孢子繁殖。植物性营养(即光合自养),少数腐生或寄生。甲藻在淡水、半咸水、海水中都能生长。多数甲藻对光照强度和水温范围要求严格,在适宜的光照和水温条件下,甲藻在短期内大量繁殖,造成海洋“赤潮”。

多甲藻属(*Peridinium*)、角甲藻属(*Ceratium*)和裸甲藻属(*Gymnodinium*)的形态见图 4-26。

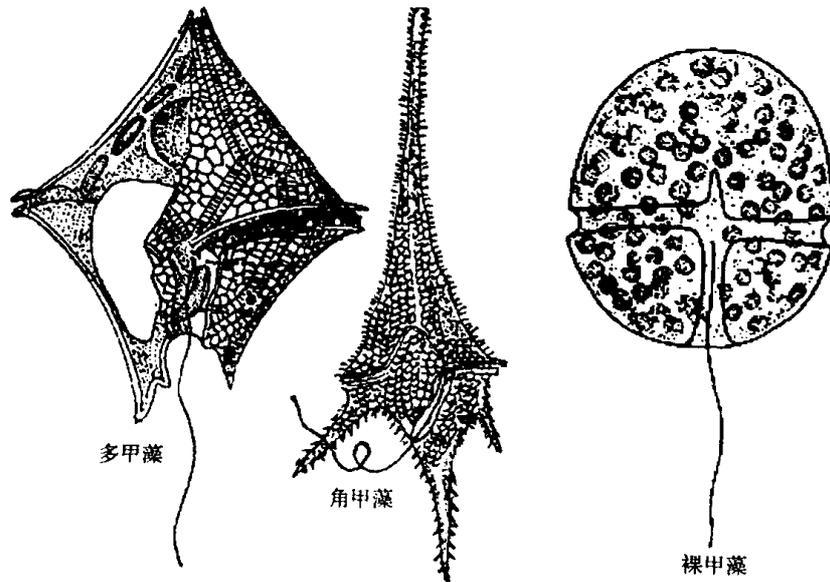


图 4-26 甲藻的形态

第三节 原生动物

原生动物是最原始、最低等、结构最简单的单细胞动物。在环境中分布广泛,海洋、湖水、河水、池水及土壤中均有存在。

一、原生动物的形态与构造

原生动物形态多样,大小多为 $100\sim 300\ \mu\text{m}$,个别小至几微米。原生动物虽为单细胞生物,但结构相对复杂。原生动物细胞不具细胞壁;细胞质软而薄,或者硬而厚;细胞核为真核,数量一个或多个。

原生动物可以形成不同的“胞器”,行使不同的功能。能够与多细胞动物一样,进行摄食、呼吸、排泄、生殖等生命活动。鞭毛、纤毛、刚毛、伪足是运动胞器;胞口、胞咽、食物泡、吸管,是摄食、消化、营养的胞器;收集管、伸缩泡和胞肛是排泄胞器;眼点是感光的胞器。有的胞器具有多种功能。例如,波多虫的鞭毛除具运动功能外,还具摄食功能。

二、原生动物的营养与繁殖

大部分原生动物进行异养生活,以吞食细菌、真菌、藻类等有机体为生;或以有机残体、腐烂物、有机颗粒为食;少数含有光合色素,能像植物一样进行自养生活。

原生动物的营养类型有三种:①全动性营养(holozoic),以其他生物(如细菌、酵母菌、霉菌、藻类、比自身小的原生动物)和有机颗粒为食。绝大多数原生动物的营养类型为全动性营养。②植物性营养(holophytic),与植物一样,能利用光、二氧化碳和水合成有机物供自身消费。植物性营养的原生动物有绿眼虫、衣滴虫等。③腐生性营养(saprophytic)。某些无色鞭毛虫及寄生性原生动物,借助体表的原生质膜,依靠吸收环境或寄主中的可溶性有机物为生。

在营养丰富、环境适宜时,原生动物大量繁殖。其繁殖方式有无性繁殖和有性繁殖。无性繁殖可以通过二分裂(纵分裂或横分裂)或多分裂(如寄生的孢子虫)的方式进行(图 4-27),也可通过出芽生殖进行(如吸管虫)。有人认为二分裂是原生动物的主要生殖方式。有性繁殖通常发生于环境条件不利的场合,或种群已进行长时间的无性繁殖,需要有性繁殖交替以增强活力的场合。钟虫的有性生殖过程如图 4-28 所示。绝大部分原生动物可以形成休眠体(又称孢囊),以抵抗不良环境。当环境条件适宜时,又复萌发,长出新细胞。

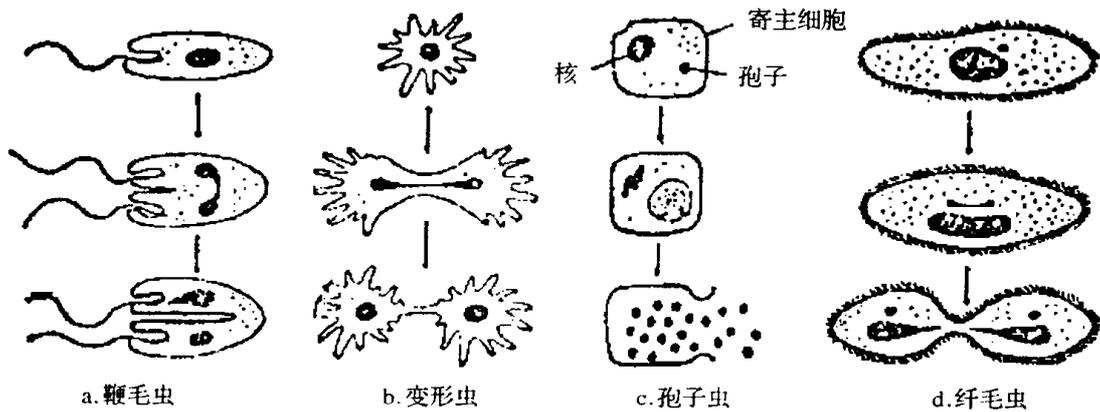


图 4-27 原生动物的生殖方式

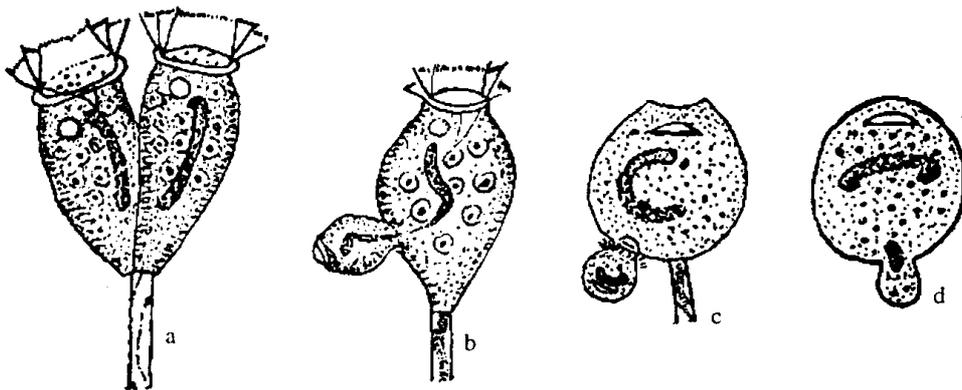


图 4-28 钟虫的繁殖

a. 裂殖, b, c, d. 有性生殖(结合生殖)

三、原生动物的分类

原生动物种类多而庞杂,可供借鉴的化石资料少,对其起源和演化研究的难度大,故至今

仍未建立令人满意的分类系统。根据原生动物的细胞器和其他特点,德国学者 Bütschli(1848—1920)将原生动物分为四个纲:鞭毛纲、肉足纲、孢子纲、纤毛纲(包括吸管纲)。这一分类系统一直沿用到 20 世纪 50 年代。自从 Margulis(1974)提出生物起源和演化的五界分类系统以后,原生动物从无脊椎动物中的一个门,上升为原生生物界中的一个亚界。在此基础上,1980 年以 Levine 为首的国际原生动物学家协会进化分类学委员会提出了新的分类系统。在这个新的分类系统中,将原生动物定为亚界,隶属于原生生物界,共包括 7 个门,即肉鞭门(Sarcomastigophora)、盘蜷门(Labyrinthomorpha)、顶复门(Apicomplexa)、微孢子门(Microspora)、囊孢子门(Ascetospora)、粘体门(Myxozoa)、纤毛门(Ciliophora)。其中,肉鞭门和纤毛门的一些原生动物与废水生物处理有关。

(一)肉鞭门的原生动物

1. 鞭毛虫 肉鞭门鞭毛亚门的原生动物具有鞭毛,常称为鞭毛虫(图 4-29)。一些鞭毛虫(眼虫、屋滴虫、杆囊虫等)生长一根鞭毛,另一些鞭毛虫(内管虫、波多虫、衣滴虫)具有两根鞭毛。多数鞭毛虫独立生活,也有群体生活(如聚屋滴虫)。鞭毛虫的营养类型有全动性营养、植物性营养和腐生性营养。在有机物浓度增加、环境条件改变或失去色素体时,植物性营养的鞭毛虫转变为腐生性营养。一旦环境条件恢复,又可返回植物性营养。内管虫属(*Entosiphon*)和波多虫(*Bodo edax*)用鞭毛摄食。鞭毛虫的大小从几微米至几十微米,在显微镜下可依据形态和运动方式加以辨认。

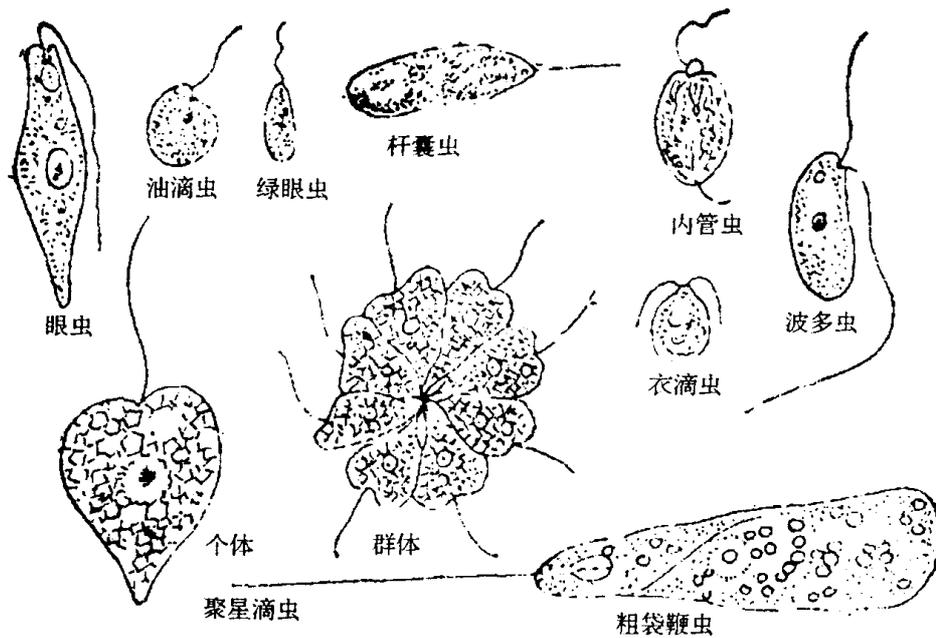


图 4-29 鞭毛虫的形态

在自然水体中,鞭毛虫喜在多污带和 α -中污带生活。在污水生物处理系统中,活性污泥培养初期或在处理效果较差时鞭毛虫大量出现,可作污水处理的指示生物。

2. 肉足虫 肉鞭门肉足亚门的原生动物有伪足,常称为肉足虫(图 4-30)。肉足虫形体小,无色透明,表面只有由细胞质形成的一层薄膜,没有固定形态。虫体没有胞口和胞咽等结构。大多数以伪足作为运动和摄食的胞器,全动性营养,少数寄生生活(如痢疾阿米巴)。有的肉足虫可改变形态,称为变形虫;有的肉足虫伪足呈针状(如辐射虫)。肉足虫的繁殖方式以无性生殖为主,也有分裂和出芽生殖。

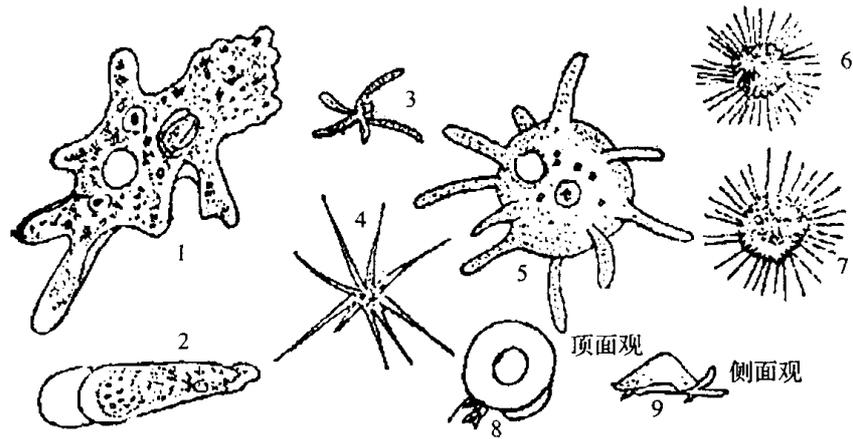


图 4-30 肉足虫的形态

1. 变形虫; 2. 蜗足变形虫; 3. 4. 辐射变形虫; 5. 珊瑚变形虫;
6. 单核太阳虫; 7. 多核太阳虫; 8. 9. 表壳虫

变形虫喜在自然水体 α -中污带或 β -中污带中生活。在污水生物处理系统中,则在活性污泥培养中期出现。

(二) 纤毛门的原生动动物

1. 纤毛虫 纤毛门的原生动动物在生命周期中至少某阶段生有纤毛,常称为纤毛虫。它们以纤毛作为运动和摄食的胞器,全动性营养。无性生殖通常为二分裂,少数种类进行出芽生殖

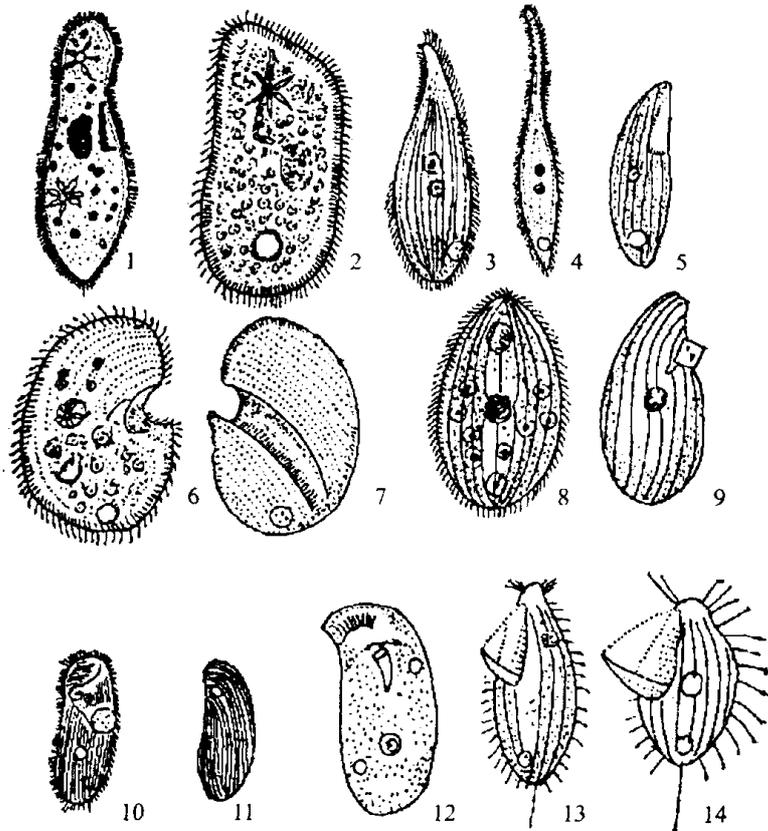


图 4-31 游泳型纤毛虫的形态(I)

1. 尾草履虫; 2. 绿草履虫; 3. 敏捷半眉虫; 4. 漫游虫; 5. 裂口虫; 6, 7. 僧帽肾形虫;
8, 9. 梨形四膜虫; 10. 豆形虫; 11. 弯豆形虫; 12. 斜管虫; 13. 长圆膜袋虫; 14. 银灰膜袋虫

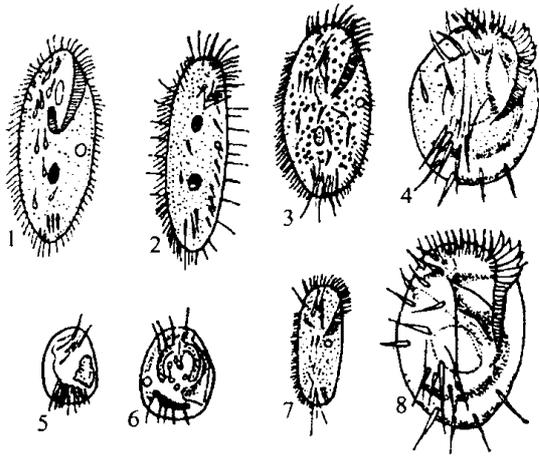


图 4-32 游泳型纤毛虫的形态(II)

1. 两面尖毛虫; 2. 囊尖毛虫; 3. 囊棘尾虫; 4. 盘状游仆虫;
5. 椭圆纤虫; 6. 囊状椭圆纤虫; 7. 腐生棘毛虫; 8. 阔口游仆虫

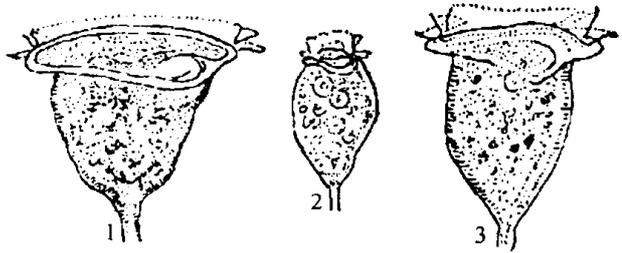


图 4-33 活性污泥中常见的几种钟虫

1. 大口钟虫; 2. 小口钟虫; 3. 沟钟虫

和复分裂生殖。有性生殖主要是接合生殖。纤毛虫有游泳型和固着型。一些游泳型纤毛虫的形态见图 4-31 和图 4-32。多数游泳型纤毛虫生活在 α -中污带和 β -中污带,少数出现在寡污带中。在污水生物处理中,在活性污泥培养中期或在处理效果较差时出现。

一些固着型纤毛虫的前端口缘有纤毛带(由两圈能波动的纤毛组成),虫体呈典型的钟罩形,称为钟虫(图 4-33)。它们多数有柄,营固着生活。在钟罩的基部和柄内有肌原纤维组成基丝,能收缩。有的钟虫单个独立固着生活,也有的群体生活(图 4-34)。

固着型的纤毛虫,尤其是钟虫,喜在寡污带中生活。它们是水体自净程度高,污水生物处理效果好的指示生物。

2. 吸管虫 纤毛门动基片纲吸管亚纲的原生动物有许多吸管状的触手,称为吸管虫(图 4-35)。在吸管虫的生活史中,可区分为幼体和成体。幼体长有纤毛,能够游泳,又称游泳体。成虫纤毛消失,长出长短不一、各种形态的吸管状触手,用于捕食。虫体呈球形、倒圆锥形或三角形等。全动性营养,以原生动物和轮虫为食料。一旦这些微小动物碰上吸管虫即被粘

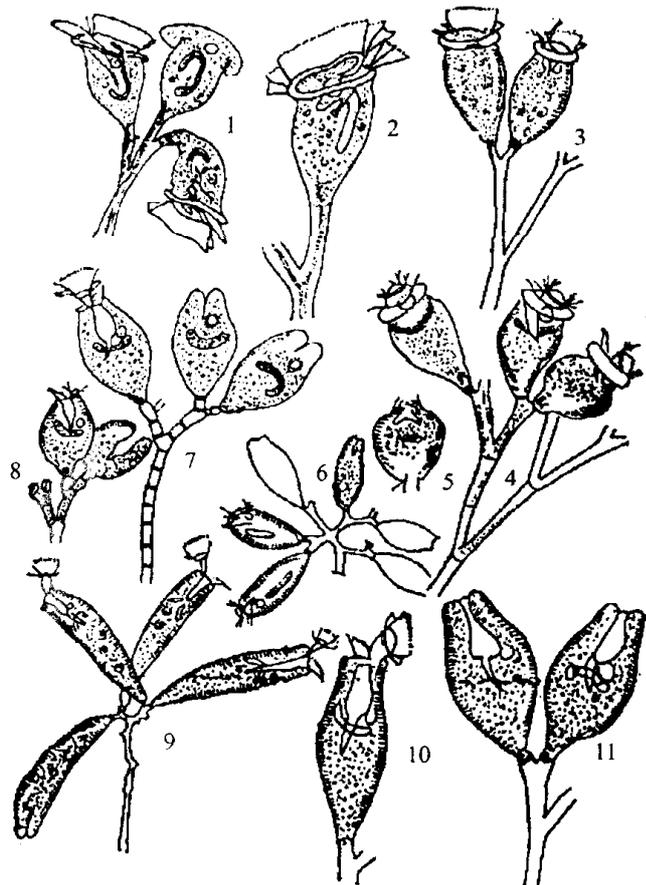


图 4-34 形成群体的固着型纤毛虫

1. 蠕状独缩虫; 2. 树状聚缩虫; 3,4,5. 湖累(等)枝虫; 6. 圆筒盖纤虫;
7. 节盖纤虫; 8. 小盖纤虫; 9. 长盖纤虫; 10,11. 彩盖纤虫

住。成虫纤毛消失,长出长短不一、各种形态的吸管状触手,用于捕食。虫体呈球形、倒圆锥形或三角形等。全动性营养,以原生动物和轮虫为食料。一旦这些微小动物碰上吸管虫即被粘

住,并被吸管虫分泌的毒素麻醉;最后细胞膜溶化,体液被吮吸干而死亡。吸管虫的生殖方式为有性生殖和内出芽生殖。

多数吸管虫出现在 β -中污带,少数出现在 α -中污带和多污带。污水生物处理效果一般时,易出现吸管虫。

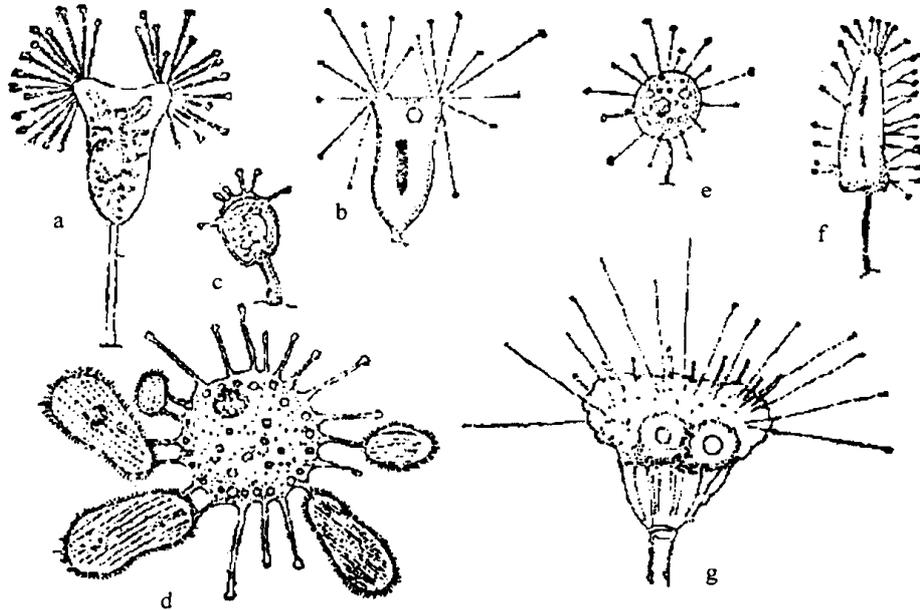


图 4-35 常见的吸管虫类原生动动物

a, b. 壳吸管虫; c. 环锤吸管虫; d. 球吸管虫捕食纤毛虫情景;
e. 固着足吸管虫; f. 长足吸管虫; g. 尖吸管虫

第四节 微型后生动物

后生动物是除原生动物以外的多细胞动物的统称。其中,个体微小,需借助显微镜或放大镜才能看清的后生动物,称微型后生动物。一些微型后生动物(如轮虫、线虫、颧体虫)常见于污水生物处理系统中。

一、轮虫

轮虫(*Rotifer*)是担轮动物门(Trochelminthes)轮虫纲(Rotifera)的微小动物。因它有初生体腔,新的分类系统把它归入原腔动物门。常见的有旋轮属(*Philodina*)、猪吻轮属(*Dicranophorus*)、腔轮属(*Lecane*)和水轮属(*Epiphanes*)等(图 4-36)。

轮虫形体微小,长约 0.04~2 mm,多数不超过 0.5 mm;多数个体自由生活,也有群体生活和寄生生活。轮虫可分头部、躯干和尾部。头部有一个由 1~2 圈纤毛组成的、能转动的轮盘,形如车轮,故叫轮虫。轮盘是轮虫运动和摄食的器官。咽内有一个几丁质的咀嚼器。躯干呈圆筒形,背腹扁宽,具刺或棘,外表有透明的角质甲膜。尾部末端有分叉的趾,内有腺体分泌粘液,借以固着在其他物体上。轮虫为雌雄异体,卵生,多为孤雌生殖。大多数轮虫以细菌、霉菌、酵母菌、藻类、原生动物及有机颗粒为食,属于杂食性营养类型。

轮虫全球性分布,以底栖的种类居多,栖息在沼泽、池塘、浅水湖泊和深水湖泊的沿岸带。

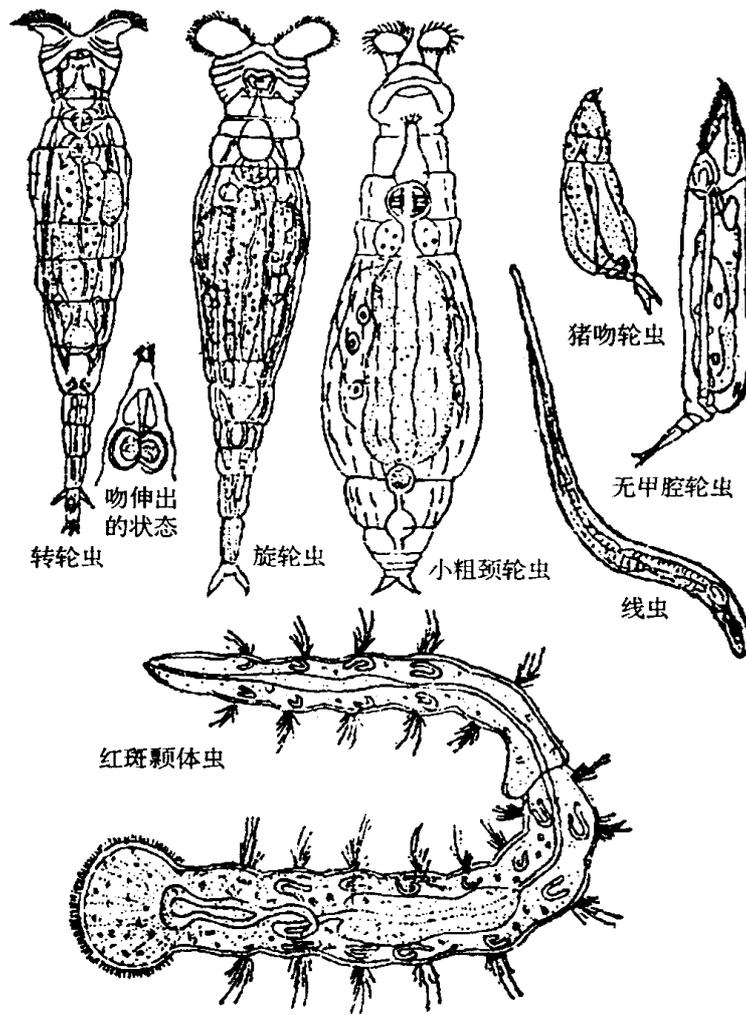


图 4-36 活性污泥、生物膜中常见的微型后生动物

适应 pH 范围广,喜在 pH 6.8 左右生活的种类较多。轮虫生活要求有较高的溶解氧,它是水体寡污带和污水生物处理效果好的指示生物。

二、线虫

线虫(*Nemato*)属于线形动物门(Nemathelminthes)的线形纲(Nematoda)。线虫为长形,形体微小,多为 1 mm 以下。在显微镜下清晰可见,但肉眼不易见到。线虫前端口上有感觉器官,体内有神经系统,消化道为直管,食道由辐射肌组成。线虫的营养类型有三种:腐食性(以动植物的残体及细菌等为食)、植食性(以绿藻和蓝藻为食)和肉食性(以轮虫和其他线虫为食)。线虫可寄生生活,也可独立生活。在污水生物处理系统中,线虫多独立生活。线虫体两侧的纵肌可交替收缩,作蛇形拱曲运动。线虫的生殖为雌雄异体,卵生。

线虫有好氧性和兼性厌氧线虫。在缺氧时,兼性厌氧线虫大量繁殖。线虫是污水净化程度差的指示生物。

三、颤体虫

颤体虫属环节动物门(Annelida)的寡毛纲(Oligochaeta),进化上比轮虫和线虫高级。身体细长分节,每节两侧长有刚毛,靠刚毛进行爬行运动,体表有带色泽的油点,是活性污泥中体形

最大的动物。

在污水生物处理系统中出现的多为红斑颤体虫(*Aeolosma hemprichii*, 图 4-36)。它的前叶腹面有纤毛,是捕食器官;杂食性营养,主要以污泥中的有机碎片和细菌为食。颤体虫分布很广,适宜生长温度为 20℃,夏、秋两季可在水体中生长;温度降至 6℃以下时,活力下降,并形成胞囊。

复习思考题

1. 简述真菌的细胞结构。
2. 简述真菌的无性繁殖以及无性孢子的类型。
3. 简述真菌的有性繁殖以及有性孢子的类型。
4. 简述真菌菌落的特点。
5. 简述腐霉属、根霉属、酵母属、伞菌属、曲霉属和青霉属的特点。
6. 简述藻类的分类概况以及与水体富养化有关的藻类特征。
7. 简述原生动物形态与构造上的特点。
8. 简述原生动物的分类概况。试问哪些原生动物与废水生物处理的关系较为密切?
9. 常见于污水生物处理系统中的微型后生动物有哪些?各有什么特征?

第五章 微生物的营养与代谢

微生物从外界环境中摄取和利用营养物质的过程,称为营养(nutrition)。微生物获得的用于合成细胞物质和提供生命活动所需的能量的各种物质,称为营养物质(nutrient)。在微生物体内,营养物质经过一系列的反应,释放能量,合成细胞物质,以维持正常的生长和繁殖。微生物体内发生的所有生化反应的集合,称为新陈代谢,简称代谢(metabolism)。代谢包括能量代谢和物质代谢。本章着重介绍微生物的营养、代谢及其调控等方面的内容。

第一节 微生物的营养物质

营养物质的功能是满足微生物生长、繁殖和完成各种生理活动的需要。它们的作用是构建细胞(参与细胞组成),提供能量(生命活动所需的各种能量)和调节代谢(参与酶的组成和调控酶的活性)。从某种意义上说,微生物体的化学组成反映了微生物对营养物质的基本要求。细菌、酵母菌和霉菌的元素组成见表 5-1。这些元素大部分以水、有机物和无机盐的形式存在于细胞中。

表 5-1 细菌、酵母菌和霉菌的元素组成 *

(%)

元素	细菌	酵母菌	霉菌	元素	细菌	酵母菌	霉菌
碳	50~53	45~50	40~63	钠	0.5~1.0	0.01	0.02~0.05
氢	7	7	—	钙	0.01~1.5	0.1~0.3	0.1~1.4
氮	12~15	7.5~11	7~10	镁	0.1~0.5	0.1~0.5	0.1~0.5
磷	2.0~3.0	0.8~2.6	0.4~4.5	氯化物	0.5	—	—
硫	0.2~1.0	0.01~0.24	0.1~0.5	铁	0.02~0.2	0.01~0.5	0.1~0.2
钾	1.0~4.5	1.0~4.0	0.2~2.5				

* 占干重的百分比。

按照微生物的生理需要,可将营养物质划分为能源、碳源、氮源、无机盐、生长因子、水等。

一、能源

能源是指可为微生物的生命活动提供最初能量来源的辐射能或化学能。化学能可以是还原态的无机物质(如 NH_4^+ 、 NO_2^- 、 S 、 H_2S 、 H_2 、 Fe^{2+} 等),也可以是各种有机物质。

二、碳源

凡是可以作为微生物的细胞物质或代谢产物中碳架来源的营养物质,称为碳源(carbon

source)。微生物细胞的碳素含量很高,约占干物质重量的 50%(表 5-1),因此微生物对碳素的需要量很大。碳源的主要作用是微生物合成细胞物质提供各种含碳物质。对于异养型微生物,碳源也用作能源,为微生物的生命活动提供能量。

自然界蕴藏着丰富的碳源,碳源的种类极其广泛。从简单的无机含碳化合物到复杂的有机含碳化合物,都可被微生物用作碳源。无机含碳化合物有 CO_2 、 CO_3^{2-} 、 HCO_3^- 等。有机含碳化合物有糖类、脂肪、蛋白质、氨基酸、脂肪酸、淀粉、纤维素、半纤维素、果胶、木质素、醇类、醛类、烷烃类、芳香族化合物(如酚、萘、菲及蒽等)、氰化物(如氰化钾、氰氢酸和丙烯腈)等。

三、氮源

凡是构成微生物的细胞物质或作为代谢产物中氮素来源的营养物质,称为氮源(nitrogen source)。微生物细胞的氮素含量仅次于碳和氧,约占干物质重量的 12%(表 5-1),因此微生物对氮素的需要量也很大。氮源的主要作用是微生物合成细胞物质(蛋白质、核酸等)提供各种含氮化合物。

氮源包括氮气,简单无机态氮(如 NH_4^+ 、 NO_3^- 、 NO_2^- 等),和复杂的有机态氮(如蛋白质和其他含氮有机物)。不同类型的微生物对氮源的要求差异较大。固氮微生物利用空气中的氮气;多数微生物利用氨(NH_3)、铵盐(NH_4^+)、亚硝酸盐(NO_2^-)、硝酸盐(NO_3^-)等无机态氮;少数氨基酸缺陷型微生物不能利用简单无机态氮,必须供给某些现成的氨基酸;多数异养型微生物能分解蛋白质取得铵盐或氨基酸。

四、无机盐

在微生物的营养元素中,所需浓度在 $10^{-3} \sim 10^{-4}$ mol/L 范围的称为大量元素;在 $10^{-6} \sim 10^{-8}$ mol/L 范围的,称为微量元素。许多组成无机盐的元素需要量较少,但起着不可替代的重要作用(表 5-2)。

表 5-2 无机盐的来源和功能

元素	提供方式	生理功能	
大量元素	P	KH_2PO_4 、 K_2HPO_4	核酸、磷酸和辅酶的成分
	S	MgSO_4	含硫氨基酸(半胱氨酸、甲硫氨酸等)和含硫维生素(生物素、硫氨酸等)的成分
	K	KH_2PO_4 、 K_2HPO_4	某些酶(果糖激酶、磷酸丙酮酸转磷酸酶等)的辅因子;维持电位差和渗透压
	Na	NaCl	维持渗透压;某些细菌和蓝细菌所需
	Ca	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、 CaCl_2	某些胞外酶的稳定剂、蛋白酶等的辅因子;细菌形成芽孢和某些真菌形成孢子所需
微量元素	Mg	MgSO_4	固氮酶等的辅因子;叶绿素等的成分
	Fe	FeSO_4	细胞色素的成分;合成叶绿素、白喉毒素和氧高铁血红素所需微量元素
	Mn	MnSO_4	超氧化物歧化酶、氨肽酶和 L-阿拉伯糖异构酶等的辅因子
	Cu	CuSO_4	氧化酶、酪氨酸酶的辅因子
	Co	CoSO_4	维生素 B_{12} 复合物的成分;肽酶的辅因子
	Zn	ZnSO_4	碱性磷酸酶以及多种脱氢酶、肽酶和脱羧酶的辅因子
	Mo	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	固氮酶和同化型及异构型硝酸盐还原酶的成分

五、生长因子

生长因子是指那些微生物生长所必需但需要量又很少的有机物质。生长因子包括维生素、氨基酸、嘌呤和嘧啶等。多数微生物能够自己合成所需的全部生长因子；少数微生物则不然，必须从培养基中获得一种或几种生长因子才能正常生长。微生物对生长因子的需求因环境条件而变。例如，在有氧条件下酵母菌能合成生长所需的全部维生素，无需外源添加；但在厌氧条件下，只有外加复合维生素才能生长。

在实验操作中，经常通过添加酵母膏、牛肉膏、麦芽汁、玉米浆、肝浸液等来提供生长因子。

六、水

水是微生物细胞的重要组成成分，也是微生物代谢必不可少的介质。水的主要作用是：

- ① 直接参与某些代谢反应，如水解反应。
- ② 作为生理生化反应的介质。许多基质只有溶于水后才能进行反应。
- ③ 作为吸收营养物质和排泄代谢产物的载体。营养物质和代谢产物只有溶于水，才能透过细胞膜。
- ④ 作为细胞的恒温剂。水的比热大，导热性良好，能有效地吸收代谢释放的热量并将其迅速散发，从而保持细胞温度的相对稳定。

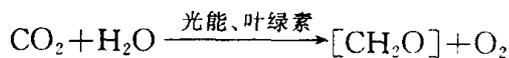
第二节 微生物的营养类型

按照所利用的能源，可将微生物分为光能营养型和化能营养型。按照所利用的碳源，又可将微生物分为自养型和异养型。综合能源和碳源，可将微生物分为光能自养型、光能异养型、化能自养型和化能异养型四个基本营养类型。

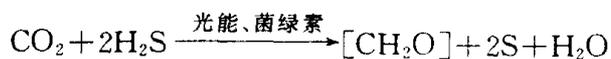
一、光能自养型(photoautotroph)

光能自养型微生物以光为能源，二氧化碳或碳酸盐为碳源，水或还原态无机物为供氢体。藻类、蓝细菌和大多数光合细菌均属这一类型。

藻类和蓝细菌的光合作用以水为供氢体，释放氧气，称为产氧光合作用。



绿色和紫色硫细菌的光合作用以硫化氢为供氢体，不释放氧气，称为不产氧光合作用。



二、光能异养型(photoheterotroph)

光能异养型微生物以光为能源，同时以二氧化碳或碳酸盐和简单有机物为碳源，简单有机物(如有机酸、醇等)为供氢体。它们可进行如下反应：



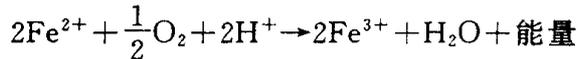
紫色非硫细菌中的红微菌属(*Rhodospirillum rubrum*)即为这一营养类型。它们与上述紫色和绿色硫细菌的主要区别在于供氢体不同。光能异养型微生物既可将有机物用作供氢体，也可将其

直接同化。

三、化能自养型(chemoautotroph)

化能自养型微生物以还原态无机物为能源,二氧化碳或碳酸盐为碳源,可在完全无机的环境中生长。常见的化能自养型微生物有:

- ① 硝化细菌,氧化氨(铵盐)或亚硝酸获得能量,同化二氧化碳。
- ② 硫化细菌,氧化还原态无机硫化物(H_2S 、 S 、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 、 SO_3^{2-} 等)获得能量,同化二氧化碳。
- ③ 铁细菌,通过氧化 Fe^{2+} 为 Fe^{3+} 来获得能量并同化二氧化碳。



- ④ 氢细菌,氢细菌属(*Hydrogenbacter*)能从氢的氧化中获取能量来同化二氧化碳。



许多化能异养型细菌也能氧化氢并从中获得能量,但不是以二氧化碳作为惟一碳源。

四、化能异养型(chemoheterotroph)

化能异养型微生物以有机物为能源和碳源。这一类型的微生物种类和数量很多,包括绝大多数细菌和放线菌,几乎全部真菌和原生动物。根据所利用的有机物状况,化能异养型微生物可区分为:

- ① 腐生性微生物,利用无生命的有机物(如动物和植物残体)。
- ② 寄生性微生物,从活的有机体(寄主)中获得营养物质,离开寄主便不能生长和繁殖。
- ③ 兼性腐生微生物,既能利用无生命的有机物,也能利用活体有机物。

上述四大营养类型的划分是相对的,各营养类型之间并无截然的界线。例如,在有光和厌氧的条件下,红螺菌属(*Rhodospirillum*)进行光能异养;而在黑暗和好氧的条件下,则进行化能异养。

第三节 微生物的营养吸收

细胞外的营养物质必须透过细胞膜进入细胞才能被微生物利用。根据透过细胞膜的方式,营养物质的摄取可以分为简单扩散、促进扩散、主动运输和基团转位运输四个类型。

一、简单扩散(simple diffusion)

简单扩散是指营养物质通过细胞膜中的含水小孔由高浓度区(胞外)向低浓度区(胞内)的运输过程。简单扩散的特点是:① 不消耗代谢能,跨膜运输的动力是营养物质的浓度梯度;② 虽然膜上含水小孔的形状和大小对营养物质的大小有一定的选择作用,但没有特异性;③ 跨膜运输前后,营养物质不发生化学变化。

简单扩散不是微生物吸收营养物质的主要方式。以这种方式摄取的营养物质主要是一些小分子或脂溶性物质,如水、二氧化碳、氧、甘油和某些无机盐。

二、促进扩散(facilitated diffusion)

促进扩散是指通过细胞膜上的载体蛋白将营养物质从高浓度区(胞外)携带至低浓度区

(胞内)的运输过程。简单扩散的特点是：① 不消耗代谢能，跨膜运输的动力是营养物质的浓度梯度；② 跨膜运输前后，营养物质不发生化学变化；③ 载体蛋白参与运输，对营养物质具有特异性。载体蛋白又称渗透酶(具有酶的特性)，横跨于细胞膜上，能在细胞膜的外表面与营养物质发生可逆性结合，并将其携带至细胞膜的内表面，释放营养物质后再返回细胞膜的外表面。由于载体蛋白的促进作用，营养物质透过细胞膜的速度大大加快。

载体蛋白对营养物质具有专一性，每种载体蛋白只能运输特定的营养物质。促进扩散主要存在于真核生物中，在原核生物中较少见。以促进扩散方式摄取的营养物质主要是糖类。

三、主动运输(active transport)

主动运输是微生物摄取营养物质的主要机制。其特点是：① 消耗代谢能，营养物质被逆浓度梯度运输；② 跨膜运输前后，营养物质不发生化学变化；③ 载体蛋白参与运输，对营养物质具有特异性。载体蛋白在细胞膜的外表面与营养物质发生可逆性结合后，需要提供能量使载体蛋白发生构象变化，才能将营养物质携带至细胞内。

由于主动运输可逆浓度梯度输送营养物质，因此能进行主动运输的微生物即使在贫营养环境中也能获得充足的养料。以这种方式摄取的营养物质主要是无机离子(如 K^+ 、 Na^+)、有机酸、氨基酸、糖、硫酸盐及磷酸盐等。

四、基团转位(group translocation)

基团转位是另一种类型的养料运输方式，许多特点与主动运输相似：① 消耗代谢能，营养物质被逆浓度梯度运输；② 载体蛋白参与运输，对营养物质具有特异性。两者间的主要差别在于基团转位有一个复杂的酶系统来完成营养物质的运输；在运输过程中营养物质发生化学变化。这种运输方式通常存在于厌氧和兼性厌氧细菌中，主要用于糖类的运输以及脂肪酸、核苷、碱基的运输。

四种营养物质跨膜运输方式的比较见表 5-3。

表 5-3 四种跨膜运输方式的比较

	简单扩散	促进扩散	主动运输	基团转位
载体蛋白	无	有	有	有
运输速度	慢	快	快	快
溶质运输方向	由浓到稀	由浓到稀	由稀到浓	由稀到浓
平衡时内外浓度	相等	相等	胞内较高	胞内较高
运输分子	无特异性	特异性	特异性	特异性
能量消耗	不需要	不需要	需要	需要
运输前后的营养物质	不变	不变	不变	改变
载体饱和效应	无	有	有	有
营养物质的类似物	无竞争性	有竞争性	有竞争性	有竞争性
运输抑制剂	无	有	有	有
运输对象举例	H_2 、 CO_2 、 O_2 、甘油、少数氨基酸、盐类	SO_4^{2-} 、 PO_4^{3-} 、糖(真核生物)	氨基酸、乳糖等糖类、 Na^+ 、 Ca^{2+} 等无机离子	葡萄糖、果糖、甘露糖、嘌呤、核苷、脂肪酸

第四节 培养基

培养基是人工配制的适合于不同微生物生长繁殖或积累代谢产物的营养物质。

一、配制培养基的原则

配制培养基应遵循以下原则：

1. 根据各种微生物的营养需要，配制不同的培养基。例如：细菌，牛肉膏蛋白胨培养基；放线菌，高氏 1 号合成培养基；酵母菌，麦芽汁培养基；霉菌，查氏培养基；等等。
2. 各种营养物质的浓度及配比要适当。营养物质的浓度太低，不能满足微生物生长的需要；浓度太高，则会抑制微生物的生长。碳氮比对微生物的生长和代谢有很大的影响，例如利用微生物进行谷氨酸发酵时，若培养基的 C : N 比为 4 : 1，菌体大量增殖；若 C : N 比为 3 : 1，则菌体增殖受抑，谷氨酸产量增加。
3. 理化条件(酸碱度、渗透压、氧化还原电位等)要适宜。
4. 应利用价格低廉、来源大宗的原料。这对工业生产降低成本尤为重要。
5. 培养基应无菌。

二、培养基的种类

培养基的种类很多。根据培养基组分的来源、培养基的物理状态以及培养基的使用目的，可分成若干类型。

1. 按培养基组分的来源分

(1) 天然培养基：用化学成分还不清楚或化学成分不恒定的天然有机物为主要成分配制而成的培养基。例如，实验室中常用的细菌培养基(牛肉膏蛋白胨培养基)。

(2) 合成培养基：用化学成分完全了解的化学物质配制而成的培养基。例如，实验室中常用的放线菌培养基(高氏 1 号培养基)。

2. 按物理状态分

(1) 液体培养基：将各种培养基组分溶于水即成。工业上，液体培养基常用于发酵生产。实验室中，液体培养基常用于增殖菌体，研究微生物的生理和代谢。

(2) 固体培养基：在液体培养基中加入凝固剂，使培养基呈固态；或直接将马铃薯块、胡萝卜条等固体表面用作培养基。固体培养基常用于菌种分离、鉴定、菌落计数、菌种保藏等。

在制备固体培养基时，最常用的凝固剂是琼脂，添加量为 1.5%~2.0%。琼脂是从石花菜等红藻中提取的琼脂糖和琼脂胶，不被大多数微生物降解。加温至 96℃ 以上时，琼脂融化；降温至 45℃ 以下时，琼脂凝固。在酸性条件下高压灭菌，琼脂发生水解，故在配制 pH < 5 的固体培养基时，通常将琼脂与培养基的其他组分分开配制，高压灭菌并降至适当温度后再混合。

明胶也是制备固体培养基的凝固剂。它由动物的皮、骨、韧带等煮熬而成，主要成分为蛋白质，含有多种氨基酸，可被许多微生物利用。温度高于 28~35℃，明胶融化；低于 20℃，明胶凝固；适宜的温度范围为 20~25℃。明胶固体培养基的使用面很窄，仅用于某些特殊的微生物生理生化检验。

硅胶是无机硅酸钠、硅酸钾与盐酸、硫酸进行中和反应而产生的胶体。由于硅胶完全由无机物组成，在分离和研究自养菌时，被用作固体培养基的凝固剂。一旦凝固，硅胶即不能再融。

(3) 半固体培养基:在液体培养基中加入0.5%左右的凝固剂,使培养基呈半固体状态。半固体培养基常用于穿刺培养,观察细菌运动,培养厌氧菌,保藏菌种等。

3. 按用途分

(1) 基础培养基:根据某种或某类群微生物的共同营养需要而配制的培养基。一般而论,基础培养基能满足野生型菌株的营养要求。

(2) 加富培养基:在基础培养基内加入额外营养物质(如血清、动物组织液等)而配制成的培养基。主要用于培养某种或某类营养要求苛刻的异养型微生物。

(3) 鉴别培养基:在基础培养基中加入某种指示剂而鉴别某种微生物的培养基。经培养后,微生物形成不同代谢产物,使指示剂产生不同的反应,以达到快速鉴别的目的。

(4) 选择培养基:根据某种或某类群微生物的特殊营养需要或对某种化合物的敏感性不同而设计的培养基。利用选择培养基可使某种或某类微生物从混杂的微生物群体中分离出来。例如,利用纤维素作为惟一碳源的选择培养基,可以从混杂的微生物群体中分离出纤维素降解菌。

4. 按生产目的分

(1) 种子培养基:适合微生物菌体生长的培养基。营养物质丰富而完全,含氮量高。目的是获取优质菌种。

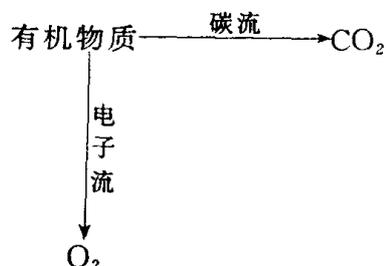
(2) 发酵培养基:用于生产预定发酵产物的培养基。其氮源高于种子培养基,目的是获取菌体或代谢产物。

第五节 微生物的能量代谢

在微生物体中,有机物能量的释放主要是通过氧化作用,或更具体地说,是通过释放电子实现的。有机物能量的降低与其在代谢中释放的电子数目直接相关,有机物所能释放的电子数目则取决于最终电子受体。根据最终电子受体的性质不同,有机物的生物氧化可区分为呼吸、厌氧呼吸和发酵三种类型。

一、呼吸

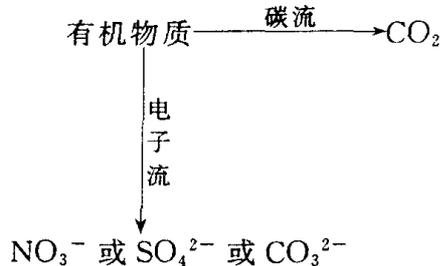
所谓呼吸(respiration),是指有机物在氧化过程中放出的电子,通过呼吸链传递最终交给氧的生物学过程。呼吸的电子流和碳流为:



呼吸的特点是:以氧为最终电子受体,有机物氧化彻底,能量(有效电子)释放完全。例如,通过呼吸,含能有机物葡萄糖可被彻底氧化成二氧化碳和水,释放出基质所含的全部能量 $688 \times 4.186 \text{ kJ}$ 。由于最终产物二氧化碳和水不再有释放电子的能力,因此它们不会耗氧,有机质的污染也由此消除。

二、厌氧呼吸

厌氧呼吸(anaerobic respiration)是指有机物氧化过程中脱下的质子和电子,经一系列电子传递体最终交给无机氧化物的生物学过程。厌氧呼吸的电子流和碳流如下:



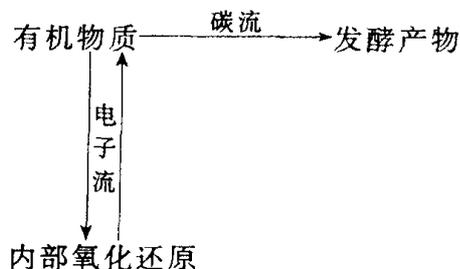
厌氧呼吸的特点是:没有分子氧参加反应,电子和质子的最终受体为无机氧化物(NO₃⁻、SO₄²⁻或CO₂等);有机物的氧化彻底,但释放的能量低于有氧呼吸。若予深究则不难发现,厌氧呼吸的电子和质子受体实际上是由两种不同元素承担的。无机氧化物中的氧充当了质子受体的角色,与之结合的其他元素则充当了电子受体的角色。由于后者的氧化能力弱于氧,因此以它作为电子受体所释放的能量就相对较少,而且当厌氧呼吸所形成的产物排入有氧环境时,存在着被氧重新氧化的可能,可见它们依然是潜在的污染物质。但这种污染物质是否表现出污染,则取决于充当电子受体角色的元素的易氧化程度。

在以硝酸盐为电子和质子受体进行厌氧呼吸时,葡萄糖的部分能量消耗于转化过程,只释放出 429×4.186 kJ 能量;但所形成的产物水、二氧化碳和氮气均为稳定化合物,因此该过程能有效地消除有机质污染。若以硫酸盐为电子和质子受体氧化葡萄糖,则释能更少,只有 172×4.186 kJ,产物除水和二氧化碳外,还有硫化物。由于硫的氧化能力弱于氧,后者能够被氧重新氧化。不仅如此,由于硫接纳了有机物释放的全部电子,其耗氧能力并不亚于原始基质。如果不能将硫化物从系统中分离,就不能最终实现对有机污染物的去除。庆幸的是,硫化物常以硫化氢或难溶金属硫化物的形式存在,它们都很容易从系统中分离,因此能消除对水体的有机污染。

三、发酵

发酵(fermentation)是指有机物氧化过程中脱下的质子和电子,经辅酶或辅基(主要有NAD,NADP,FAD)传递给另一有机物,最终产生一种还原性产物的生物学过程。

发酵的电子流和碳流为:



发酵的特点为:不需氧,有机物氧化不彻底,能量(有效电子)释放不完全。值得注意的是,由于发酵中作为电子和质子受体的有机物是原始基质的代谢产物,所形成的发酵产物是混合物,其中一部分产物的氧化程度高于原始基质,另一部分产物的氧化程度低于原始基质;又由于有机物的每次被氧化都必须由相应的还原来平衡,因此原始基质既不能高度氧化,也不能高

度还原,这就限制了发酵所能处理的有机废物的种类。

在酒精发酵中,葡萄糖被降解成二氧化碳和酒精,仅释放葡萄糖所含的部分能量 $54 \times 4.186 \text{ kJ}$ 。从能量的观点看,发酵的结果只使一部分葡萄糖转化成不含能的稳定产物二氧化碳,另一部分葡萄糖的转化产物酒精仍然含能,依然会污染环境。不仅如此,从电子的归宿看,发酵产物酒精接纳了葡萄糖释放的全部电子,产物的耗氧能力(提供电子的能力)与葡萄糖完全一样,并没有得到任何削弱。如果就上述而论,那么发酵作为控制有机质污染的措施是毫无效果的。然而,好在某些发酵(如沼气发酵)的不稳定产物为气体(如 CH_4),它能从系统内逸出,不再对水体产生污染。几种发酵的 COD 去除率见表 5-4。

表 5-4 几种发酵的 COD 去除率* (%)

发酵类型	生化反应	COD 去除率
甲烷发酵	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \longrightarrow 3\text{CH}_4 + 3\text{CO}_2$	100
酒精发酵	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \longrightarrow 2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + 2\text{CO}_2$	0
同型乳酸发酵	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \longrightarrow 2\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$	0
异型乳酸发酵	$2\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \longrightarrow \text{CH}_3\text{CHOHCOOH} + \text{HOOCCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ $+ \text{CH}_3\text{COOH} + \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{CO}_2 + \text{H}_2$	4
丁酸发酵	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \longrightarrow \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} + 2\text{H}_2 + 2\text{CO}_2$	17

* 未计微生物细胞生成量。

第六节 微生物的物质代谢

按来源,环境中存在的有机污染物主要有两类:一类是天然有机物,另一类是合成有机物。它们都可以在微生物的作用下产生种种复杂的变化。

一、糖酵解途径

糖酵解(glycolysis)途径,又称 EMP 途径或己糖二磷酸途径,是生物体内将葡萄糖转化为丙酮酸的反应过程。其总反应为:



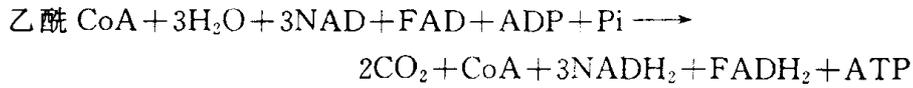
在糖酵解中,有机物氧化所脱下的质子和电子由 NAD^+ 接纳,部分释放的能量通过基质水平磷酸化而贮存至 ATP 中,并形成具有重要作用的中间产物丙酮酸。糖酵解途径的具体步骤如图 5-1 所示。

丙酮酸的归宿取决于微生物的菌种特性和环境条件。在无氧条件下,酵母菌可将丙酮酸分解为二氧化碳和乙醇。许多细菌则可将丙酮酸转化成乳酸、丁酸等产物。在有氧条件下,丙酮酸进入 TCA 循环。

二、三羧酸循环

三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)是葡萄糖降解成丙酮酸后的进一步氧化过程。

丙酮酸先在丙酮酸脱氢酶的催化下氧化脱羧,并与辅酶 A 作用生成乙酰辅酶 A;乙酰辅酶 A 再与草酰乙酸缩合成柠檬酸而开始三羧酸循环(图 5-2)。经过三羧酸循环,乙酰辅酶 A 被分解成二氧化碳、 NADH_2 和 FADH_2 ,并由基质水平磷酸化形成一个 ATP,其反应式为:



TCA 循环中产生的二羧酸可为细胞提供合成材料,它们与氨基酸、嘌呤和嘧啶等的合成密切相关。 NADH_2 和 FADH_2 则可进入呼吸链,最后生成水,并释放大量自由能。TCA 循环是有机污染物得以彻底分解的关键环节。

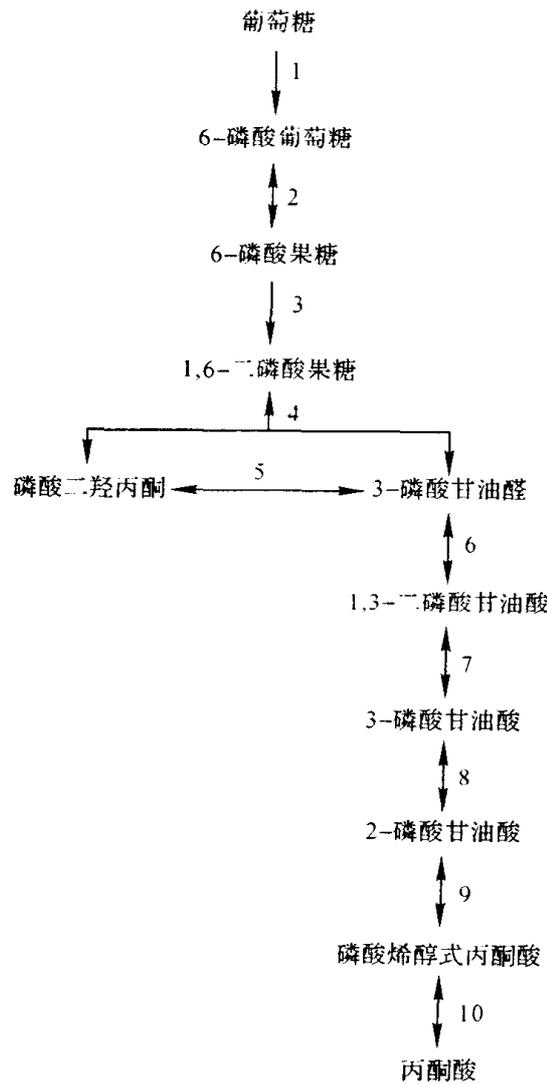


图 5-1 EMP 途径

1. 己糖激酶; 2. 磷酸己糖异构酶; 3. 磷酸果糖激酶; 4. 醛缩酶;
5. 磷酸丙糖异构酶; 6. 磷酸甘油醛脱氢酶; 7. 磷酸甘油酸激酶;
8. 磷酸甘油酸变位酶; 9. 烯醇化酶; 10. 丙酮酸激酶

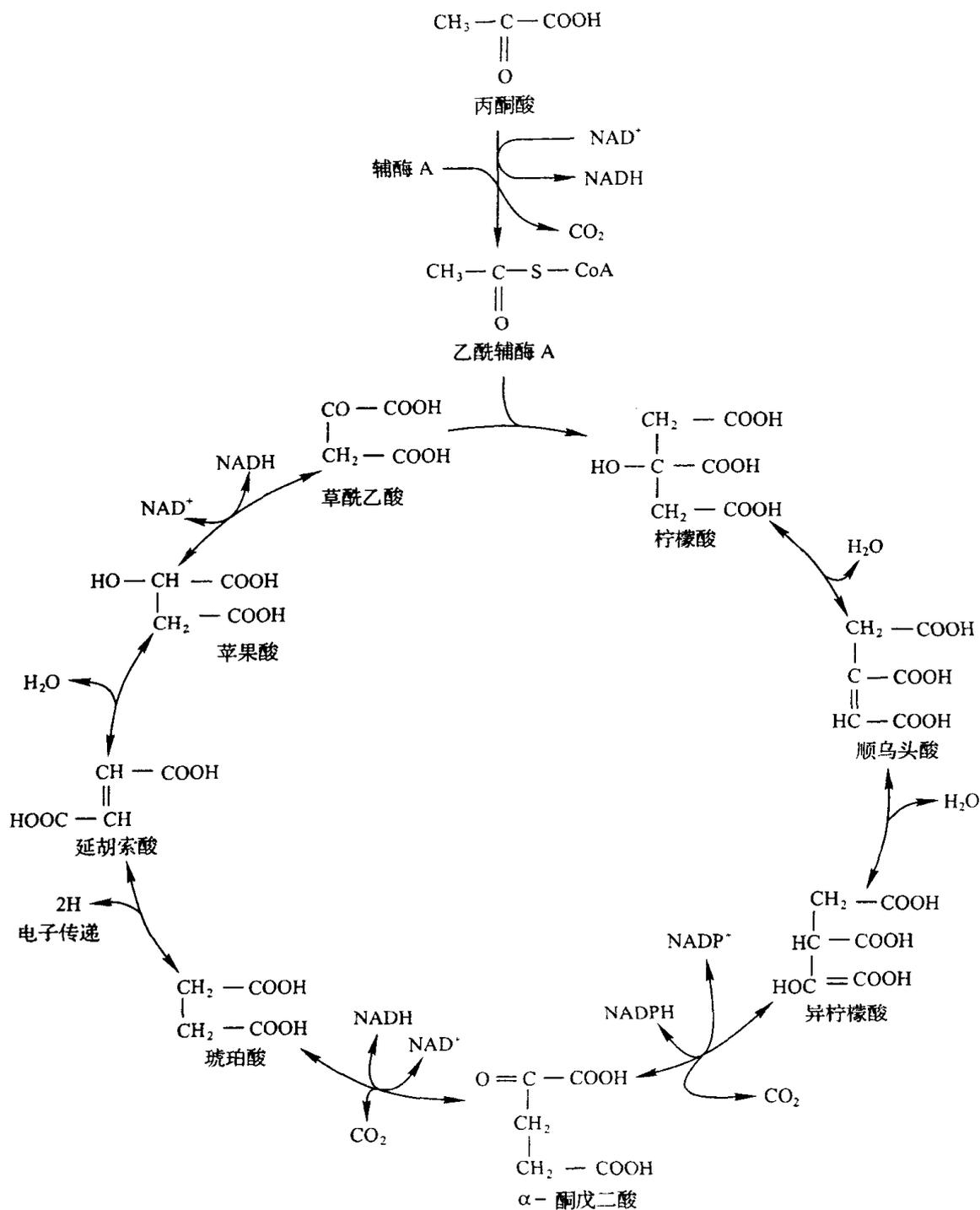


图 5-2 三羧酸(TCA)循环途径

第七节 微生物的代谢调控

微生物拥有一套灵敏而精确的代谢调节系统,以保证上千种酶正确无误、有条不紊地进行复杂的新陈代谢作用。由于酶是微生物代谢的核心,许多调节都是针对酶而展开的。对酶的调节有“粗调”和“细调”两个层次。“粗调”是调节酶的合成量,“细调”则是调节酶的活性。

一、酶活性的调节

通过改变酶的催化活性来调节代谢速率的调节方式,称为酶活性调节。这种调节发生在蛋白质水平上,主要通过“调节酶”(regulatory enzyme)进行,具有直接、快速等特点。

调节酶的活性受底物、产物及其结构类似物的影响,可以被激活,也可以被抑制。通常把底物对酶的影响称为前馈,一般是激活作用;产物对酶的影响称为反馈,一般是抑制作用。在某些分解代谢中,位于代谢途径下游的酶促反应可被上游酶促反应的产物所激活(即前馈)。例如,在培养粗糙脉孢霉(*Neurospora crassa*)时发现,柠檬酸会提高异柠檬酸脱氢酶的活性。由图 5-2 可知,柠檬酸是 TCA 循环的上游(初始)产物,异柠檬酸则是该途径的下游产物。在另外一些代谢途径中,末端产物过量会抑制该途径前面的酶促反应(通常为第一个酶促反应),使整个途径的反应速率减慢或停止(即反馈)。反馈抑制,特别是末端产物的反馈抑制是微生物中广泛存在的酶活性调节方式。

(一)反馈抑制的类型

1. 直线式代谢途径中的反馈抑制 这是一种最简单的反馈抑制类型。例如,在大肠杆菌合成异亮氨酸时,产物过多可抑制该途径中第一个酶——苏氨酸脱氢酶的活性,使 α -酮丁酸以及其后一系列中间产物都无法合成,最终停止异亮氨酸的合成。

2. 分支代谢途径中的反馈抑制 在分支代谢途径中,反馈抑制的情况较为复杂。为了避免分支之间的相互影响,微生物采用了多种调节方式。

(1) 同功酶调节。同功酶(isoenzyme)又称同工酶,是指催化相同的生化反应,但结构有一定差异的若干个酶。在分支代谢途径中,如果分支以前的某个反应由多个同功酶催化,则各分支的末端产物会分别抑制不同的酶,降低自身的合成量,但不影响其他分支的反应。例如,在大肠杆菌合成赖氨酸和苏氨酸的过程中,天冬氨酸激酶 I 可被一分支的末端产物苏氨酸抑制,以停止苏氨酸的继续合成;天冬氨酸激酶 II 则可被另一分支的末端产物赖氨酸抑制,终止赖氨酸的积累。它们彼此互不干扰。

(2) 协同反馈抑制。在分支代谢途径中,只有当几个分支的末端产物同时过量时才能抑制分支以前某个酶的活性。

(3) 合作反馈抑制。又称增效反馈抑制。在分支代谢途径中,当两个分支的末端产物同时存在时,反馈抑制明显强于一种末端产物。

(4) 累积反馈抑制。在分支代谢途径中,每个分支的末端产物按一定比例单独抑制分支以前某个酶的活性;当几种末端产物共同存在时,抑制作用具有累积效应。

(5) 顺序反馈抑制。在顺序反馈抑制中,直接对分支以前某个酶的活性起控制作用的,并不是各分支的末端产物,而是这个酶的反应产物;每个分支的末端产物通过各自前端的中间产物逐步有顺序地推进,最终抑制分支以前这个共同酶的活性。

(二)反馈抑制的机制

由上述讨论可知,反馈抑制的类型多种多样,但它们的作用方式几乎集中于末端产物对代谢途径中第一个酶的抑制。这个受末端产物抑制的酶通常是变构酶。变构酶一般具有两个或两个以上呈现立体专一性的结合部位。其中,能与底物结合并具有催化活性的部位,称作活性中心;能与效应物结合的部位,称作调节中心。效应物与酶结合,可引起变构酶的结构和性质发生明显而又可逆的变化。增强活性中心对底物的亲和力的效应物,称为激活剂(activator);反之,削弱活性中心对底物的亲和力的效应物,称为抑制剂(inhibitor)。

变构酶激活与抑制的机理如图 5-3 所示。抑制剂与调节中心(通常位于变构酶的调节亚基上)结合可引起酶构象的变化,使活性中心(通常位于变构酶的催化亚基上)不能再与底物结合而丧失催化活力。常见的抑制剂是末端代谢产物或其结构类似物。抑制剂的作用是可逆的,一旦浓度降低,酶活性就会恢复。

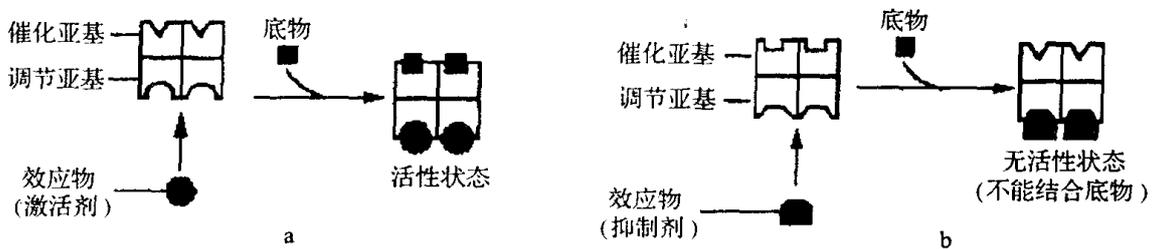


图 5-3 变构酶的激活与抑制

a. 激活剂激活无活性的酶; b. 抑制剂抑制有活性的酶

调节酶一般由变构酶担当。在分支代谢途径中,它通常催化分支前的第一个反应。调节酶的功能为:① 通过反馈抑制,控制末端产物的浓度;② 协调不同分支代谢途径,满足各种末端产物的生理需要。

二、酶合成调节

通过改变酶的合成数量来调节代谢速率的调节方式,称为酶合成调节。这种调节发生在基因转录水平上,主要作用是阻遏酶的过量合成,具有间接、缓慢的特点。

(一)酶合成调节的类型

1. 酶合成的诱导 根据酶对环境条件的响应,可把酶分为组成酶(structural enzyme)和诱导酶(inducible enzyme)。组成酶是菌体固有的酶,它们的合成不受环境条件的影响,在细胞内的含量相对稳定。诱导酶平时不存在于菌体中,只有当环境中出现诱导剂(inducer)时,它们才开始合成,一旦诱导剂消失,酶的合成也将终止。这种环境物质(诱导剂)诱发微生物合成相应的酶的现象,称为酶的诱导。

酶的诱导可分为同时诱导和顺序诱导。同时诱导是指加入一种诱导剂后,微生物同时或几乎同时合成代谢途径中的几种酶。这种诱导主要存在于较短的代谢途径中,合成这些酶的基因通常由同一个操纵子控制。顺序诱导是指第一种酶的底物会诱发第一种酶的合成,第一种酶的产物则可诱导第二种酶的合成。依此类推,合成代谢途径中的一系列酶。这种诱导主要存在于较长的代谢途径中,可对较为复杂的代谢途径进行分段调节。

酶的诱导,可使微生物在代谢需要时才合成有关的酶,可避免由此造成的营养物和能量的浪费。诱导酶与组成酶的区别是酶合成调节体系受控程度的不同。在工业生产中,常采取诱变育种等手段使诱导酶转化为组成酶,以此获得所需的代谢产物。

2. 酶合成的阻遏 在某代谢途径中,末端产物过量会阻遏酶的合成,由此调节代谢速率,减少末端产物生成。这种现象称为酶合成的阻遏;被阻遏的酶称为阻遏酶(repressible enzyme)。酶合成的阻遏主要有末端产物阻遏和中间产物阻遏两种类型。

(1)末端产物阻遏。由于代谢途径中的末端产物过量积累而引起酶合成的(反馈)阻遏,称为末端产物阻遏。这一类型的阻遏通常发生在合成代谢中,特别是在氨基酸、核苷酸和维生素的合成途径中。对于直线式代谢途径,末端产物阻遏较为简单,它使代谢途径中各种酶的合成

全部停止。对于分支代谢途径,每种末端产物只阻遏自己所在的分支途径的酶的合成;分支点以前的“公共酶”则受所有分支途径末端产物的共同阻遏。任何一种末端产物单独存在,都不影响“公共酶”的合成;只有当所有末端产物同时存在时,“公共酶”的合成才被阻遏。这种现象称为多价阻遏。

在微生物的代谢调节中,末端产物阻遏具有十分重要的作用。它可维持细胞内各种物质浓度的稳定。当某种产物足够时或外界加入该物质时,停止有关酶的合成;当这种物质缺乏时,则重新开始有关酶的合成。

(2)中间产物阻遏。环境中同时存在两种底物(碳源或氮源)时,一种底物会阻遏与另一种底物有关的酶的合成。这种阻遏并不是前一种底物的直接作用,而是它分解产生的中间产物的间接作用。这种由中间产物引起的酶合成的阻遏,称为中间产物阻遏。葡萄糖效应即为中间产物阻遏所致。1942年,Monod在采用混合碳源研究大肠杆菌的生长时发现,如果培养基中存在葡萄糖和乳糖,那么,大肠杆菌优先利用葡萄糖,并且只有当葡萄糖耗尽后乳糖才开始衰减。以葡萄糖为基质的大肠杆菌的对数生长期与以乳糖为基质的对数生长期,被一个延滞生长期隔断,这种现象叫做“二次生长现象”(图5-4),又称葡萄糖效应。在多基质的环境中,二次生长现象普遍存在。

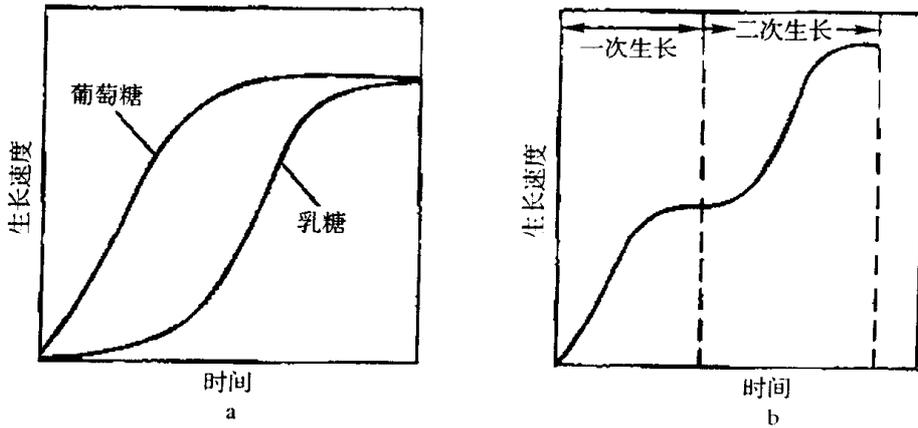


图 5-4 大肠杆菌的二次生长现象

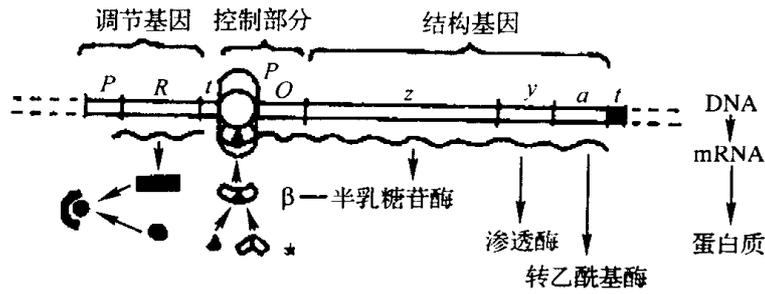
- a. 葡萄糖单独存在时,菌体生长几乎没有延滞期;
乳糖单独存在时,菌体生长有明显的延滞期;
- b. 葡萄糖和乳糖同时存在时,菌体呈二次生长

(二)酶合成调节的机制

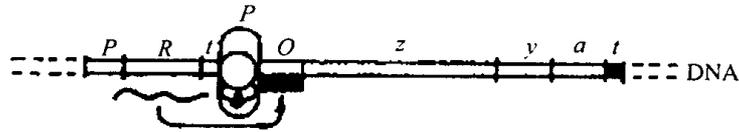
1. 乳糖操纵子负调控模型 大肠杆菌的乳糖操纵子由 *lac* 启动基因, *lac* 操纵基因和 *z*、*y*、*a* 三个结构基因组成。*z*、*y*、*a* 分别编码 β -半乳糖苷酶、渗透酶和转乙酰基酶。缺乏诱导物(如乳糖)时,调节基因产生大量的阻遏蛋白;后者与操纵基因结合,阻碍 RNA 多聚酶对结构基因的转录。相反,存在诱导物(如乳糖)时,乳糖与阻遏蛋白结合,致使阻遏蛋白发生构象变化而降低对操纵基因的亲和力;RNA 多聚酶对结构基因的转录得以启动,并通过翻译合成大量的诱导酶(图 5-5)。由于没有诱导物时阻遏蛋白与操纵基因结合, RNA 多聚酶不能发挥作用;存在诱导物时阻遏蛋白与操纵基因分离, RNA 多聚酶发挥作用,这种酶合成阻遏机制被称为负调控模型。

若调节基因发生突变,不能产生活跃的阻遏蛋白;或者操纵基因发生突变,不能与阻遏蛋白结合,则无论诱导物存在与否,结构基因所编码的酶总能合成,这些酶即转变成组成酶。

(1)存在诱导物(乳糖)时,mRNA 得到转录



(2)不存在诱导物时,mRNA 无法转录



(3)诱导物和辅阻遏物(葡萄糖)存在时

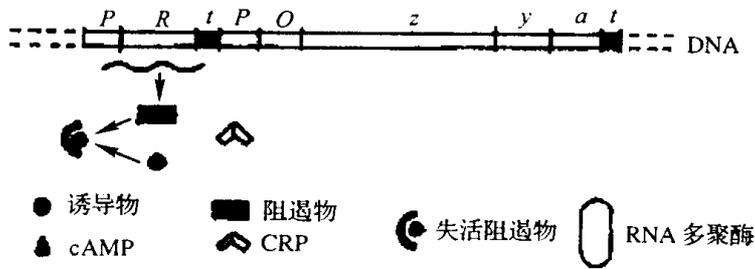


图 5-5 乳糖操纵子的调节示意图

P 为启动基因, O 为操纵基因, z 、 y 、 a 为三个结构基因, R 为调节基因, t 为终止基因

2. 乳糖操纵子正调控模型 在含有葡萄糖和乳糖的培养基中,大肠杆菌之所以优先利用葡萄糖是因为:① 降解葡萄糖所需的酶为组成酶,而降解乳糖所需的酶为诱导酶;② 降解乳糖所需的酶受葡萄糖的间接阻遏。在乳糖操纵子中,RNA 聚合酶不能直接与启动基因结合;只有当环腺苷酸(cAMP)与环腺苷酸受体蛋白(CRP)组成复合物,并使这种复合物与启动基因结合时,RNA 聚合酶才能与启动基因结合而开始乳糖操纵子的转录。cAMP 的合成需要 ATP 和腺苷酸环化酶:



在大肠杆菌中,cAMP 一方面由腺苷酸环化酶催化合成,另一方面由磷酸二酯酶催化分解。葡萄糖可抑制腺苷酸环化酶的活性或增强磷酸二酯酶的活性,因此葡萄糖会降低细胞内的 cAMP 浓度,最终影响基因转录。由于存在代谢物时环腺苷酸受体蛋白与 DNA 上的结合位点结合,RNA 聚合酶发挥作用;没有代谢物时,环腺苷酸受体蛋白不能与 DNA 上的结合位点结合,RNA 聚合酶不发挥作用,这种酶合成阻遏机制被称为正调控模型(图 5-5)。

乳糖操纵子正、负调控模型比较见表 5-5。

表 5-5 乳糖操纵子正调控模型和负调控模型比较

	正调控系统	负调控系统
主要作用因子	CAP-cAMP	阻遏蛋白
转录	进行	抑制
作用位点	启动基因	操纵基因
消除作用的因子	葡萄糖	乳糖

复习思考题

1. 何谓营养物质、营养和代谢?
2. 按照生理需要划分,微生物需要哪些营养物质?
3. 简述微生物的四种基本营养类型。
4. 简述微生物摄取营养物质的四种基本方式。
5. 何谓培养基? 简述配制培养基的原则和培养基的种类。
6. 试比较呼吸、厌氧呼吸和发酵的特点。
7. 简述糖酵解途径和三羧酸循环。
8. 何谓酶活性调节和酶合成调节?
9. 分支代谢途径中反馈抑制有哪几种方式?
10. 简述乳糖操纵子正调控模型和乳糖操纵子负调控模型。

第六章 微生物的生长繁殖与遗传变异

在适宜的环境条件下,微生物不断地吸收营养物质,并按照自己的代谢方式进行代谢活动,如果同化作用大于异化作用,那么细胞的质量就会逐渐增加,体积不断膨大,于是表现为生长。当细胞生长到一定程度时,即以二分裂的方式形成两个基本相似的子细胞。

对于单细胞微生物,这种细胞分裂引起个体数目的增加称为繁殖。在繁殖过程中,微生物将亲代的性状传递给子代,叫做遗传。由于外界条件的作用,有时微生物的遗传物质会发生结构上的变化,这种变化就是变异。本章着重介绍微生物的生长、繁殖、遗传、变异等方面的内容。

第一节 微生物生长的测定

一、总菌数的测定

(一) 显微计数法

显微计数法采用特制的细菌计数器或血球计数器测定细胞的数量。操作步骤如图 6-1 所示,将一定稀释度的细胞悬液加到固定体积的计数器小室内,在显微镜下观察其中的细胞数,计算每毫升或每克样品中的总菌数量。

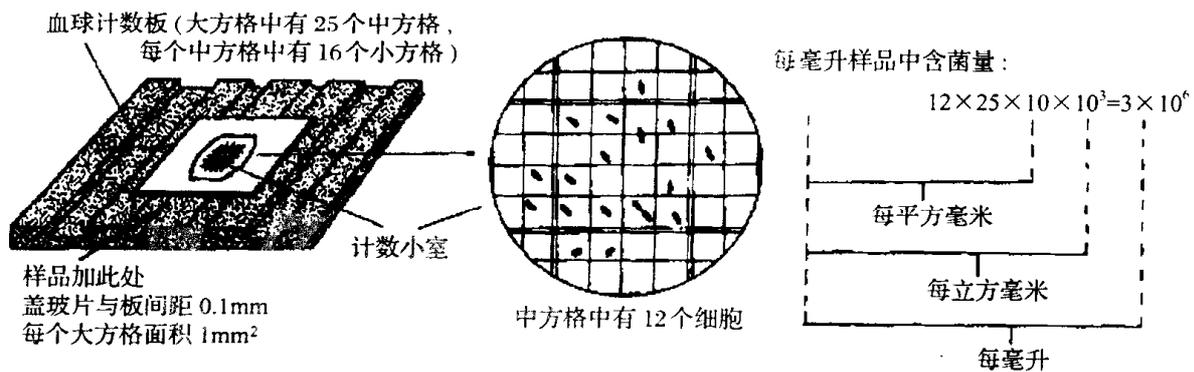


图 6-1 利用血球计数板测定细胞个数的程序

显微计数法的优点是简便、快速。缺陷是局限于单细胞微生物的计数,不适用于多细胞微生物。

(二) 电子自动计数器法

电子自动计数器具有一个特制穿孔的玻璃薄膜,当一定量的细胞悬液高速流过玻璃薄膜上的小孔时,由于菌体与溶液的导电性不同,可形成电脉冲信号而被自动记录下来。此法快速、精确,但易受细胞悬液中杂物的干扰(电子计数器不能区别菌体与杂物),且局限于单细胞微生物的计数。

(三)比浊法

菌体悬液中的细胞浓度与浊度成正比。在某一波长(600~700 nm)下测定菌体悬液的光密度,可通过标准曲线计算其中的细胞含量。该方法的缺陷是,有时培养基成分和代谢产物对测定有干扰;另外,这种方法既不适用于颜色较深的样品和含有固体颗粒的样品,也不适用于多细胞微生物的计数。

二、活菌数的测定

(一)平皿菌落计数法

将样品制成菌体悬液,作一系列 10 倍稀释后,取一定稀释度的菌体悬液 1.0 mL(或 0.1 mL)涂布在固体培养基表面(涂布法);或将菌体悬液与融化并降温至 45~50°C 的培养基混匀(混菌法),静置冷凝。倒置平皿,在适温下培养一定时间后,观察平皿中的菌落数。由平皿菌落数、接种量和稀释倍数计算样品的含菌数(图 6-2)。平皿菌落计数法常用每毫升或每克样品的菌落形成单位(colony formation unit, CFU)来表示样品的含菌数。该法适用于细菌和酵母菌等单细胞微生物的计数,不适用于霉菌等多细胞微生物的计数。

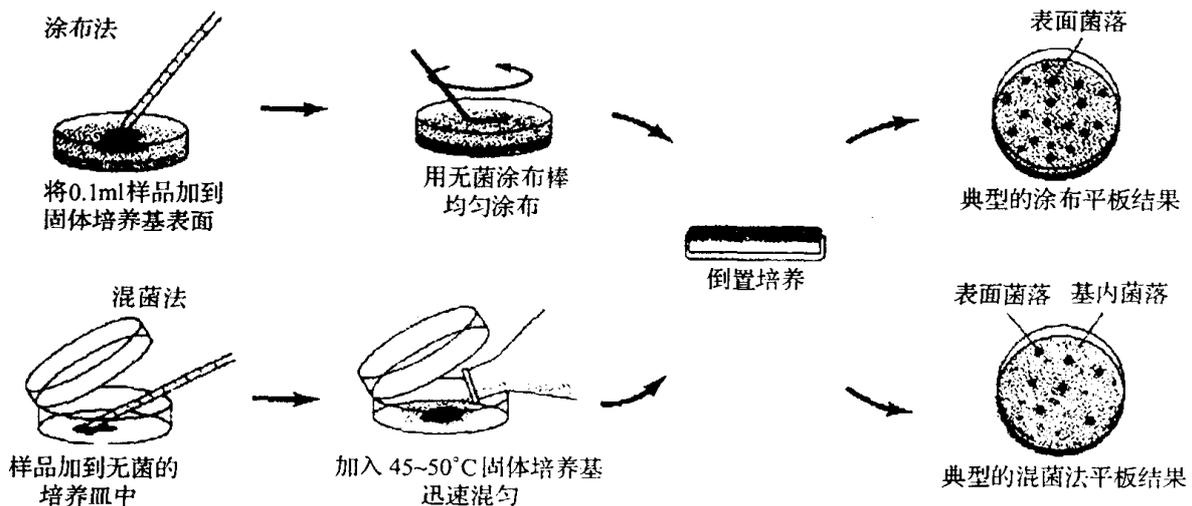


图 6-2 两种常用的平皿菌落计数方法

(二)试管稀释法

将样品制成菌体悬液,作一系列 10 倍稀释。取合适稀释度的稀释液接种到培养基中,每个稀释度设 3~5 个重复。在适温下培养后,记录每个稀释度长菌的试管数,然后查最大可能数表(Most Probable Number, MPN),根据稀释倍数计算样品的含菌数。

(三)薄膜过滤法

薄膜过滤法特别适用于含菌量较少的液体样品。滤膜的孔径为 0.45 μm 或 0.22 μm 。液体样品通过滤膜后,菌体被截留在滤膜上,将滤膜贴放在平板上培养,由长出的菌落数和过滤样品的体积,即可计算样品的含菌量。

三、霉菌生长的测定

(一)平皿培养法

将霉菌接种在平板的中央,间隔一定时间测量菌落的直径或面积。对于生长快的霉菌,每

24 h 测量一次;对于生长缓慢的霉菌,数日测量一次,直到菌落掩盖全皿。由此算出菌丝的平均生长速率,并绘出生长曲线。该法的缺点是只能测定菌落的直径或面积,不能测定菌落的厚度(基内菌丝很难测定),所以不能反映霉菌菌丝总量。

(二)U 形管培养法

在 U 形管底部铺设一层培养基,从 U 形管的一端将霉菌接种到培养基上(图 6-3)。间隔一定时间,测菌丝长度。此法的优点是可以延长试验时间,菌落不易被污染。缺点是不能测定菌丝总量。

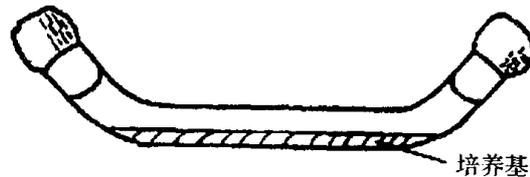


图 6-3 测定霉菌生长用的 U 形管

四、生物量的测定

(一)菌体干重的测定

用清水洗净培养液中的菌体,然后在 100℃ 左右将菌体烘干或减压干燥,由菌体干重计算生物量。菌体鲜重则可由干重换算。细菌的干重为鲜重的 20%~25%,酵母的干重为鲜重的 15%~30%,霉菌的干重为鲜重的 10%~15%。

菌丝的干重测定有两种方法:① 振荡培养一定时间后,过滤收集培养液中的菌丝,洗净,置 80~100℃ 烘箱中烘干或在 60℃ 下真空干燥,称重;② 在固体培养基上培养一定时间后,加热融化琼脂,滤出菌丝,用热水洗净,再烘干称重。

(二)菌体含氮量的测定

从培养物中分离菌体,洗净(排除培养基带人的含氮物质),再用凯氏定氮法测定含氮量。由菌体含氮量即可推算生物量。细菌的含氮量为其干重的 12.5%,酵母菌为 7.5%,霉菌为 6.0%。

(三)菌体 DNA 含量的测定

在菌体中 DNA 的含量相对稳定,每个细菌平均 DNA 含量为 8.4×10^{-5} ng。通过 DNA 与 3,6-二氨基苯甲酸-盐酸溶液的特殊荧光反应,可以测定菌体悬液的 DNA 含量。由每个细菌的平均 DNA 含量可进一步算出细菌数量。

第二节 微生物的生长

环境条件不同,微生物的生长速率差异很大。在加富培养基上,细菌的倍增时间可短至 10 min;而在某些自然条件下,细菌的倍增时间可长至 100 年。迄今为止,绝大部分有关微生物生长的知识,都是通过纯培养试验获得的。根据培养基的投加方式,纯培养可分为分批培养和连续培养;按照供氧状况,又可分为好氧培养和厌氧培养。

一、分批培养(batch culture)

把微生物接种于一定容积的培养基中,培养后一次收获,这种培养称为分批培养。

(一)细菌生长曲线

在分批培养中,将少量细菌接种到一定容积的新鲜培养液中,于适宜条件下培养,细菌会生长繁殖。以培养时间为横座标,以细菌数的对数为纵座标作图,可绘得细菌生长曲线。该曲线可区分为延滞期、对数期、稳定期和衰亡期(图 6-4)。

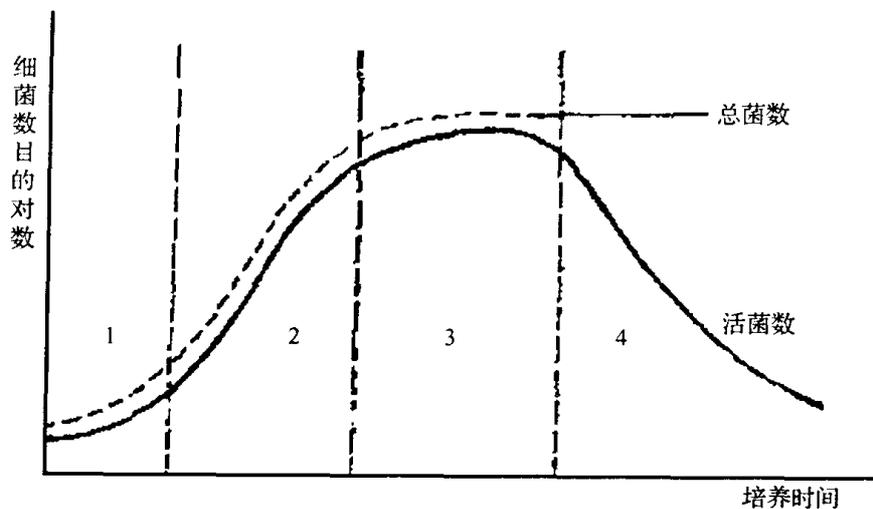


图 6-4 细菌的生长曲线

1. 延滞生长期; 2. 对数生长期; 3. 稳定生长期; 4. 衰亡生长期

1. 延滞生长期(lag phase) 亦称延滞期。细菌进入新的环境后,需要一定时间的调整和适应,一般不会立即繁殖。在初始阶段,细菌数目(或菌体重量)几乎不增加,甚至稍有减少。培养一段时间后,菌体细胞物质开始增加,细胞体积增大;代谢机能活化,大量合成诱导酶、辅酶以及其他产物,以适应环境的变化;核糖体合成加快,RNA 含量升高。接着,细胞开始分裂。

延滞生长期的长短与菌种的遗传特性、菌龄、接种量以及移接前后的环境条件有关。缩短延滞生长期的主要措施是:采用适当菌龄的菌种;配制接近种子培养基的发酵培养基等。

2. 对数生长期(log phase) 又称指数期(exponential phase)。经过延滞生长期的适应,细胞分裂速率加快,个体数目以几何级数增长($2^0 \rightarrow 2^1 \rightarrow 2^2 \rightarrow 2^3 \rightarrow 2^4 \rightarrow 2^5$);分裂 n 次后,细胞的数量达到 2^n 个。由于细菌个体数目与时间之间的关系服从对数规律,通常将这一生长时期称为对数生长期。

研究证明,细菌的生长(对于单细胞微生物,应理解为生长与增殖之和)速率与现有的细菌浓度成正比。即

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (6-1)$$

式 6-1 中, dX/dt 指细菌的生长速度; X 指细菌浓度; μ 指比生长速率常数。

将式 6-1 变形并积分,得:

$$\int_{X_0}^X \frac{dX}{X} = \int_0^t \mu dt \quad (6-2)$$

$$\ln X = \mu t + \ln X_0 \quad \text{或} \quad X = X_0 e^{\mu t} \quad (6-3)$$

式 6-3 中, X_0 指初始细菌浓度; t 指培养时间。

细菌完成一次分裂所需的时间称为代时(generation time) 或倍增时间。由式 6-3 得:

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu t_g \quad (6-4)$$

$$\ln 2 = \mu t_g \quad (6-5)$$

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (6-6)$$

式 6-6 中, t_g 指代时或倍增时间。

由式 6-6 可知, 细菌种类不同, 比生长速度也不同, 表现出来的代时相差很大。有的仅为 9.8 min 左右, 有的长达数天。但在一定条件下, 对于同一种细菌, 它的代时是相对稳定的。

对数生长期细菌的特征是: 个体高速增殖, 代时最短; 活性强, 代谢旺盛; 菌体大小、个体形态、化学组成和生理特性等相对一致。

3. 稳定生长期(stationary phase) 又称最高生长期。经过对数生长期, 培养液中的营养物质消耗很大, 限制性营养物质耗尽; 由于细菌的选择性利用, 营养物质比例失调; 酸、醇、毒素等代谢产物积累, 致使生长条件恶化, 细菌增殖速率逐渐下降, 死亡速率上升。当增殖速率与死亡速率基本持平时, 培养液中活菌数保持相对稳定, 这一时期称为稳定生长期。可用数学式表示为:

$$\frac{dX}{dt} = 0 \quad (6-7)$$

在稳定生长期, 尽管细菌数目没有净增长, 但并不意味细胞停止分裂; 只不过是增加的个体数目与死亡的数目相等。在培养液中的营养物质消耗殆尽后, 细菌会消耗细胞内的贮藏物质, 称之为内源代谢(endogenous metabolism)。此外, 死亡的菌体发生裂解, 释放其中的营养物质, 也可为其他细菌提供养料。

稳定生长期细菌的特征是: 个体数目达到最高; 细菌活性下降, 细胞内开始积累内含物, 如肝糖粒、脂肪粒、PHB 等; 芽孢细菌形成芽孢。

4. 衰亡生长期(decline phase) 在稳定生长期后, 由于营养物质缺乏, 代谢产物积累, 细菌增殖逐渐停止; 死亡不断加速。在某一时段, 活菌数呈几何级数下降, 称之为“对数死亡期”。可用数学式表示为:

$$\frac{dX}{dt} = -k_d X \quad (6-8)$$

式 6-8 中, k_d 指比衰减速率。

衰亡生长期的细菌会呈现畸形或多形态, 细胞内产生液泡和空泡, 甚至细胞自溶而消亡。

(二) 基质浓度对细菌生长的影响

在式 6-1 中, 引入了比生长速率常数(μ)。然而, 比生长速率常数并非是真的常数, 它受基质浓度的影响。经过大量试验, 1940 年 Monod 提出了描述比生长速率与限制性基质浓度之间关系的经验方程(Monod 方程)。其数学表达式为:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S} \quad (6-9)$$

式 6-9 中, μ 指比生长速率; μ_{\max} 指最大比生长速率; S 指限制性基质浓度; K_s 指半饱和常数(比生长速率达到最大比生长速率一半时的基质浓度)。

将式 6-9 代入式 6-1 中, 可得:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{\max} S X}{K_s + S} \quad (6-10)$$

在限制性基质浓度很高时, $S \gg K_s$, 式 6-10 转变为:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} X \quad (S \gg K_s) \quad (6-11)$$

比生长速率基本上等于最大比生长速率,即细菌生长不受限制性基质浓度的影响。

在限制性基质浓度很低时, $S \ll K_s$, 式 6-10 转变为:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{\max} S X}{K_s} \quad (S \ll K_s) \quad (6-12)$$

比生长速率偏离最大比生长速率较大,细菌生长速率不但与现有的菌体浓度有关,而且还受限制性基质浓度的制约。

在培养过程中,细菌对基质的利用速率与生长速率有关,可用数学式表达为:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y} \frac{dX}{dt} \quad (6-13)$$

式 6-13 中, dS/dt 指基质利用速率; Y 指细胞得率 (cell yield, 即消耗单位基质所产生的菌体数量)。

将式 6-10 代入式 6-13, 可得

$$\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y} \frac{\mu_{\max} S X}{K_s + S} \quad (6-14)$$

(三) 霉菌生长曲线

丝状微生物(放线菌、霉菌等)的生长(对多细胞微生物,应理解为真正的生长,不包括繁殖)曲线与单细胞微生物显著不同,一般不出现典型的对数生长期(图 6-5)。

在分批培养中,若以菌丝体干重作为衡量生长的指标,霉菌的生长过程大致可分为停滞生长期、迅速生长期和衰亡生长期三个阶段:

1. 停滞生长期 造成霉菌生长停滞的原因有:孢子萌发前,真正处于停滞状态;虽有生长,但难以测定。

2. 迅速生长期 菌丝体干重迅速增加,其立方根与时间之间呈直线关系。由于繁殖不以几何级数倍增,因而没有对数生长期。在迅速生长期,霉菌代谢旺盛,呼吸强度达到顶峰,碳、氮、磷等被迅速利用。

3. 衰亡生长期 霉菌进入衰亡生长期的标志是菌丝体干重下降。通常在短时间内,菌丝体失重很快;但此后变化趋缓。此时合成大多数次级代谢产物(如抗生素)。

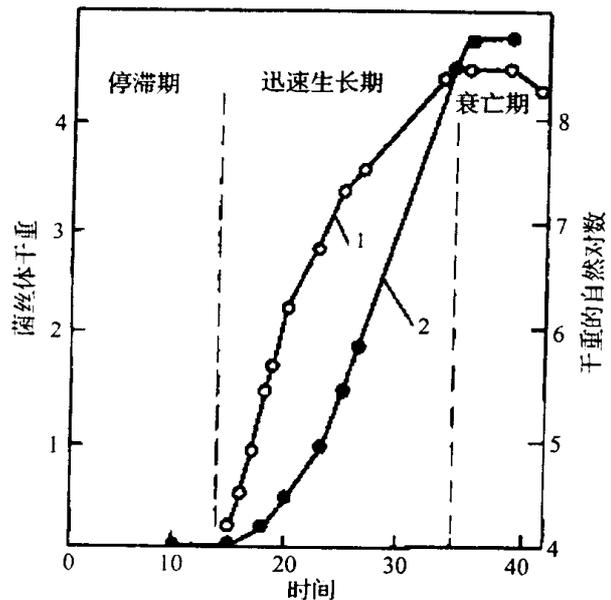


图 6-5 霉菌生长曲线

(曲线 1 对应左纵坐标;曲线 2 对应右侧的纵坐标)

二、连续培养(continuous culture)

在分批培养中,由于基质的消耗和有害产物的积累,环境条件不断变化,使微生物不能长久地保持在对数生长状态。经过一段时间后,微生物便停止生长,继而开始死亡。如果改变培养方法,在微生物处于对数生长状态时,不断添加新鲜培养基,同时排出等量的培养液。这样,由于消耗的营养物质得到及时补充,有害产物得到及时排除,微生物的对数生长状态就能长时间

地保持。这种连续补料和出料的培养方法称为连续培养。

连续培养的控制方法有两种：恒浊连续培养和恒化连续培养。恒浊连续培养是指在保持培养基总体积不变的条件下，通过自动化仪表调节培养基的输入速率和输出速率，使培养液中的微生物浓度保持恒定的培养方法。恒化连续培养则是指在保持培养基总体积不变的条件下，以稳定的速率输入培养基并以同一速率输出培养液，通过控制培养液中限制性基质的浓度来调节微生物的生长速率，使菌体浓度保持恒定的培养方法。下面就恒化连续培养作一具体介绍。

(一) 恒化器中培养液的稀释率

用于恒化连续培养的生物反应器，叫做恒化器(chemostat)。在恒化连续培养中，新鲜培养基以不变的流速输入恒化器，并立即与恒化器内的培养液充分混合。经过混合的培养液以相同的流速从恒化器输出。在恒化器内，培养液的体积保持不变。显而易见，恒化器内培养液的更换速率与新鲜培养基的输入速率以及培养液的总体积有关。当培养液的总体积不变时，更换速率与新鲜培养基的输入速率成正比。更换速率常用稀释率来表示：

$$D = \frac{F}{V} \quad (6-15)$$

式 6-15 中， D 指稀释率； F 指新鲜培养基的输入速率； V 指恒化器内培养液的总体积。

稀释率的倒数表示培养液在恒化器中的平均停留时间。

(二) 恒化器中细菌浓度的变化

假设新鲜培养基输入时恒化器内没有细菌生长，那么培养液中原有的细菌会随培养液的输出而流失。其流失速率为：

$$\left(-\frac{dX}{dt}\right)_{\text{流}} = \frac{FX}{V} = DX \quad (6-16)$$

式 6-16 中， $\left(-\frac{dX}{dt}\right)_{\text{流}}$ 指细菌流失速率。

对于连续培养，通常认为细菌处于对数生长期，遵循对数生长规律(式 6-1)。

在恒化器中，单位时间内细菌浓度的变化(净生长速率)等于增殖所致的细菌浓度升高(生长速率)与流失所致的细菌浓度下降(流失速率)之差。即

$$\text{净生长速率} = \text{生长速率} - \text{流失速率} \quad (6-17)$$

可用数学式表示为

$$\left(\frac{dX}{dt}\right)_{\text{净}} = \mu X - DX \quad (6-18)$$

式 6-18 中， $\left(-\frac{dX}{dt}\right)_{\text{净}}$ 指细菌净生长速率。

关于式 6-18，可能有三种情况：① 如果 $\mu > D$ ，则 $\left(-\frac{dX}{dt}\right)_{\text{净}} > 0$ ，恒化器内的细菌浓度不断升高。② 如果 $\mu < D$ ，则 $\left(-\frac{dX}{dt}\right)_{\text{净}} < 0$ ，恒化器内的细菌浓度不断降低，最终趋向于零，细菌被全部洗出。③ 如果 $\mu = D$ ，则 $\left(-\frac{dX}{dt}\right)_{\text{净}} = 0$ ，恒化器内的细菌浓度保持恒定，换言之，细菌浓度处于生长速率等于流出速率的动态平衡状态。连续培养所要求达到的就是这种状况。

(三) 恒化器中基质浓度的变化

在一定条件下，细菌浓度的增加与基质的消耗成正比，即可用式 6-13 表述。

在连续培养中，浓度为 S_0 的限制性基质以一定速率输入恒化器，经过细菌利用，大部分基质被消耗，剩余基质以浓度 S 输出恒化器。恒化器内的基质浓度变化为：

$$\text{基质变化} = \text{基质流入量} - \text{细菌对基质的消耗量} - \text{基质流失量} \quad (6-19)$$

可用数学式表示为：

$$\frac{dS}{dt} = \frac{FS_0}{V} - \frac{1}{Y} \frac{dX}{dt} - \frac{FS}{V} \quad (6-20)$$

把式 6-1 和式 6-15 代入式 6-20, 可得

$$\begin{aligned} \frac{dS}{dt} &= DS_0 - \frac{\mu X}{Y} - DS \\ &= D(S_0 - S) - \frac{\mu X}{Y} \end{aligned} \quad (6-21)$$

式 6-21 中, S_0 指流入的限制性基质浓度; S 指流出的限制性基质浓度。

如同细菌浓度的变化, 恒化器中的基质浓度变化也有三种情况, 只有当 $dS/dt = 0$ 时, 流出的基质浓度才能保持恒定。

三、好氧培养

(一) 好氧培养方法

在有氧呼吸中, 氧起着最终电子受体的作用。对于好氧微生物, 在培养中应首先满足它们对氧的需要。实验室里常用的好氧培养方法有: 平板培养、斜面培养、浅层液体培养、液体振荡培养和通气搅拌培养等。前三种培养方法借助空气的自然扩散供氧, 后两种培养方法则依靠外力强制供氧。

在工业生产(包括废水生物处理)上, 多采用外力强制供氧, 主要供氧方式有鼓风曝气和机械曝气。鼓风曝气是指采用曝气器(扩散板或扩散管)在培养液中引入气泡的曝气方式。鼓风曝气系统通常由鼓风机、曝气器、空气输送管道等组成。机械曝气是指利用叶轮等器械引入气泡的曝气方式。它可分为表面曝气和深层(淹没)曝气两种类型。表面曝气直接从空气吸入氧气, 多用于废水生物处理。深层曝气主要从反应器底部的空气分布管中引入氧气, 应用较广。

(二) 曝气充氧

通过曝气, 空气中的氧传递到培养液中, 氧由气相向液相转移, 最后被微生物利用。气液传质过程通常遵循一定的传质规律, 普遍应用的是双膜理论。

双膜理论认为, 在气-液界面上存在着气膜和液膜, 气膜外和液膜外分别有空气和液体流动, 处于紊流状态; 气膜和液膜则处于层流状态, 没有对流。如果存在氧浓度梯度, 空气中的氧就会沿浓度梯度向气膜传递, 气膜内的氧又会向液膜传递, 最后进入液体。气膜和液膜是氧传递的主要屏障(图 6-6)。

由于氧是一种难溶性气体, 在水中的溶解度很小, 因此液膜的传质阻力远大于气膜。另外, 气膜两侧的压差($P_g - P_i$)很小, 可以认为 $P_g \approx P_i$ 。这样, 气膜和液膜的传质阻力就简化成了液膜的传质阻力。

根据 Fick 第一扩散定律:

$$\frac{dM}{dt} = -D_l A \frac{dC}{dX_f} \quad (6-22)$$

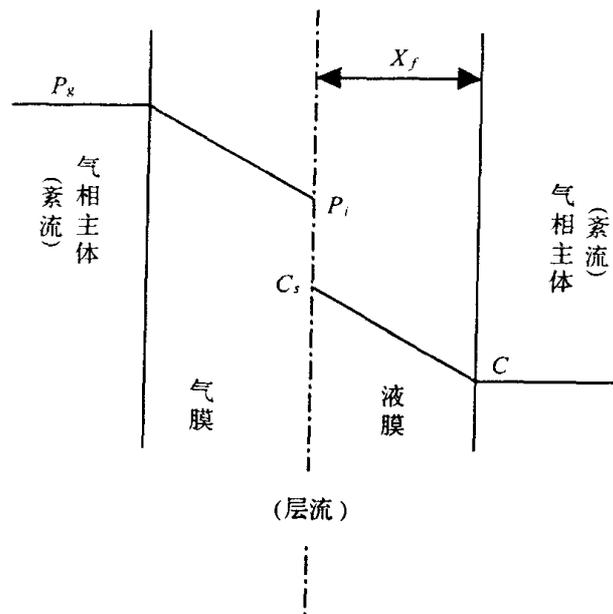


图 6-6 双膜理论模型

式 6-22 中, dM/dt 指氧的传递速率(kg/h); D_L 指氧扩散系数(m^2/h); A 指氧扩散通过的横截面面积(m^2); dC/dX_f 指氧浓度梯度[$kg/(m^3 \cdot m)$]。

因为忽略气膜, 液膜直接与空气接触, 所以液膜外界面上的氧浓度为饱和溶解氧浓度(C_s)。又因为液膜厚度(X_f) 不大, 故液膜内 C_s 与 C 之间的变化近似线性关系。即

$$\frac{dC}{dX_f} \approx \frac{C_s - C}{X_f} \quad (6-23)$$

式 6-23 中, C_s 指液膜外界面上的饱和溶解氧浓度(kg/m^3); C 指液膜内界面上的溶解氧浓度(即液相主体中的溶解氧浓度, kg/m^3)。

将式 6-23 代入式 6-22, 可得

$$\frac{dM}{dt} = - D_L A \frac{C_s - C}{X_f} \quad (6-24)$$

式 6-24 两侧同时除以 V (液体体积):

$$\frac{1}{V} \frac{dM}{dt} = - D_L \frac{A}{V} \frac{C_s - C}{X_f} \quad (6-25)$$

$(\frac{1}{V} \frac{dM}{dt})$ 与 $\frac{dC}{dt}$ 的量纲相同, 均为 $kg/(m^3 \cdot h)$; 用后者取代前者得

$$\frac{dC}{dt} = - D_L \frac{A}{V} \frac{C_s - C}{X_f} \quad (6-26)$$

由于液膜厚度无法测定, 通常将液膜厚度与扩散系数合并为一个新的常数。即

$$K_L = \frac{D_L}{X_f} \quad (6-27)$$

再令

$$a = \frac{A}{V} \quad (6-28)$$

式 6-28 中, a 指单位体积液体中氧扩散的面积(m^2/m^3)。

将式 6-27 和 6-28 代入式 6-26 得

$$\frac{dC}{dt} = K_L a (C_s - C) \quad (6-29)$$

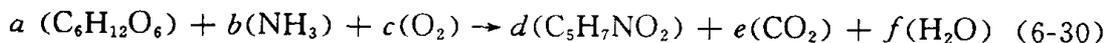
式 6-26 反映了氧从高浓度区域向低浓度区域扩散时的浓度变化, 浓度是随时间而降低的。然而在曝气过程中, 反应器内的氧浓度是随时间而升高的, 因此在式 6-29 中去掉了右侧的负号。

在很多情况下, 氧扩散通过的横截面面积难以确定。为了解决这个问题, 通常把式 6-29 中 $K_L a$ 看成一个常数, 称之为总氧传递系数。

根据式 6-29, 在曝气充氧中要提高充氧速率(dC/dt), 可以从两个方面着手: ① 通过加强液体紊流运动(如搅拌)来减小液膜厚度和加快气-液界面的更新; 选择适宜的曝气器来减小气泡的直径, 增大气-液接触面积; 最终提高 $K_L a$ 值。② 通过提高气相中的氧分压(如采用纯氧曝气、深井曝气等), 提高液膜中的饱和溶解氧浓度(C_s)。

(三) 好氧微生物的生长

在好氧条件下, 微生物将大部分基质(以葡萄糖为例)氧化为二氧化碳和水; 小部分转化为细胞物质(以 $C_5H_7NO_2$ 表示)。即



式中, a, b, c, d, e, f 代表物质的量(mol)。

式 6-30 把微生物生长看成一个化学反应, 把基质看成反应物, 而把细胞物质看成反应产

物。从这个意义上说,基质的减少或细胞物质的增加都可作为微生物生长的衡量指标。在大多数情况下,微生物生长确实遵循上述规律,也即基质的消耗是与微生物的生长相耦联的。但在少数情况下,基质的消耗也会与微生物的生长相分离,虽有基质的分解,但没有微生物的生长。消耗的基质全部用于释放能量,满足细胞维持生命之需。维持细胞生命所需要的能量,称为维持能。维持能对细胞得率可产生较大的影响。

从能量的角度看,基质不同,释放的能量不同;基质相同,代谢途径不同,释放的能量也不同。从碳源的角度看,细胞物质的氧化还原水平接近碳水化合物,若用作碳源的基质氧化水平较高,则需要消耗能量将它还原到细胞物质的水平;反之,若用作碳源的基质氧化水平较低,则只需将它氧化到细胞物质的水平,无需消耗能量。显然,对于不同基质和不同菌种,细胞得率不可能相同(图 6-7)。据报道,葡萄糖的细胞得率为 0.4,五氯酚为 0.05(很低),正十八烷则为 1.49(很高)。

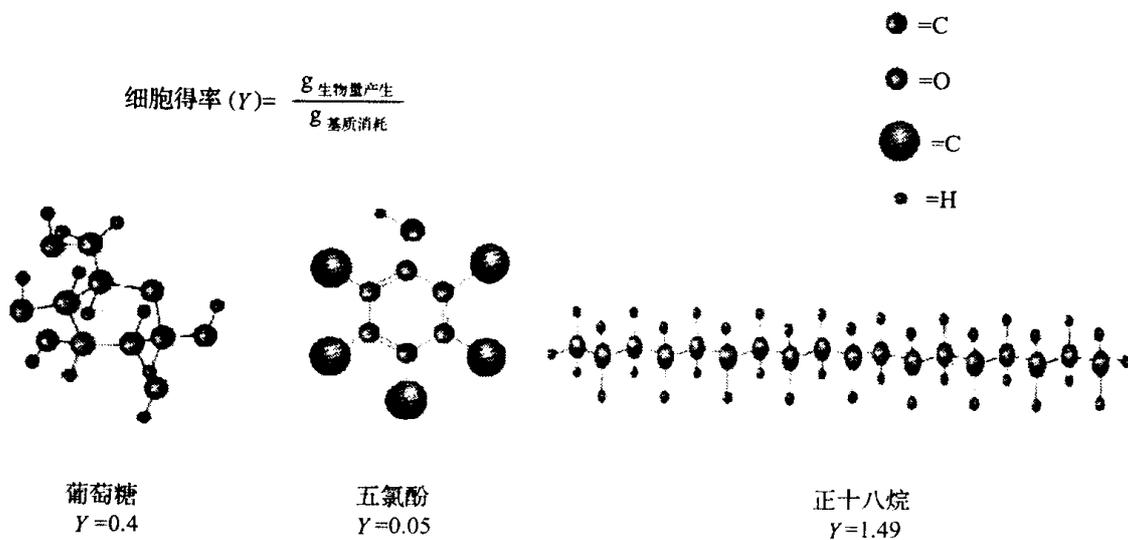


图 6-7 不同基质的细胞得率

关于上述三种基质在细胞得率上的差异,可作如下解释:葡萄糖和正十八烷都是天然有机物,在长期而缓慢的进化过程中,微生物产生并逐渐发展了相应的分解代谢途径。因此对于葡萄糖和正十八烷,微生物的代谢效率较高,细胞得率也较高。五氯酚是人工合成的有机化合物,1936 年才开始商业化生产与应用。对于这类自然界不存在的有机化合物,微生物需要在原有的基础上改造或新建相应的分解代谢途径。由于进化时间不长,微生物分解这类人工有机物的效率往往不如天然有机物,故它们的细胞得率较低也是在情理之中的。同属天然有机物,正十八烷的细胞得率之所以高于葡萄糖,是因为正十八烷的氧化水平低于葡萄糖,在分解代谢中释放的能量远高于葡萄糖。

四、厌氧培养

(一) 创建厌氧环境

在起源上,厌氧微生物在地球上的出现时间早于好氧微生物,它是与原始地球的还原性大气环境相适应的。自从大气中积累氧以后,厌氧微生物的生存空间受到了极大的限制。由于氧对厌氧微生物的毒害作用,厌氧培养所需解决的首要问题是:为微生物创建一个厌氧环境。常见的除氧方法有物理法、化学法和生物学法。

1. 物理法除氧

(1) 煮沸法:通过加热煮沸 15 ~ 20 min,驱除无菌水或液体培养基中的溶解氧。

(2) 表面封闭法:在试管中分装较多的液体培养基,接种后用无菌液体石蜡进行表面封闭,造成厌氧环境。

(3) 抽真空法:将培养物放置于密闭容器内,用真空泵反复抽气,使密闭容器中的气体低于一定水平。

(4) 无氧气体取代法:用无氧的氮气、氩气、氦气等通入液体培养基或密闭容器,驱除并取代原有的气体(包括氧)。

2. 化学法除氧

(1) 焦性没食子酸法:在密闭容器内放置一小块脱脂棉,把一定数量(1 g)的焦性没食子酸加到脱脂棉上,在脱脂棉附近加入浓氢氧化钠溶液(10 mL 10% NaOH/100 mL 容器),不使两种试剂接触。密闭容器并用固体石蜡加封后,使两种试剂接触反应,消耗其中的氧。

(2) 特种催化法:在厌氧培养箱或厌氧培养罐内,采用特种催化剂,使其中的氧与氢反应而去除。

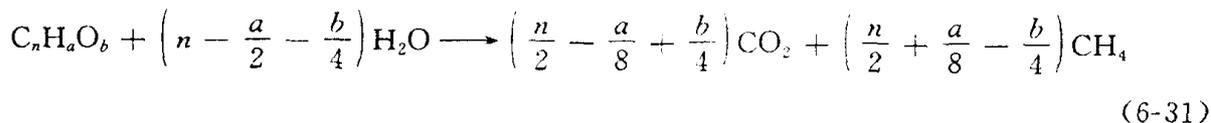
(3) 还原剂法:在液体培养基中加入半胱氨酸、硫化钠等还原性试剂,通过它们与氧的反应来创造厌氧环境。

3. 生物学法除氧

在密闭容器内放入好氧性生物,如某些植物、发芽的种子、好氧微生物等,通过它们的活动来消耗容器中的氧,为厌氧微生物的培养创造条件。

(二) 厌氧微生物的生长

在厌氧条件下,微生物能以硝酸盐、硫酸盐、高价铁、高价锰等作为电子受体进行厌氧呼吸,也能以发酵的中间产物作为电子受体进行发酵。在自然界的许多厌氧生境中,有机物经过多种微生物的协同代谢,最终转化为沼气。即



式 6-31 中, n 、 a 、 b 代表物质的量。

值得注意的是,经过该反应,基质碳被转化为氧化状态最高的二氧化碳或氧化状态最低的甲烷。因此,这个反应被称为有机碳的歧化反应(disproportionation)。反应产物中甲烷和二氧化碳的比例;取决于基质的氧化状态。氧化水平较高的基质(如甲酸、草酸)产生较少的甲烷;氧化水平较低的基质(如甲醇、脂肪酸)产生较多的甲烷。

由于厌氧生长中微生物所用的电子受体的氧化能力弱于氧,因此释放的能量相对较少,细胞得率也相对较低。

第三节 微生物的遗传

微生物通过各种方式繁衍后代,不仅保证了生命的世代延续,也使子代获得了亲代的性状。亲代与子代之间传递的遗传物质是 DNA, DNA 携带了极其丰富的遗传信息。在微生物细胞中, DNA 的半保留复制为遗传信息的准确传递奠定了基础; DNA 至 RNA 的转录为遗传信息发挥作用架起了桥梁;最后, RNA 至蛋白质的翻译则为遗传信息的准确表达创造了良机。

一、DNA 与基因

(一)DNA 的化学组成与结构

DNA 是高分子化合物,相对分子质量为 $2.3 \times 10^4 \sim 1 \times 10^{10}$,大于蛋白质相对分子质量($5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^6$)。在化学组成上,它含有脱氧核糖、磷酸以及腺嘌呤(adenine,A)、鸟嘌呤(guanine,G)、胸腺嘧啶(thymine,T)和胞嘧啶(cytosine,C)四种碱基。在一级结构上,由脱氧核糖和碱基形成脱氧核糖核苷,再由脱氧核糖核苷和磷酸形成单脱氧核糖核苷酸,最后由单脱氧核糖核苷酸通过 3,5-磷酸二酯键连接成直链分子。DNA 分子内四种碱基的排列顺序构成了生物的遗传信息。

关于 DNA 的二级结构,1953 年 Watson 和 Crick 提出了双螺旋结构模型。该模型的要点是:脱氧核糖与磷酸以 3,5-磷酸二酯键交互连接,形成 DNA 的主链并充当 DNA 的骨架;两条主链再以反向平行的方式组成双螺旋;主链位于螺旋的外侧,碱基位于螺旋的内侧;螺旋具有固定且一致的直径。两条主链上的碱基互补配对,即 A 与 T 相配,G 与 C 相配。

相邻的碱基对之间的距离为 0.34 nm,10 个碱基对构成一个螺旋,因此螺距为 3.4 nm。

(二)DNA 的存在形式

1. 原核生物中 DNA 的存在形式 原核生物没有真正的细胞核,遗传物质存在于整个细胞中,没有核膜包围。DNA 有时相对集中,以裸露的形式存在;虽能与少量蛋白质结合,但没有真正的染色体结构(核小体结构)。在原核生物中,常把 DNA 称为染色体。

质粒是原核生物中的染色体外 DNA。

2. 真核生物中 DNA 的存在形式 真核生物的染色体 DNA 存在于细胞核内。它与组蛋白构成核小体,再构成染色体。染色体的数量因种而异,少的几条,多的几十条或更多。

染色体外 DNA 不到染色体 DNA 的 1%;只含 DNA,不含组蛋白;常呈环状;大多存在于细胞器(线粒体和叶绿体)中。

(三)基因

基因是指生物体携带和传递遗传信息的基本单位。它是 DNA 分子上一段特定的核苷酸序列。按照功能基因可分为:①结构基因,转录为 mRNA、tRNA 和 rRNA 的基因;其中,mRNA 编码蛋白质(包括酶)。②操纵基因,一段可以与有活性的阻遏蛋白结合从而阻止转录起始的 DNA 序列。一个典型的操纵基因通常含有回文序列,可以位于启动子和第一个结构基因之间,也可以与启动子重叠,还可以位于启动子内。③调节基因,编码调节蛋白,控制结构基因表达的基因。

大肠杆菌的染色体 DNA 由 4.6×10^6 bp(碱基对)组成,如果每个基因的平均长度为 1 000 bp,整个 DNA 可以容纳 3 000~4 000 个基因。在这些基因中,功能相关的基因经常集中于 DNA 某个区段,形成一个功能单元或转录单元。其中,乳糖操纵子是一个很好的例子。该操纵子由操纵基因和三个结构基因组成,在共同的启动子(基因)和调节基因控制下,作为一个转录单位而转录。根据需要,同时被“打开”(被诱导)或“关闭”(被抑制)。

二、DNA 的复制

自我增殖是包括微生物在内的所有生物的重要功能。在细胞分裂过程中,亲代细胞所含的遗传信息会原原本本地传递给两个子细胞,使子细胞 DNA 携带母细胞的一切遗传信息。为此,亲代 DNA 需要准确复制成两个拷贝,并均匀分配到两个子细胞中去。

双螺旋DNA是怎么复制的呢?实验证明,它是通过半保留机制复制的。在复制过程中,双螺旋DNA的两条单链都用作模板,合成各自的互补链;然后,以一条新链与一条母链组成的DNA双链,均匀分配到两个子细胞中去。由于每个子细胞DNA双链中都保留了母细胞的一条DNA单链,这种复制方式就称为半保留复制。

因为DNA的复制是以母链为模板,通过碱基互补配对合成的,所以母链DNA所携带的遗传信息能够准确无误地拷贝至新链上,并通过DNA的均匀分配保证母细胞把所有属性全部传递给子代细胞,使微生物的遗传性(种质)相对稳定。

三、RNA的合成(转录)

在生物体中,DNA是遗传信息的贮藏者,但并不直接发挥作用。子细胞从母细胞获得DNA后,蕴藏于DNA中的遗传信息必须传递给RNA,再由RNA指导蛋白质合成,最终由蛋白质来行使遗传信息的功能。这就是表述遗传信息流向的中心法则(图6-8)。

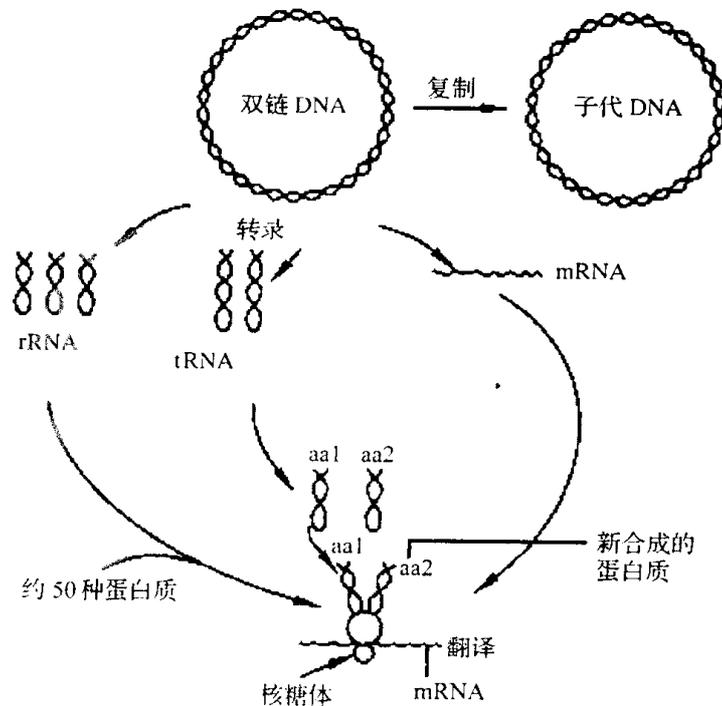


图 6-8 核酸和蛋白质的合成模式

RNA也是高分子化合物,由核糖、磷酸以及腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶和胞嘧啶四种碱基组成,由核糖和碱基缩合成核糖核苷,再由核糖核苷和磷酸形成单核糖核苷酸,最后单核苷酸通过3,5-磷酸二酯键连接成直链分子。在遗传信息传递中,它起着遗传信息从DNA流向蛋白质的“中心站”的作用。以DNA为模板合成RNA的过程称为转录。转录与复制相似,也是通过碱基互补配对合成新链的。两者的差别在于:合成DNA的材料是脱氧核糖核苷酸,合成RNA的材料则是核糖核苷酸;复制中的碱基互补配对为A—T和G—C,转录中的碱基互补配对为A—U和G—C。

通过转录,贮存于DNA中的遗传信息传递给RNA。转录的产物有mRNA、rRNA和tRNA。mRNA叫信使RNA,是单链RNA分子,带有指导蛋白质合成的遗传信息。每三个连续排列的核苷酸(即一个三联体)规定一种氨基酸,称为密码子。来自DNA的遗传信息即以密

码子的形式贮存于 mRNA 中。rRNA 叫核糖体 RNA,是组成核糖体的结构成分,核糖体是蛋白质合成的场所。tRNA 叫转移 RNA,在蛋白质的生物合成中起着识别和转运氨基酸的作用。

原核生物的基因在 DNA 上的分布是连续的,转录产生的 mRNA 可直接翻译成蛋白质。真核细胞的基因在 DNA 上的分布则是不连续的,往往在编码蛋白质的序列(外显子,exon)之间含有不编码蛋白质的序列(内含子,intron)。转录产生的 mRNA 不能直接翻译成蛋白质,需要通过加工,切除内含子,拼接外显子,形成成熟的 mRNA 后,才能翻译成蛋白质。

四、蛋白质的合成

蛋白质是由许多(20种)氨基酸通过肽键缩合而成的高分子化合物。它是生命活动的物质基础,也是遗传信息的体现者。以 mRNA 为模板合成蛋白质的过程称为翻译。由于在 DNA 转录成 mRNA 的过程中,已将亲本细胞的遗传信息传给 mRNA;tRNA 又根据 mRNA 上密码子的要求识别和转运氨基酸,最终使 DNA 上的核苷酸序列转变为蛋白质上的氨基酸序列,合成各种蛋白质。亲本细胞的遗传性状也因此得到保持。

第四节 微生物的变异

通过繁殖,子代生物从亲代获得了全部的遗传信息。生物体所携带的遗传信息(或基因)的总和称为遗传型(genotype)。但是,具有某种遗传型的生物个体只有在特定的环境条件下,才能通过生长和发育而表现出各种形态和生理特征。生物个体的这些形态和生理特征的总和称为表型(phenotype)。由于外界条件的差异,同种遗传型的生物会呈现出不同的表型。在这些生物个体中,遗传物质的结构并未发生变化,表型上的差异不能传递给后代。这种变异叫做非遗传型变异。反之,有些生物个体表型上的差异是遗传物质的结构发生变化引起的,可以传递给后代。这种变异叫做遗传型变异。

一、非遗传型变异

非遗传型变异是在遗传物质的结构没有改变的情况下发生的微生物某些性状的改变。这种表型上的变异没有遗传性,主要由环境条件改变所致,一旦环境条件复原,变异随之消失。例如,在 25℃ 下培养时,粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)会产生一种深红色的灵杆菌素,把菌落染成血红色;将培养温度提高至 37℃ 后,群体中的所有细胞都不产色素;如果将培养温度重新降至 25℃,产生色素的能力即恢复。此外,由于细胞群体接受的环境条件改变是平等的,非遗传型变异出现时往往涉及许多个体,即许多个体同时变异。

二、遗传型变异

遗传型变异是由于遗传物质的结构发生改变而导致微生物某些性状的改变。突变(mutation)是指核酸中的核苷酸顺序突然产生稳定且可遗传的变化。突变包括染色体畸变(chromosomal aberration)和基因突变(gene mutation,又称点突变)。

(一)基因突变的类型

根据突变菌株所表现的特征不同,可分为:形态突变型、生化突变型、致死突变型、条件致死突变型以及其他突变型。

1. 形态突变型 指发生细胞形态变化或引起菌落形态改变的突变型。如细胞大小、形

状、鞭毛、纤毛、孢子、芽孢、荚膜,以及菌落的大小、外形的光滑或粗糙和颜色等的变异。

2. 生化突变型 指代谢途径发生变异但没有明显形态变化的突变型,如营养缺陷型、抗性突变型和抗原突变型。① 营养缺陷型,基因突变引起代谢过程中某种酶合成能力丧失。对于这类微生物,必须在培养基中添加相应的营养成分才能正常生长。② 抗性突变型,基因突变产生抵抗有害理化因素的能力。如抗药性、抗紫外线、抗噬菌体等。③ 抗原突变型,基因突变引起细胞成分,尤其是细胞表面成分(细胞壁、荚膜、鞭毛等)的细微变异而导致抗原性的变化。

3. 致死突变型 由于基因突变而造成个体死亡的突变型即为致死突变型。

4. 条件致死突变型 即在某一条件下基因突变具有致死效应,而在另一条件下基因突变没有致死效应的突变型。温度敏感突变型是最典型的条件致死突变型,例如有些大肠杆菌突变株可在 37℃ 下生长,但不能在 42℃ 生长。

(二) 基因突变的机制

基因突变可分为自发突变和诱发突变。

1. 自发突变 自发突变是指微生物在没有人工参与下所发生的突变。① 背景辐射和环境因素的诱变。不少自发突变来自一些原因不详的低剂量诱变因素的长期综合诱变。② 微生物自身有害代谢产物的诱变。如咖啡碱、硫氰化合物、二硫化二丙烯、重氮丝氨酸及过氧化氢等,既是微生物的代谢产物,也是微生物自发突变的诱变剂。因此,在陈旧的培养基中,许多微生物易发生自发突变。③ 环出效应,即环状突出效应。在 DNA 复制过程中,如果某一单链上偶然产生一个小环,该小环上的基因就会被越过而发生缺失,引起自发突变。④ 互变异构效应。在组成 DNA 的四种碱基的第六位上,不是酮基(T 或 G)就是氨基(C 或 A),T 和 G 会发生酮式至烯醇式的互变异构,C 和 A 会发生氨基至亚氨基的变化。这些结构变化可导致碱基错配而引起自发突变。

2. 诱发突变 诱发突变是指微生物在人为诱变剂作用下所发生的突变。凡能提高突变率的任何理化因子,都称为诱变剂(mutagen)。诱变剂的作用机制是引起碱基对置换突变、移码突变和染色体畸变。

(1) 碱基对的置换(substitution) 一对碱基被另一对碱基所置换,有时也称点突变(point mutation)。置换可分为转换和颠换。转换(transition)是指 DNA 分子中的一个嘌呤被另一个嘌呤,或者一个嘧啶被另一个嘧啶所置换。颠换(transversion)是指一个嘌呤被一个嘧啶,或者一个嘧啶被一个嘌呤所置换。对于某种诱变剂,既可同时引起转换和颠换,也可只引起其中一种置换。

(2) 移码突变(frame-shift mutation 或 phase-shift mutation) 诱变剂引起 DNA 分子中的一个或几个核苷酸的增添或缺失,从而使其后的全部遗传密码发生转录和翻译错误的一类突变。

(3) 染色体畸变(chromosomal aberration) 某些理化因子(如 X-射线、烷化剂、亚硝酸等)引起 DNA 分子的大段损伤,从而产生染色体结构上的缺失(deletion)、重复(duplication)、倒位(inversion)和易位(translocation)等变化。

三、原核微生物的基因重组

将两个具有不同性状的生物个体的遗传基因转移至一个生物个体内,使遗传基因重新组合而形成新的遗传型个体的过程,称为基因重组(gene recombination)。原核微生物的主要基因重组方式有转化、转导和接合。

1. 转化(transformation) 受体菌直接吸收来自供体菌的游离 DNA 片段,并整合到自己的基因组中,从而获得供体菌的部分遗传性状的过程,称为转化。受体菌取得的 DNA 片段可以是供体菌自溶释放的,也可以是经过人为加工的。要进行转化,受体菌细胞必须处于感受态。所谓感受态是指细胞能从环境中吸收 DNA 片段,保证它不被体内 DNA 酶水解,并整合到自己的基因组中的生理状态。它与受体菌的遗传性、生理状态、菌龄和培养条件等因素有关。

如果把噬菌体或其他病毒的 DNA 或 RNA 抽提出来,然后让它们去感染宿主,可产生噬菌体或病毒后代。这种特殊的“转化”,称为转染。

2. 转导(transduction) 通过温和噬菌体的介导,将供体菌 DNA 片段带入受体菌中,从而使受体菌获得供体菌的部分遗传性状的过程,称为转导。获得新遗传性状的受体细胞称为转导子(transductant)。转导过程以噬菌体为载体,不需要供体细胞与受体细胞直接接触。

3. 接合(conjugation) 通过两个完整的菌体细胞直接接触,将供体菌 DNA 片段(包括质粒)带入受体菌中,从而使受体菌获得供体菌的部分遗传性状的过程,称为接合。在细菌和放线菌中都存在着接合现象。在大肠杆菌中存在决定性别的 F 因子(质粒),拥有 F 因子的菌株会在细胞表面产生 1~4 条性纤毛,通过它们供体菌可把 F 因子转移至受体菌中。

四、真核微生物的基因重组

在真核微生物中,基因重组主要包括有性杂交和准性生殖等形式。

1. 有性杂交 杂交是在细胞水平上发生的一种遗传重组方式。有性杂交是指通过性细胞之间的接合以及随后发生的染色体重组,产生新的遗传型后代的一种育种技术。产生有性孢子的酵母菌或霉菌,都能进行有性杂交。

2. 准性生殖 准性生殖(parasexual reproduction)是类似于有性生殖,但比有性生殖原始的一种生殖方式。它可使同一生物两个不同来源的体细胞发生融合,不经过减数分裂而导致低频率的基因重组。准性生殖常见于某些真菌,尤其是半知菌中。

复习思考题

1. 简述测定微生物生长的各种方法。
2. 什么叫细菌生长曲线? 可分哪几个生长阶段? 各有什么特点?
3. 简述基质浓度对细菌生长的影响。
4. 什么叫霉菌生长曲线? 可分哪几个生长阶段?
5. 什么叫恒浊连续培养和恒化连续培养?
6. 简述恒化器中的稀释率、菌体浓度和基质浓度的变化。
7. 微生物好氧培养的方法有哪些?
8. 根据双膜理论,你认为怎么样能够提高生物反应器的充氧效率?
9. 为什么基质不同,微生物生长的细胞得率也不同?
10. 厌氧微生物培养中创建厌氧条件的方法有哪些?
11. 何谓有机碳的歧化反应?
12. 何谓基因? 何谓遗传中心法则?
13. 简述基因突变的类型和机制。
14. 简述原核微生物的基因重组方式。

第七章 微生物的生态

微生物极少单独生存。即使将它们分离,每个个体也会增殖而形成群体。这种由一个(或一种)微生物增殖产生的群体,称为种群(population)。在发酵工业中,人们常用种群(纯菌种)来从事生产活动。在自然界,往往多个种群共同生活。这些共同生活于特定空间内的微生物种群的集合,称为群落(community)。在废水生物处理中,人们常用群落(混合菌种)来消除污染物。微生物不仅相互依赖,而且还依赖环境。在群落的基础上,再加上环境,就构成了生态系统(ecosystem),即生态系统=群落+环境。

微生物生态学上的“环境”是指微生物(包括个体或群体)周围一切事物的总和,包括微生物占据的空间以及影响微生物生存和发展的环境因素。环境因素可分为非生物因素和生物因素。

第一节 非生物因素对微生物的影响

一、最小因子定律和耐受性定律

(一)最小因子定律

1840年,德国农业化学家 Liebig 发现,作物产量不受大量需要的营养物质的制约,但受土壤中较为稀少而又为作物必需的营养成分的制约。他认为,就像构成分子的原子一样,构成作物的元素是有特定比例的;作物产量取决于环境中处于最小量状态的营养物质。如果土壤供氮不足,施用再多的磷肥也无济于事。

后来,Liebig 理论被扩展为最小因子定律(law of the minimum)。该定律的基本内容是:任何因子的存在量低于某种生物的最小量时,该因子即成为决定该物种生存或分布的根本因素。

(二)耐受性定律

最小因子定律揭示了最小因子对生物生存的影响,但并未考虑过量因子的影响。为此,1913年美国生态学家 Shelford 提出了耐受性定律(law of tolerance)。该定律的基本内容是:每种生物对环境因素都有一个耐受范围,任何环境因素超过某种生物的耐受限度(上限或下限),都会影响该种生物的生存。

不同物种对环境因素的耐受范围各不相同,同一物种对不同环境因素的耐受范围也不同。

二、温度

温度是影响微生物生存和发展的重要环境因素。随着温度的升高,细胞内的生化反应加快,微生物的生长加速;超过上限温度后,对温度敏感的细胞组分(如蛋白质和核酸)变性加剧,微生物生长停止,甚至死亡。

(一)微生物的温度类型

根据耐受性定律,每种微生物都有特定的最低生长温度、最适生长温度和最高生长温度。按照最适生长温度,可将微生物分为低温微生物、中温微生物和高温微生物三类(表 7-1)。

表 7-1 微生物的生长温度类型

微生物类型	生长温度范围(°C)			主要分布	
	最低	最适	最高		
低温	专性嗜冷	-12	5~15	15~20	地球两极
	兼性嗜冷	-5~0	10~20	25~30	海水及冷藏食品
中温	室温	10~20	20~35	40~45	温带和热带地区
	体温	10~20	35~40	40~45	温血动物
高温	嗜热	25~45	45~60	70~95	堆肥、温泉等
	极端嗜热	<80	80~110	>110	火山泉

1. 低温微生物 低温微生物(psychrophiles)又称嗜冷微生物,可区分为专性嗜冷和兼性嗜冷微生物。专性嗜冷微生物长期生存于寒冷的环境中,耐寒不耐热,短时室温即可致死。兼性嗜冷微生物分布较广,生长温度范围较宽,既能在 0°C 左右生长,也能在室温下生长。兼性嗜冷菌是造成冷藏食品变质和腐败的重要原因,因此需加控制。反之,在废水生物处理系统中富集兼性嗜冷菌,则有助于保持冬季的处理效率。

低温能抑制微生物的生长。在 0°C 以下时,微生物体内的水发生冻结,生化反应难以持续。升至 0°C 以上后,水虽解冻,但在一定的温度范围内,中温和高温微生物的细胞膜仍处于“冻结”状态,营养物质无法进入细胞。微生物体内存在许多复合体(如核糖体、复合酶等),它们通常由两个或两个以上的高分子通过疏水键结合而成。低温可削弱疏水键,使复合体松散而丧失活性。一般低温使微生物停止生长,但并不致死,因此经常采用低温保存菌种。

嗜冷微生物耐低温的机理尚未探明。一般认为其耐低温是因为:①嗜冷菌的细胞膜含有大量不饱和脂肪酸,可在低温下保持半流动状态,从而行使正常功能;②嗜冷菌的酶耐低温,可在低温下保持很高的催化活性。

2. 中温微生物 中温微生物(mesophiles)可区分为室温性和体温性微生物。室温性微生物,如土壤微生物和植物病原菌,适宜生长于 20~25°C。在废水生物处理系统中,它们是降解有机污染物的主力军。体温性微生物多为人和温血动物的病原菌。它们的最适生长温度与宿主的体温相近。

中温微生物不耐低温,通常 10°C 以下不能生长。对大肠杆菌所作的研究表明,当温度低于 10°C 时,中温微生物的蛋白质合成不能启动(一旦启动,则能完成);许多酶对反馈抑制异常敏感,不能行使正常功能。

3. 高温微生物 高温微生物(thermophiles)可区分为嗜热和极端嗜热微生物(hyperthermophiles),前者的最适生长温度高于 45°C,后者高于 80°C。嗜热菌只分布于有限的生境中,如温泉、堆肥、日光直射的土壤表面。这些微生物耐高温,常给罐头工业和发酵工业的灭菌带来麻烦。极端嗜热菌的分布范围更窄,仅发现于海底火山泉和地表火山泉中。从极端嗜热菌提取的酶催化活性高,热稳定性好,具有诱人的开发前景。一般而论,原核微生物的耐高温

能力强于真核微生物；非光合微生物强于光合微生物；构造简单的微生物强于构造复杂的微生物。

高温微生物耐高温的原因是：① 细胞膜中的饱和脂肪酸含量高，比不饱和脂肪酸形成更多的疏水键，不易“熔解”；在古菌中，独特的细胞膜组成可使细胞膜在更高的温度下保持稳定；② 酶和其他蛋白耐高温；③ 合成蛋白质的机构——核糖体耐高温；④ DNA 的(G+C)比例大，熔点高。

(二) 温度对微生物的影响

就总体而言，微生物的生长温度范围很宽，为-12~113℃。但就某种微生物而言，上限值与下限值之差一般不超过 30~40℃。

微生物能够耐受的温度范围与细胞膜的组成有关。嗜冷细菌的细胞膜含有较高比例的短链不饱和脂肪酸，嗜热细菌含有较高比例的长链饱和脂肪酸；极端嗜热细菌则含有独特的类异戊二烯植烷甘油二醚和二植烷二甘油四醚。在低温下保持流动的细胞膜，易在高温下“熔解”；而在高温下保持稳定的细胞膜，则易在低温下“冻结”。虽然环境温度变化时，微生物可调整细胞膜组成(例如，温度升高时，中温微生物可增加细胞膜中长链饱和脂肪酸的比例)，但调整幅度有限。因此，一种微生物很难在很宽的温度范围内生长。

对于缓慢的温度变化，微生物可进行相应的调整，最终产生适应。但是，对于急剧的温度波动，微生物的调整往往跟不上温度升降，因而较难适应。无规律的温度变化对微生物产生的影响远远大于有规律的温度变化。

由于每种生物都有特定的生长温度范围，升高温度可逐渐淘汰某些生物种群。例如，温度超过 50℃时，动物和植物遭淘汰；超过 60℃时，真核微生物(如原生动物、真菌和藻类)遭淘汰；超过 90℃时，光能营养型微生物(如蓝细菌和不产氧光合细菌)遭淘汰。从 90℃上升至 100℃时，极端嗜热细菌不但没被淘汰，反而数量增加；但超过 100℃后，也走向衰退，最后灭绝。

(三) 高温灭菌

高温可引起核酸、蛋白质等生物大分子的变性和细胞结构的破坏，从而杀死微生物。

常用的高温消毒或灭菌方法如图 7-1 所示。

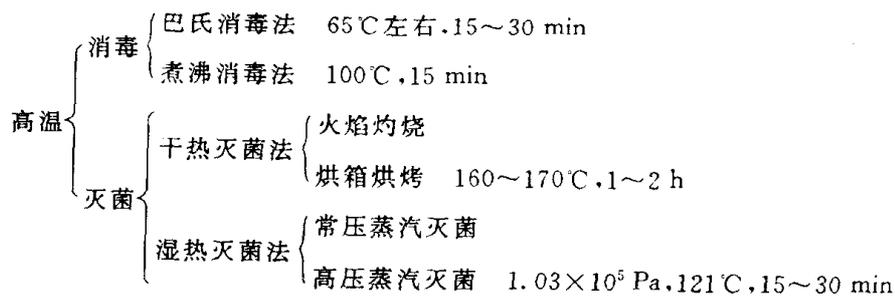


图 7-1 常用的高温消毒或灭菌方法

1. 消毒 消毒(disinfection)是指破坏或去除可能引起感染或产生其他不良影响的微生物的方法。牛奶和啤酒等不能高温灭菌的液体常用巴氏消毒法(pasteurization)处理。巴氏消毒的主要目的是杀死牛奶和啤酒中的无芽孢病原菌，又保持它们的原有风味。应用中，所取的温度和时间略有差异。

煮沸消毒法常用于饮用水的处理，一般煮沸一段时间即可。

2. 干热灭菌 灼烧法(incineration)是最彻底的干热灭菌方法，将需要灭菌的物品直接放在火焰上灼烧少许时间。常用于接种环和接种针等金属制品的灭菌。

烘箱烘烤法利用烘箱内加热的空气灭菌,操作条件为160~170℃,1~2h。常用于金属制品或玻璃器皿的处理。

3. 湿热灭菌 高压湿热灭菌法(normal autoclaving)是应用最广的湿热灭菌方法。其原理是:将待灭菌的物品放置于高压蒸汽灭菌锅中,利用高温蒸汽杀灭物品上的所有微生物(包括耐热的芽孢)。湿热灭菌法的效果优于干热灭菌法,操作条件为压力 1.03×10^5 Pa,温度121℃,时间15~30 min。常用于培养基、多种物料和器材的处理。

间歇灭菌法的操作类似煮沸消毒法,操作条件为常压,100℃,15~30 min。经一次蒸煮后,物品中的微生物营养体被杀灭,但芽孢可能存活。将蒸煮后的物品降至30℃左右,保温过夜,使存活的芽孢萌发为营养体,再次蒸煮杀灭萌发的营养体。如此重复三次,可以彻底灭菌。

三、酸碱度(pH)

pH值是影响微生物生存和发展的另一重要环境因子。其影响途径有:①引起细胞膜电荷的变化,影响微生物对营养物质的吸收;②引起酶活性的改变,影响代谢反应;③引起营养物质可给性的改变,影响微生物利用;④引起有害物质毒性的改变,加重对微生物的损害。

每种微生物都有特定的最低生长pH值、最适生长pH值和最高生长pH值。自然环境的pH值在5~9,最适生长pH值处于这个范围的微生物也最常见。只有少数微生物能够在pH值低于2或高于10的条件下生长。大多数细菌、藻类和原生动物的最适生长pH值为6.5~7.5,生长pH值范围为4~10;放线菌的最适生长pH值为7.5~8;多数真菌(酵母菌和霉菌)的最适生长pH值为5~6,生长pH值范围为1.5~10。

能在低pH值下生长的微生物称为嗜酸微生物(acidophiles),如氧化硫硫杆菌(*Thiobacillus thiooxidans*)。氧化硫硫杆菌的嗜酸性可能与其细胞膜组成有关,当pH值升至中性时,该菌的细胞膜解体,细胞自溶。由此可见,该菌需要高浓度的氢离子来保持细胞膜的稳定。能在高pH值下生长的微生物称为嗜碱微生物(alkaliphiles),如硝化杆菌(*Nitrobacter* spp.)。

值得注意的是,上述的最适生长pH值都是指细胞外的pH值,细胞内的pH值则必须保持在近中性,因为细胞内许多生物大分子对酸或碱敏感。对于极端嗜酸菌或极端嗜碱菌,细胞内pH值可偏离中性1~1.5个pH单位。但对大多数最适生长pH值为6~8的嗜中性微生物(neutrophiles),细胞内的pH值应保持中性或近中性。

四、水的可给性

水是生命活动的基础,离开水生物就不能生存。在自然界,水的可给性(water availability)可对微生物产生重大影响。水的可给性与水含量有关,也与水中的溶质(如盐和糖)含量有关,因为水与溶质结合会丧失可给性。

(一)水活度与渗透

水的可给性通常用水活度表示。水活度(a_w)是指在温度相同的条件下溶液蒸汽压与纯水蒸汽压之比,取值范围0~1。水活度越高,水的可给性越好。

水会从水浓度高(溶质浓度低)的区域向水浓度低(溶质浓度高)的区域扩散,即渗透。如果细胞的溶质浓度高于环境,那么水将渗透进入细胞;反之,水将渗透流出细胞。在水活度低的溶液(如糖溶液或盐溶液)中,微生物会失水而发生质壁分离。在这种情况下,糖溶液或盐溶液产生的效应等同于干燥。

大多数微生物不能在水活度低的环境中生长,若处于这类环境中,则往往休眠或死去。在自然界,海水约含 3%NaCl 和少量其他无机盐,易造成低水活度。但海洋微生物对氯化钠有特殊的需要,被称为嗜盐菌(halophiles)。轻度、中度和极端嗜盐菌所需的氯化钠浓度分别为 1%~6%,6%~15%和 15%~30%。此外,一些微生物能够在含糖量很高的环境中生长,被称为嗜高渗菌(osmophiles);另一些微生物能够在干燥的环境中生长,被称为嗜干菌(xerophiles)。

(二)亲和性溶质

嗜盐菌、嗜高渗菌和嗜干菌是怎么适应低水活度的呢?研究发现,在水活度较低的环境中,微生物会设法提高细胞内的溶质浓度来吸收环境中的水,其主要途径是从环境中泵入无机离子,合成或浓缩有机溶质。用于调节水活度的溶质不会干扰细胞的正常代谢,这样的溶质称为亲和性溶质。

微生物的亲和性溶质种类较多。它们可以是水溶性的糖或糖醇,氨基酸及其衍生物,也可以是钾离子。这些亲和性溶质可以由微生物合成,也可以从环境中吸收。通常,细胞内亲和性溶质的浓度是细胞外溶质浓度的函数。每种微生物所能合成或所能积累的亲和性溶质的最大数量是由自身的遗传特性决定的。从这个意义上说,非嗜盐菌、耐盐菌、嗜盐菌和极端嗜盐菌的差别在于它们合成或积累亲和性溶质的能力不同。

五、氧气

以体积计,氧约占大气的 1/5。对一些微生物来说,氧是不可缺少的生命物质,但对另一些微生物来说,氧却是十分有害的毒性物质。

(一)氧与微生物的关系

根据微生物与氧的关系,可将微生物分为如表 7-2 所列的几种类型。

表 7-2 微生物与氧的关系

微生物类型		与氧的关系	代谢类型	例子
好氧	专性好氧	需氧	呼吸	藤黄微球菌 (<i>Micrococcus lustrus</i>)
	微好氧	需氧,但要求氧分压低于空气	呼吸	迂回螺菌 (<i>Spirillum volutans</i>)
厌氧	耐氧	不需氧,有氧时长得不好	发酵	酿脓链球菌 (<i>Streptococcus pyogenes</i>)
	专性厌氧	有毒杀作用	发酵或厌氧呼吸	甲酸产甲烷杆菌 (<i>Methanobacterium formicicum</i>)
兼性	兼性厌氧	不需氧,但有氧时长得更好	呼吸、无氧呼吸或发酵	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)

1. 好氧菌(aerobes) 具有完整的呼吸链,以氧为最终电子受体,能解除氧毒(见后)。对氧的上限浓度反应不敏感,能够生长在氧分压等于(21%O₂)或大于空气中氧分压的环境中。

微好氧菌(microaerophiles)拥有好氧菌的许多特性,例如,有完整的呼吸链,以氧为最终电子受体。但只能在较低的氧分压(1×10³~3×10³ Pa,正常空气中的氧分压为 2×10⁴ Pa)下

生长,其原因是它们的呼吸能力有限,它们的某些成分(如酶)对氧气敏感。

2. 兼性厌氧菌(facultative aerobes) 在有氧和无氧条件下均能生长,但在有氧时生长更好。有氧时进行呼吸产能,无氧时进行发酵或厌氧呼吸产能。能解除氧毒。

3. 厌氧菌(anaerobes) 没有呼吸链,依靠发酵、厌氧呼吸或光合磷酸化产能。不能解除氧毒,对氧敏感。短时接触空气,生长便受抑制甚至致死。

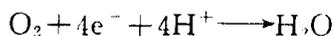
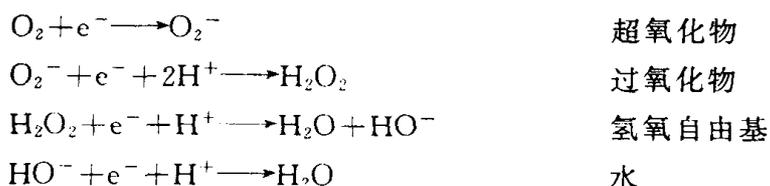
4. 耐氧菌(aerotolerant anaerobes) 没有呼吸链,依靠发酵产能。细胞内存在超氧化物歧化酶和过氧化物酶,但缺乏过氧化氢酶。它们的生长不需要氧,但氧对它们无害。

在微生物世界,好氧菌或兼性厌氧菌占大多数,厌氧菌相对较少。

(二)氧对微生物的影响

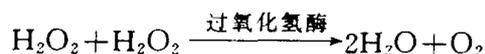
1. 氧的毒害 氧是一种强氧化剂。在正常情况下,它处于能量基态,反应活性不大,称之为三线态氧(triplet oxygen,外层两个不成对电子分处两个轨道平行自旋)。具有毒害作用的氧是单线态氧(singlet oxygen,外层两个不成对电子占据同一轨道或分处两个轨道逆向自旋),处于活化状态,反应极其活泼。在生物体内,单线态氧能自动进行许多不需要的氧化反应。常遇单线态氧的微生物(如空气微生物和光能营养型微生物)含有类胡萝卜素,能够把有毒的单线态氧转化为非毒性形态。

氧的其他毒性形态是超氧化物、过氧化物和氢氧自由基。在呼吸过程中,氧气被用作电子受体而还原成水,即

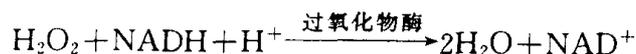


超氧化物、过氧化物和氢氧自由基都是呼吸过程的副产物。超氧化物反应活泼,能氧化细胞内的任何有机成分。过氧化物(如过氧化氢)也能损坏细胞成分,但其破坏作用通常不如超氧化物和氢氧自由基。在所有氧的形态中,氢氧自由基的反应活性最高,能迅速氧化细胞内的各种有机物质,因此它的破坏作用也最大。不过,氢氧自由基的寿命极短。

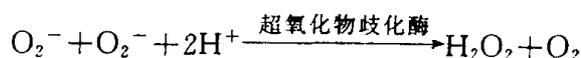
2. 氧毒的解除 针对毒性态氧,微生物可产生许多解除氧毒的酶,例如过氧化氢酶(catalase)、过氧化物酶(oxidase)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase)。过氧化氢酶催化分解过氧化氢:



过氧化物酶也能催化分解过氧化氢,它与过氧化氢酶的差别在于需要还原剂(NADH₂):



超氧化物歧化酶催化分解超氧化物:



经过超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的联合作用,超氧化物重新转化成氧气。

好氧和兼性厌氧微生物同时含有超氧化物歧化酶和过氧化氢酶。耐氧性厌氧微生物含有数量较少的超氧化物歧化酶,但不含过氧化氢酶。厌氧微生物则既不含超氧化物歧化酶,也不

含过氧化氢酶。缺少这两种酶是厌氧菌对氧毒敏感的主要原因。

第二节 种群内微生物的相互作用

一、阿利规律

由于种群是特定空间内同种微生物的多个个体的集合,因此具有一定的密度。种群密度是指在单位体积(或面积)中的生物个体的数量或生物总体的重量(即生物量)。种群生长与其密度有关。根据对动植物的观察,阿利认为种群密度适度时,种群生长最快,密度太低或太高都会限制种群生长。这个规律称为阿利规律(Allee's principle)。

实验证明,阿利规律同样适用于微生物种群(图 7-2)。种群密度较低时,微生物相互协作,共同促进种群的生长,这种作用称为正相互作用。相反,种群密度较高时,微生物相互竞争,限制种群生长,这种作用称为负相互作用。随着种群密度的增大,正相互作用减弱,负相互作用加强。与最大生长速率相对应的种群密度称为最佳密度。

二、正相互作用

种群内微生物正相互作用的方式较多,常见的有如下几种:

(一)联合阻止细胞物质外泄

在实验室的转接培养中,接种量过少会导致微生物滞留适应期延长,甚至不生长。对于生长要求苛刻的微生物,这种效应更为明显。发生这种情况的原因是细胞物质外泄。微生物细胞膜不尽完善,总会将一些生长必需的小分子物质(如代谢中间产物)泄漏到细胞外面。在接种量不大(种群密度低)的情况下,泄漏物常因扩散而消失于培养基中,很难重新返回细胞内。接种量加大(种群密度高)后,泄漏物扩散受阻而积累于细胞表面,既阻止了细胞物质的继续泄漏,也增大了泄漏物重返胞内的机会。

(二)共同利用不溶性基质

在种群利用木质素或纤维素之类不溶性基质时,个别成员产生胞外酶,将原先不能利用的基质转化为可利用的基质,供各成员分享;但如果没有大家的协作,产生的胞外酶及其水解产物会扩散于周围环境中,难以发挥效益。例如,黄色粘球菌(*Myxococcus xanthus*)能分泌胞外酪蛋白酶,以不溶的酪蛋白为食,但把该菌培养在不溶的酪蛋白上时,其生长却取决于种群密度。菌数少于 10^3 个/mL 时,不能生长;只有达到 10^3 个/mL 以后,才开始生长。

(三)共同抵御非生物因素的影响

观察发现,一种相同浓度的抑制剂对不同密度的微生物种群具有明显不同的效应。它对低密度悬浮种群的抑制远远大于高密度悬浮种群。紫外线对微生物具有很强的杀伤力,高密度种群能屏蔽或削弱紫外线,从而缓解它对整个种群的损害。高密度种群还能有效地降低水的冰点,使种群在更低的温度下生长。

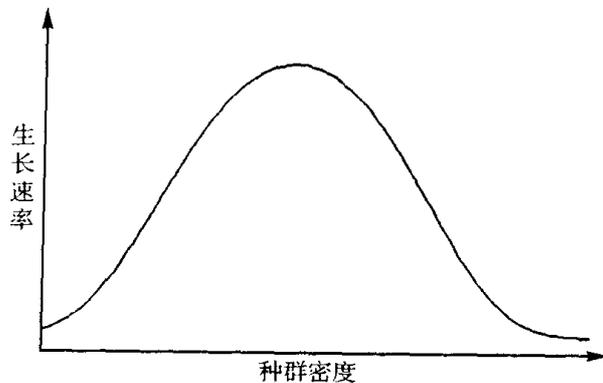


图 7-2 种群密度对种群生长速率的影响

(四)促进基因交换

微生物对抗生素和重金属的抗性基因以及对一些特殊有机物的降解基因,通常分布在质粒上。这些基因可通过转化、转导和接合等途径在个体间转移。保持较高的种群密度可促进个体间的基因交换。例如,一些细菌可通过接合进行基因交换,但只有当菌数大于 10^5 个/mL时,接合才能有效进行;种群密度低时,接合频率很低。

三、负相互作用

种群内微生物的负相互作用也有多种方式,常见的有如下几种:

(一)种群内竞争

由于种群由众多个体组成,且每个微生物个体所利用的资源相同,如果一个成员利用某个分子,其他成员就不能利用。为了获取有限的共同资源,种群内的微生物会发生竞争(见本章第三节)。资源越稀少,种群密度越高,竞争也越激烈。

(二)产物抑制

在高密度种群中,细胞“泄漏”的中间产物和排出的最终产物可积累于周围环境中,抑制种群生长。例如,在发酵中,乳酸细菌可将葡萄糖转化为乳酸,当乳酸积累至一定浓度时就会抑制整个种群的生长。同理,硫化氢能抑制硫酸盐还原菌;酒精能抑制酵母菌的生长。

(三)菌体自毁

某些微生物含有自杀基因,一旦表达,所合成的多肽或蛋白具有致死作用。例如大肠杆菌有一个 *hok* (host-killing) 基因,编码 Hok 多肽,后者可瓦解细胞膜电位并杀死细胞;该菌也有一个 *sok* (suppression of killing) 基因,编码反义 mRNA,能阻止 *hok* 基因的表达,使细胞存活。只要持留 *sok* 基因,大肠杆菌就能存活,反之则毁灭。菌体自毁可限制种群密度。

第三节 种群间微生物的相互作用

在自然界,不仅存在种群内的微生物相互作用,也存在种群间的微生物相互作用。种群间的微生物相互关系见表 7-3。

表 7-3 两个微生物种群之间的相互关系

种群间关系类型	相互作用的影响*		主要特征
	种群 A	种群 B	
中立	0	0	彼此互不影响
栖生	0	+	对种群 A 无影响,对种群 B 有利
互生	+	+	彼此有利
共生	+	+	彼此有利
竞争	-	-	彼此相互有害
偏生	0/+	-	对种群 A 无影响或有利,对种群 B 有害
捕食	+	-	对种群 A 有利,对种群 B 有害
寄生	+	-	对种群 A 有利,对种群 B 有害

*0 表示无影响;+表示有利;-表示有害。

一、中立

中立(neutralism)是指两个或两个以上的微生物种群同处某一生境时不发生相互影响的

现象。空间上的分离(低种群密度)或时间上的间隔(不同时进行代谢活动)都能促进或保持两个种群的中立。例如,在海洋中,微生物的种群密度很低,一个种群根本“觉察”不到另一个种群的存在,彼此“井水不犯河水”。又如,在不利的生境中,两个芽孢细菌种群均形成芽孢而处于休眠状态,双方也不会相互影响。

二、栖生

栖生(commensalism)也称单利共生,是指两个微生物种群共同生长时,一方受益,另一方不受影响的现象。“commensalisms”一词来源于拉丁词“mensa”(餐桌),原始含意是指一种微生物以另一种微生物的“残羹剩饭”为食。

微生物种群之间发生栖生关系的纽带之一是甲方为乙方创造适宜的生境。例如,在许多生境中,兼性厌氧菌的生长和代谢,可消耗氧气使之适合于专性厌氧菌的生长。专性厌氧菌从兼性厌氧菌的代谢活动中获益,兼性厌氧菌不受影响。

微生物种群之间发生栖生关系的纽带之二是甲方为乙方提供生长因子。例如,短黄杆菌(*Flavobacter brevis*)可产生并分泌半胱氨酸,嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)将其用于生长。

微生物种群之间发生栖生关系的纽带之三是甲方为乙方提供营养物质。例如,一些真菌种群可产生并分泌胞外酶,将复杂的多聚物(如纤维素)转化成简单的单体(如葡萄糖),供原来不能利用该多聚物的其他种群利用。

微生物种群之间发生栖生关系的纽带之四是共代谢。在共代谢中,一个种群以某种特定的基质生长,却可同时氧化另一种不能用作能源和养料的基质。虽然这个种群不能利用自身的氧化产物,但可供其他种群利用。例如,当母牛分枝杆菌(*Mycobacterium vaccae*)以丙烷为基质生长时,可同时将环己烷氧化成环己醇,后者可被其他种群利用(图 7-3)。

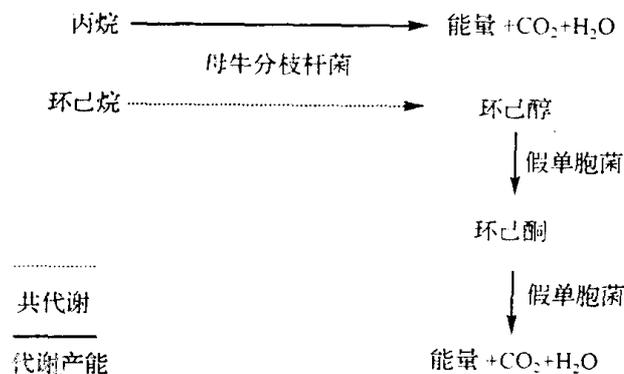


图 7-3 母牛分枝杆菌与假单胞菌之间的栖生关系

微生物种群之间发生栖生关系的另一个纽带是甲方为乙方解除毒物的损害。例如,贝氏硫菌属(*Beggiatoa*)能氧化硫化氢,从而消除其毒害作用,使对硫化氢敏感的好氧微生物种群得以生长。

三、互生

互生(synergism)是指两个微生物种群共同生活时双方受益的现象。具有互生关系的两个种群可以独立生活,但共同生活时生长得更好。有时难以确定是否双方都从互生中获益,因而

很难判断它们是互生还是栖生关系。相反,有时难以确定双方的关系是否专一,也很难判断它们是互生还是共生关系(见本节相关内容)。

两个种群互生可使其完成独自不能完成的代谢。其经典例子是粪链球菌(*Streptococcus faecalis*)与大肠杆菌之间的互养(syntrophism,即两个或两个以上种群协同代谢并相互满足营养需要)(图 7-4)。虽然粪链球菌可把精氨酸转化成鸟氨酸,大肠杆菌可把鸟氨酸转化成腐胺,但两个种群都不能独自把精氨酸转化成腐胺。通过双方协同代谢,精氨酸转化成腐胺,后者可被两个种群共享。

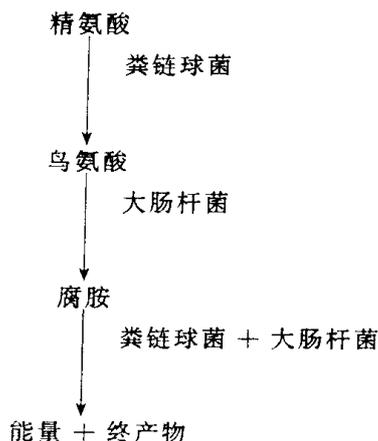


图 7-4 粪链球菌与大肠杆菌之间的互生关系

两个种群互生也可使其获得独自难以获得的生长因子。例如,在基本培养基上,阿拉伯糖乳酸杆菌(*Lactobacillus arabinosus*)与粪链球菌只能共同生长,但不能独自生长。究其原因,粪链球菌需要叶酸,需由阿拉伯糖乳酸杆菌提供;相反,阿拉伯糖乳酸杆菌需要苯丙氨酸,需由粪链球菌提供。只有双方共同生活,才能各得其所。

四、共生

共生(symbiosis/ mutualism)是互生的发展。它是指两个种群专一地共同生活,相互依赖,彼此获益的现象。某些蓝细菌或藻类与真菌共生而形成地衣(lichens)是微生物种群之间共生关系的典范。地衣由共生藻和共生菌构成。共生菌为共生藻提供水分和无机盐,有时也提供生长因子。共生藻则为共生菌提供氮素和有机物。蓝细菌或藻类与真菌之间存在一定的专一性,但这种专一性也并非绝对的。一种藻可分别与多种真菌共生而形成地衣(一藻一菌),反之亦然。在某些地衣中,则同时出现多种藻类或多种真菌(一藻多菌;一菌多藻;多藻多菌)。

五、竞争

竞争(competition)是指两个或两个以上微生物个体(同种或异种)利用同一种有限资源而产生的相互抑制作用。种群内竞争属于“分摊性”竞争,由于竞争者的能力相同,每个个体获得的资源均等。当摊得的资源不足以维持生存时,种群的死亡率急剧从 0 上升至 100%(有福共享,有难同担)。种群间竞争比较复杂,既可因共同资源短缺而直接争夺资源(即资源竞争),也可争夺资源(资源不一定短缺)而在获取资源的过程中损害对方(即干扰竞争)。

从生态学理论上讲,竞争都是针对生态位的,服从竞争排斥原理。生态位(niche)是用来描述物种的资源空间特征的一个概念,以表明该物种在生物群落中的位置和作用。生态位不仅包括生物占有的物理空间,还包括它在生物群落中的功能地位以及它在温度、pH 以及其他生存条件的环境梯度中的位置。打个不很恰当的比方,生态位就相当于在现实社会生活中,你住在哪里?担什么职务?享受何种待遇?

当两个种群被迫竞争某种共同且有限的资源时,总有一个种群被排挤出局(优胜劣汰);除非双方的生态位明显有别,这就是竞争排斥原理(competition exclusion principle)。种群间的生态位越近,彼此的竞争越激烈。1934 年,高斯以两种亲缘关系很近的原生动物大草履虫(*Paramecium caudatum*)和双小核草履虫(*Paramecium aurelia*)为材料,做了竞争试验。结果

表明,在两个种群单独培养的过程中,只要细菌(猎物)供给充足,每种草履虫都能生长并维持在一定水平。但将两个种群共同培养后,经过16天的竞争,只有双小核草履虫幸存,而大草履虫被淘汰。相反,将大草履虫和囊状草履虫(*Paramecium bursaria*)放在一起培养时,双方可以共同生长并达成平衡。尽管两者竞争同一食物,但它们分布在培养瓶的不同部位。生态位的分离保证了双方的长期共存。

六、偏生

偏生(amensalism/antagonism)是指两个微生物种群共同生活时,甲方产生抑制条件(如产生抑制物质或改变生存环境)限制乙方生长的现象。由于抑制条件对甲方自身没有影响或影响较小,在双方的竞争中,甲方可获得对生境的优先占领权。不仅如此,甲种群占据特定生境后,还能有效地排除异己。

在制作酸菜和泡菜的过程中,乳酸细菌能旺盛生长,产生大量乳酸而酸化环境,无选择地阻碍其他种群的生长,这种作用称为非特异性拮抗。有的微生物能产生抗生素,在很低的浓度下有选择地抑制或杀死其他种群,这种作用称为特异性拮抗。非特异性拮抗与特异性拮抗均有助于特定种群取得竞争优势。

七、捕食

捕食(predation)是指一种较大的微生物直接捕捉、吞食另一种较小的微生物的现象。前者称为猎食者(predator),后者称为猎物(pre)。例如,原生动物能吞食细菌和藻类。捕食关系在污水净化中具有重要意义。

在微生物学中,捕食与寄生的区别并不严格,常将真菌捕捉线虫归入捕食关系。捕食性真菌捕捉线虫的方法有外粘捕和套捕两种。粘捕法是以菌网、菌枝、菌环等菌丝变态结构表面的粘性物质来粘住猎物。例如,少孢节丛孢菌(*Arthrotrrys obligospora*)以菌网捕捉线虫。一旦线虫与该菌菌网接触,便被牢牢粘住。在粘住线虫的部位长一根细小的穿透枝,穿过线虫角质侵入其体内,在体内长出充满线虫体腔的营养菌丝,吸尽线虫体内的营养物,使线虫只留躯壳。套捕法是由菌丝形成一个环状菌套来捕捉线虫。当菌套套住线虫后,菌套上长出菌丝穿进线虫体腔并把线虫体内“吃空”而致死。

八、寄生

寄生(parasitism)是指一种较小的微生物(寄生物,parasite)生活于另一种较大的微生物(宿主,host)体内或表面,从中取得营养物质进行生长,同时使后者蒙受损害甚至死亡的现象。若寄生物进入宿主体内,称为内寄生(endoparasite);若寄生物不进入宿主体内,称为外寄生(ectoparasite)。寄生关系有多种类型,如噬菌体寄生于细菌,真菌寄生于真菌,细菌或真菌寄生于原生动物。细菌寄生于细菌体内的情况很少发生,其特例是食菌蛭弧菌(*Bdellovibrio bacteriovorus*)寄生于大肠杆菌体内。

第四节 微生物群落的形成与发展

一、r 对策和 K 对策

群落由种群组合而成,每个种群都力图使自己保持生存并得到发展。根据它们对环境因素的响应,微生物可区分为 r 对策者和 K 对策者。r 对策者借助高增殖速率,以量取胜;K 对策者则通过对资源的有效利用,以质取胜。

r 对策者的典型特征是大起大落。资源充裕时,r 对策者将获得的大部分资源用于增殖,种群发展很快,极易在密度较低的群落中异军突起。但是,除了高增殖速率以外,r 对策者几乎没有其他竞争手段。因此,这种优势也只有在资源不受限制的场合才能保持。一旦资源稀少或条件不利,整个种群迅速崩溃。大量形成抗逆性孢子并通过各种媒介传播,是 r 对策者继续生存的重要手段。

与高等生物相比,微生物都是 r 对策者。但是,若相互比较,仍有一些种群可归入 K 对策者。例如,土壤微生物中的发酵性菌群(zymogenous population)接近 r 对策者,而土著性菌群(autochthonous population)则很接近 K 对策者。K 对策者的典型特征是种群稳定。它们的增殖速率明显低于 r 对策者。在资源受到限制的场合,K 对策者将大部分获得的资源用于存活,能够在密度较高的群落中深深扎根。

二、群落的形成与演替

在没有生物定居史的生境中,先锋种群的侵入可建立初级群落。例如,新生儿降生时,肠道内是无菌的,出生 1~2 h 后便有微生物侵入,开始数量很少,以后逐渐增多,并达到第一次高峰。当环境发生灾变(例如,给新生儿喂抗生素)时,初级群落会惨遭毁灭。但在此生境中,微生物会重新定居,再次建立群落。

群落是一个动态系统,群落中的一些种群会被另一些更合适的种群替代。在初级群落的形成中,先锋种群可以改变生境条件,使之有利于自身的发展,逐渐扩大自身的优势;但随着时间的推移,生境条件发生变化,当有更合适的种群侵入时,一些先锋种群逐渐淘汰。这种发生于特定生境中的一种类型的微生物群落取代另一种类型的微生物群落的过程,称为演替(succession)。若这个过程发生在没有生物定居史的生境中,就称为初级演替。若这个过程发生于有生物定居史或有生物群落的生境中,就称为次级演替。经典生态学认为,群落演替中会出现顶极群落,它代表群落内部各种群之间以及群落与环境之间的动态平衡。现代生态学则认为,顶极群落极少出现,外来干扰可随时打破演替平衡。但不可否认,在许多场合确实产生了相对稳定的群落。

当受到外来因素的干扰时,群落能通过自我调节恢复原初的状态,即群落具有一定的稳定性。例如,洗手可破坏手上的微生物群落,但不久便可恢复。又如,生境中积累硫化氢,可抑制硫化氢产生菌的代谢,促进硫化氢利用菌的生长;硫化氢利用菌增加后,可有效地降低硫化氢浓度,促进硫化氢产生菌的代谢,反过来限制自身的生长,最终恢复原初的状态。当然,群落的稳定是有条件的。当外来干扰超过一定强度时,群落会丧失自我调节能力,遭受损害甚至瓦解。例如,有毒污染物大量进入水体,可彻底摧毁水体中现存的生物群落。

三、群落结构

生物群落有两种典型的结构：一种是种类较少，个体较多；另一种是种类较多，个体较少。成熟群落的结构属于后一类型，种群丰富而且稳定，维持能耗少，生产力低。一旦环境有利于生长，少数种群便高速增殖而居支配地位，使生产力提高，种群数减少。在生物群落中，优势种群主导能量消耗，非优势种群则决定种群多样性。

在理化因素居支配地位的生境中，种群多样性通常较少。其中的微生物必须首先各自适应理化因素，没有机会进行种群间的营养协作与成境协作。营养协作是指一个种群改善另一个种群的营养条件的现象。成境协作则是指一个种群的生命活动改善另一个种群的生境条件的现象。热泉和酸性沼泽是典型的受理化因素控制的生境，生物种群十分稀少。

相反，在生物因素居支配地位的生境中，种群多样性通常较高。其中的理化因素不成为抑制微生物生长的主要矛盾，允许微生物进行种群间的相互适应和相互协作。土壤是典型的受生物因子控制的生境，生物种群非常丰富。

群落的组成和结构越复杂，它的稳定性也就越高，这一规律叫做“多样性导致稳定性原则”。群落越成熟，内部的种群越丰富，食物网（见本章第五节）也越复杂。能量和物质可通过多条渠道流通。一条渠道出问题，可以由其他渠道替代。这就是生物群落稳定性好，抵抗外界压力和冲击力强的原因。微生物群落的稳定性也与种群多样性有关，但彼此间没有明确的因果关系。在种群丰富的群落中，并非每个成员都必不可少，淘汰几个也无碍大局。目前，还不清楚维持群落稳定所需的最少种群数目。

固然种群丰富的群落能够适应较大的环境波动，但这并不意味着它能适应严重或持久的外来干扰。例如，种群丰富而且稳定的活性污泥群落，能够降解许多低浓度的有机毒物；但以高浓度输入时，这些毒物会使群落瓦解。在美国路易维尔市污水处理厂，六氯戊二烯和八氯戊烯进入处理系统，摧毁了其中的微生物群落，导致停产达数月之久。

第五节 微生物的生态系统

一、生态系统的组成

生态系统是生态学中的重要概念，也是自然界的重要功能单位。通俗地说，“生态系统 = 生物群落 + 环境”。若暂不考虑环境，根据功能，可将生物群落中的种群区分为生产者、消费者和分解者。

生产者(producer)也叫初级生产者，包括所有的绿色植物、光能营养型微生物和化能无机营养型微生物等。绿色植物(包括一些光合营养型微生物)利用光能将二氧化碳和水转变成碳水化合物(即通过光合作用把一些能量以化学键的形式储存起来)。无机营养型微生物则利用化学能将二氧化碳和水转变成碳水化合物。生产者(主要是植物)的合成产物是消费者与分解者的惟一能源。

消费者(consumer)由动物组成。动物自身不能生产食物，只能以其他生物为食，直接或间接地从生产者获取能量。

分解者(decomposer)是分解已经死亡的动植物残体的异养生物，主要是微生物。分解者将有机物质转化为无机物质，再供生产者利用。大约 90% 的初级生产量是经分解者的作用归还

环境的。从物质循环的角度看,分解者对生态系统的贡献极其巨大。

二、食物链与营养级

生产者(主要是植物)所固定的能量(主要是太阳能)通过一系列的取食和被取食的关系在生态系统中传递,这种生物之间的传递关系称为食物链(food chains)。古语“螳螂捕蝉,黄雀在后”是食物链的生动写照。许多食物链并不孤立存在,它们纵横交织,紧密地结合在一起,形成复杂的多方向的食物网。

在食物链和食物网中,物种间的营养关系错综复杂。为了简化这种营养关系,便于进行能流和物流(物质循环)研究,生态学家导入了营养级的概念(trophic level)。一个营养级是指处于食物链某一环节上的所有生物的总和。营养级之间的关系已不是一种生物与另一种生物的关系,而是某一层面上的生物与另一层面上的生物的关系。

三、生态系统的能流与物流

维持生命需要能量和营养物质,两者缺一不可。在生态系统中,能量与营养物质的供应都是通过食物链输送的,食物链是能流与物流的大动脉。

当能量沿食物链从上一个营养级流动到下一个营养级时,热量不断释放,能量不断减少。按林德曼的“十分之一定律”,从一个营养级到下一个营养级的能量转化率为10%,也即有90%能量被损耗。

环境中的营养物质,经生产者进入食物链,尔后经消费者与分解者的作用,返回环境。这些被释放的营养物质,又可再一次被生产者带入食物链而循环利用(详见第八章)。

复习思考题

1. 何谓种群? 何谓群落? 何谓生态系统?
2. 简述最小因子定律和耐受性定律。
3. 微生物有哪些温度类型? 各有何特点?
4. 为什么每种微生物都有一定的生长温度范围?
5. 为什么高温微生物耐高温?
6. 简述高温消毒或灭菌的方法。
7. 何谓嗜酸微生物和嗜碱微生物?
8. 何谓嗜盐微生物? 为什么它们耐盐?
9. 根据微生物与氧气的关系,可将微生物分为几种类型?
10. 为什么厌氧菌对氧气敏感?
11. 简述种群内微生物的正相互作用和负相互作用。
12. 简述种群间微生物的相互作用。
13. 何谓 r 对策者和 K 对策者? 各有什么特点?
14. 何谓初级演替和次级演替?
15. 成熟群落典型的结构特征是什么?
16. 何谓生产者、消费者和分解者?
17. 何谓食物链和食物网?

第八章 微生物与生物地球化学循环

在地球上,生产者(以植物为主体)通过光合作用产生了种类繁多、数量巨大的有机物质。这些有机物质的命运如何呢?它们没有在地球上积累,而是经过消费者(以动物为主体)和分解者(以微生物为主体)的作用,又重新从地球上消失了。光合作用从大气中取走二氧化碳,呼吸作用又将二氧化碳归还大气,地球以这种方式维持着脆弱的碳素平衡。除碳以外,其他营养元素也进行着同样的转化。各种营养元素在有机形态与无机形态之间循环转化的集合,称为生物地球化学循环(biogeochemical cycles)。

微生物是生物地球化学循环的主要推动者。如果没有微生物的参与,生物地球化学循环就不能持续,地球上贮量有限的营养元素就会耗竭,生命也不可能延续和发展。

第一节 碳素循环

一、概述

(一) 碳素循环的基本过程

自然界碳素循环的基本过程为(有机碳 \rightleftharpoons 二氧化碳):大气中的二氧化碳被陆地和海洋中的植物吸收,然后通过生物或地质过程以及人类活动,又以二氧化碳的形式返回大气。

生物与大气之间进行着活跃的碳素交流(二氧化碳 \rightleftharpoons 生物有机碳 \rightleftharpoons 二氧化碳)。绿色植物从大气中获得二氧化碳,经过光合作用转化为葡萄糖,再综合成为植物体的碳化物,经过食物链的传递,成为动物体的碳化物。植物和动物的呼吸作用把摄入体内的一部分碳转化为二氧化碳,另一部分则构成生物机体或在机体内贮存。动、植物死后,残体中的碳化物通过微生物的分解作用也最终转化成二氧化碳。

在被分解之前,一部分(约千分之一)动植物残体被沉积物掩埋而成为有机沉积物。这些沉积物经过漫长的年代,在热能和压力作用下转变成矿物燃料(煤、石油和天然气等)。

在风化或燃烧过程中,这些碳被氧化成二氧化碳(二氧化碳 \rightleftharpoons 生物有机碳 \rightleftharpoons 矿物有机碳 \rightleftharpoons 二氧化碳)。人类大量消耗矿物燃料对自然界的碳素循环产生巨大干扰。从1949年到1969年,由于燃烧矿物燃料以及其他工业活动,二氧化碳的排放量年均递增4.8%。二氧化碳的人为排放破坏了自然界的碳素平衡,致使大气中二氧化碳浓度升高。后者与其他成分一起诱发“温室效应”,造成气候异常。

除上所述,大气和海洋之间也进行着二氧化碳交换(大气二氧化碳 \rightleftharpoons 海洋二氧化碳)。二氧化碳可从大气溶入海水,也可从海水逸入大气。大气二氧化碳数量增加或减少,往往伴随着海洋吸纳二氧化碳数量的增加或减少。海水溶解二氧化碳数量的增加,还会引起海水酸碱平衡和碳酸盐溶解平衡($\text{CO}_2 \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{HCO}_3^-$)的变化。

(二) 微生物在碳素循环中的作用

光合作用是生态系统能量与有机物的重要来源。生产者通过光合作用捕获太阳能,并将二氧化碳固定在有机物质中。尽管它的光能利用率不高(图 8-1),但满足了地球上生命活动的能量之需。就总体而言,陆地生态系统与水体生态系统的光合产物数量(初级生产量)基本持平。其中,陆地上以植物为主,水体(近海例外)中以微生物占优。由于海洋覆盖了地球的大部分表面,微生物贡献着近一半的全球初级生产量。

光合产物沿食物链传递,每经过一个营养级,能量损耗(转化成热能而散失)90%。从生产者(假设为 100%)传递给食草动物,再经两级食肉动物的利用,剩下的能量只有 0.3%。若直接传递给分解者(微生物),一次利用即可消耗全部能量。与此同时,有机碳被转化为二氧化碳。一个发人深思的问题是:如果分解作用停止,光合作用能持续多久?据估计,大约只能维持 20 年;届时大气二氧化碳将被耗尽。在全球有机碳分解中,微生物承担着 90% 的任务。

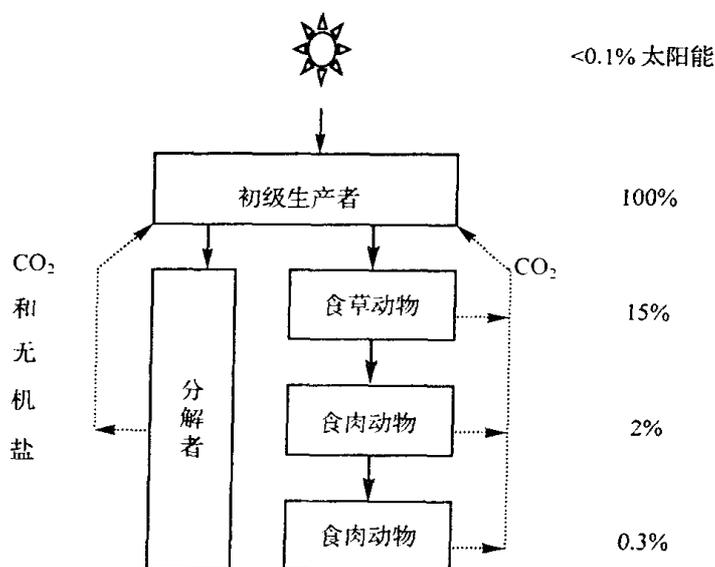


图 8-1 从生产者到消费者的光能转化情况

二、有机物质分解的一般途径

(一) 有机物质的好氧分解

如前所述,植物是陆地上有机物质的主要来源。植物中最常见的成分是纤维素、半纤维素、木质素、脂肪、蛋白质和核酸(表8-1)。在有氧环境中,微生物利用氧作为有机物质分解的最终

表 8-1 植物的主要有机成分

植物成分	占植物干重(%)
纤维素	15~60
半纤维素	10~30
木质素	5~30
蛋白质和核酸	2~5
脂肪	0.5~2

电子受体,通过呼吸作用,形成最高氧化状态的产物(二氧化碳)。有机物质(含氮、硫和磷的有机物质另外介绍)好氧分解的一般途径如图 8-2 所示。

自然界的许多有机物质以多聚体的形态存在。在微生物的作用下,这些有机多聚体被水解为单体。例如,多糖类水解为单糖,脂肪水解为甘油和脂肪酸,蛋白质水解为氨基酸等等。各种单体再被微生物摄入体内继续降解。通过三羧酸循环,最终被彻底分解成二氧化碳和水。

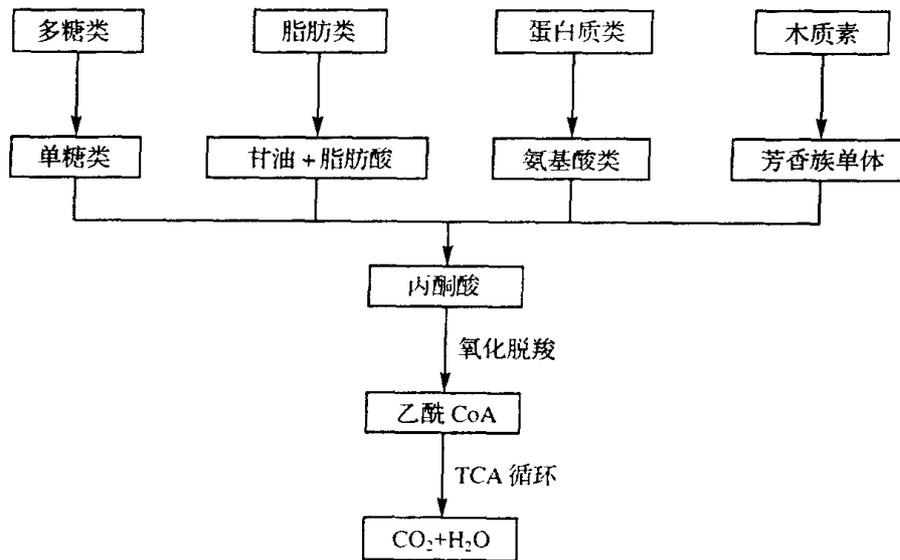


图 8-2 有机物质好氧分解的一般途径

(二) 有机物质的厌氧分解

在无氧环境中,微生物可把氧化物(如硝酸盐和硫酸盐)用作有机物质分解的最终电子受体(后面专门介绍),通过厌氧呼吸,形成最高氧化状态的产物(二氧化碳);也可把代谢中间产物(如丙酮酸)用作有机物质分解的最终电子受体,通过发酵,形成最高氧化状态的产物(二氧化碳)和各种还原产物。发酵过程实际上是有机物质内部的氧化与还原过程,一部分有机物质被氧化成二氧化碳(氧化状态高于基质),另一部分则因充当电子受体而被还原(氧化状态低于基质)。换言之,在发酵中,基质必须有进一步被还原的潜力,不能处于最低氧化状态(或最高还原状态)。由于石油中的碳高度还原,因此很难厌氧降解。

在厌氧环境中,通过多种微生物的协同代谢,可把发酵基质转化成最高氧化状态的产物(二氧化碳)和最低氧化状态的产物(甲烷)。有机物质厌氧分解产生甲烷的过程见图 8-3。

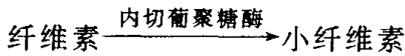
三、纤维素的分解

(一) 纤维素及其分解方式

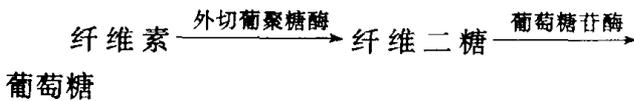
纤维素不但是植物最丰富的有机成分,而且是地球上数量最大的有机物质。它由葡萄糖通过 β -1,4 糖苷键连结而成,每个分子含有 $10^3 \sim 10^4$ 个葡萄糖单体,相对分子质量高达 1.8×10^6 ,不溶于水。

微生物是怎么将这种相对分子质量大又不溶于水的有机物质摄入细胞(透过细胞壁和细胞膜)的呢?答案是针对这类基质微生物调整了它们的利用模式。对于小分子基质,微生物通常先把它们摄入体内,再进行代谢。也就是说,代谢所需的酶是在细胞内合成并在细胞内起作用的(这类酶称为胞内酶)。对于纤维素,这种基质利用模式显然不能奏效,因为纤维素不能直接透过细胞壁和细胞膜。但是,纤维素降解菌能在细胞内合成相关的酶,并把它们分泌到细胞外(这类酶称为胞外酶),在环境中把纤维素水解成单体。

胞外纤维素酶有两种,即 β -1,4-内切葡聚糖酶和 β -1,4-外切葡聚糖酶。内切葡聚糖酶在纤维素分子内随机切割,产生越来越小的纤维素分子。



外切葡聚糖酶从纤维素分子的还原端开始,每次水解两个单体,产生纤维二糖。后者在第三种酶(β -葡萄糖苷酶,胞外酶或胞内酶)的作用下转化成葡萄糖。



纤维素被水解成纤维二糖和葡萄糖后,许多微生物能把这些水解产物摄入体内,进行代谢作用。在有氧环境中,通过糖酵解和三羧酸循环,彻底分解成二氧化碳和水。在厌氧环境中,则通过发酵,最后转化成二氧化碳和甲烷。

(二) 分解纤维素的微生物

分解纤维素的微生物种类较多,包括细菌、放线菌、真菌等。其中,对细菌的研究较为深入。

1. 好氧纤维素分解细菌 据报道,好氧纤维素分解细菌共有 11 属 34 种。食纤维菌(*Cytophata*)和生孢食纤维菌(*Sporocytophata*)是耕地土壤中经常检出的好氧纤维素分解细菌。将菜园土颗粒放在以滤纸为碳源的无机盐琼脂平板培养基上,置 28℃ 左右培养 2~3 周,可发现滤纸上有淡黄色或其他颜色的菌落形成,并伴有粘液出现。若仔细察看,在长有菌落的地方,滤纸已溶解变薄。如果以纤维素分解细菌的培养物取代菜园土颗粒,滤纸的溶解现象更加明显。从滤纸菌落中取样镜检可以发现,这些细菌在发育的不同阶段呈现不同的形态。幼龄时,细胞弯曲,两头尖锐;以后逐渐缩短变粗,细胞弯曲成弧形。生孢食纤维菌形成小孢囊,并产生不耐热的孢子。

2. 厌氧纤维素分解细菌

厌氧纤维素分解细菌共有 7 属 12 种。裂解纤维乙酸弧菌(*Aetovibrio cellulolyticus*)分离自污水污泥中,专性厌氧,生长 pH 6.5~7.7,生长温度 20~40℃。能发酵纤维素、纤维二糖等,产物为氢气、二氧化碳、乙酸以及少量乙醇、丙醇和丁醇。生长于纤维素上时,这种细菌可产生黄色色素而使纤维颗粒染上颜色。

四、半纤维素和其他糖类化合物的分解

半纤维素是仅次于纤维素的植物成分。半纤维素可区分为二类:① 同聚糖,仅由一种单糖组成(如木聚糖和半乳聚糖);② 异聚糖,由两种以上单体构成,如戊糖(木糖和阿拉伯糖)、己糖(半乳糖和甘露糖)和糖醛酸(葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸)。每个分子含有 20~200 个单体。至今还有很多半纤维素的结构尚未搞清。半纤维素的降解方式基本上与纤维素相同,由于大部分是异聚糖,所需的胞外酶种类较多。细菌、放线菌、真菌等均能分解半纤维素,且分解速度快于

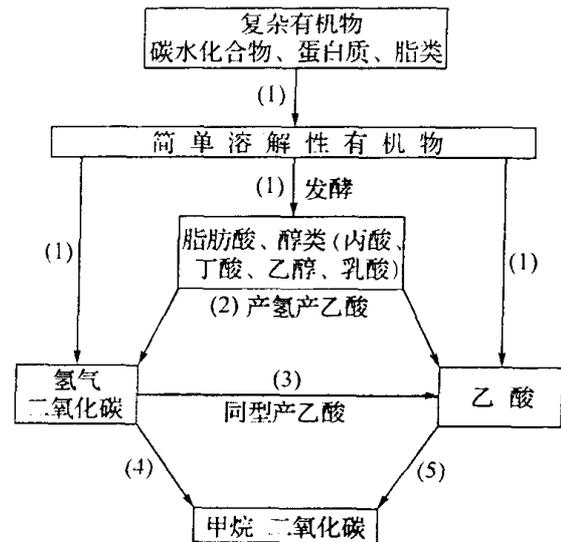


图 8-3 有机物厌氧分解生成甲烷的过程

- (1) 发酵性细菌;
- (2) 产氢产乙酸细菌;
- (3) 同型产乙酸细菌;
- (4) 利用 H₂ 和 CO₂ 的产甲烷细菌;
- (5) 分解乙酸的产甲烷细菌

纤维素。

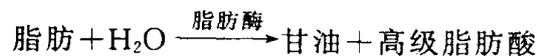
淀粉是植物的重要贮藏物质。它由葡萄糖通过 α -1,4-糖苷键连结而成,排成长链。可细分为直链淀粉和支链淀粉。支链淀粉带有分支,在直链与支链连结处以 α -1,6-糖苷键连结。淀粉通过胞外淀粉酶水解。常见的淀粉酶有:① α -淀粉酶,为内切酶,不能水解 α -1,6-糖苷键,产物为麦芽糖和寡聚糖。② β -淀粉酶,为外切酶,不能水解 α -1,6-糖苷键,产物为麦芽糖和极限糊精。③糖化淀粉酶,为外切酶,不能水解 α -1,6-糖苷键,产物为葡萄糖和寡聚糖。④异淀粉酶,能水解 α -1,6-糖苷键,产物为糊精。绝大多数微生物能够利用淀粉。

几丁质由N-乙酰葡萄糖胺通过 β -1,4-糖苷键连结而成,是真菌细胞壁和节肢动物外骨骼的重要成分。肽聚糖由N-乙酰葡萄糖胺和N-乙酰胞壁酸组成,是细菌细胞壁的重要成分。真菌和细菌死亡后,这些成分可被环境中的其他微生物分解。

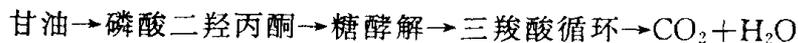
五、脂肪的分解

脂肪不溶于水,但溶于有机溶剂。由甘油与饱和脂肪酸构成,常温下呈固态的称为脂;由甘油与不饱和脂肪酸构成,常温下呈液态的称为油。在动植物体中,脂肪占有一定的比例。在某些脂肪含量特别丰富的果实和种子中,脂肪可超过50%。环境中的脂肪主要来自植物,也有一小部分来自动物和微生物。某些工业废物含有大量油脂,如油脂废水和制革废水。

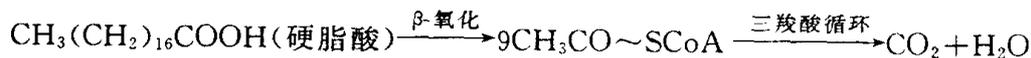
能够分解脂肪的微生物种类很多,包括细菌、放线菌和真菌等。这些微生物能合成脂肪酶。在细胞外,把脂肪水解成甘油和高级脂肪酸:



甘油可形成磷酸二羟丙酮,进入糖酵解途径,通过三羧酸循环而分解成二氧化碳和水:



脂肪酸通过 β -氧化途径氧化。硬脂酸含18个碳原子,经8次 β -氧化作用,降解为9个乙酰CoA。乙酰CoA通过三羧酸循环而分解成二氧化碳和水:



第二节 氮素循环

一、概述

(一) 氮素循环的基本过程

氮是丰富元素,主要以氮气的形式存在于大气中。生物与大气之间进行着活跃的氮素交流。固氮微生物从空气中获得氮气,经过生物固氮作用转化为氨,再合成植物氮化物,经过食物链的传递,成为动物氮化物。动植物死后,残体中的氮化物通过微生物的分解作用成为氨。氨被硝化微生物氧化为硝酸盐。后者则被反硝化微生物还原为氮气而最终排入大气(表8-2)。

(二) 氮素污染

人类活动对自然界氮素循环的干扰很大。例如:含氮矿物和燃料的开采、加工和利用,不但将地壳深层不参与循环的氮化合物带至地面,提高了地面氮的总量,也改变了相应区域的氮化物组成;工业和农业固氮(工业上大规模生产氮肥,农业上大面积栽培豆科植物),将大量氮气转化为氨,加速了陆地的固氮进程,对相应区域的氮素平衡可产生巨大冲击;人类居住渐趋集

中,氮化物也随日用品和食品向居住地迁移,致使局部区域的氮素输入量大大高于输出量。氮素循环平衡的破坏,造成了中间产物的积累,即氮素污染。

表 8-2 氮素循环中的生物反应

反 应	术 语	涉及的生物
$N_2 \rightarrow NH_3$	生物固氮	固氮微生物
$NH_3 \rightarrow$ 有机物	氮同化作用	植物和微生物
有机物 $\rightarrow NH_3$	氨化作用	各种(微)生物
$NH_3 \rightarrow NO_2^-, NO_3^-$	硝化作用	硝化微生物
$NO_3^-, NO_2^-, NO, N_2O \rightarrow N_2$	反硝化作用	反硝化微生物
$NO_3^-, NO_2^- \rightarrow NH_3$	异化性硝酸盐还原作用	发酵微生物

表 8-3 氮素循环中间产物的不良影响

氮化物	不 良 影 响	参 考 文 献
NH_3	毒害水生生物,消耗溶解氧,诱发富营养化,影响饮用水氯化消毒	Robertson <i>et al.</i> , 1992; Bock <i>et al.</i> , 1989
NH_2OH	对生物剧毒,形成亚硝酸	Verstraete, 1975
NO_3^-	诱发富营养化	Robertson <i>et al.</i> , 1992
NO_2^-	致癌,与红血球结合,消耗溶解氧,诱发富营养化	Hamer, 1984; Forman <i>et al.</i> , 1985
NO	引起酸雨,破坏臭氧层	Logan <i>et al.</i> , 1981
N_2O	引起酸雨,破坏臭氧层	Conrad, 1990

业已证明,除氮气外,所有氮素循环的中间产物均可对人类和环境产生不良影响(表 8-3)。其中,以氨、硝酸盐和亚硝酸盐的危害最烈。氨进入水体,不但能作为生物的营养物质而诱发“富营养化”,造成水生生态系统紊乱,而且还有以下有害的作用:① 作为硝化细菌的能源,在氧化过程中消耗溶解氧,造成水体缺氧,严重时使水体变黑发臭;② 作为毒物,影响血液对氧的结合,使鱼类致死;③ 与氯气作用生成氯胺,影响氯化消毒处理的效果。

氨转化为硝酸盐后,尽管消耗水体溶解氧的能力不再存在,但仍然能引起“富营养化”,污染饮用水的硝酸盐还可能导致婴儿的高铁血红蛋白症;硝酸盐进一步转化为亚硝酸胺,则具有“三致”作用,直接威胁着人类的健康。

二、生物固氮

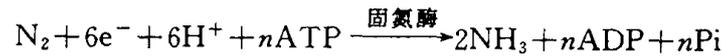
追根究底,所有固定态氮(氨、硝酸盐和有机氮化物)都来自氮气。全球生物固氮与化学固氮的相对数量见表 8-4。每年陆地环境(包括农业系统)的氮素固定量约占 65%,海洋占 20%,化肥(氮肥)占 15%。化肥生产是一个耗能过程,其价格常受矿物燃料价格的制约。由于化肥比较昂贵,农业上经常采用耕作措施(生物固氮)来降低对化肥的需求。例如,固氮作物(大豆)与非固氮作物(玉米)轮作,施用固氮菌肥料。

表 8-4 生物固氮与化学固氮的相对数量

氮素来源	固氮量(吨/年)
陆地	1.35×10^8
水体	4.0×10^7
化肥	3.0×10^7

(一) 固氮反应与固氮类型

生物固氮是指将分子态氮还原为氨的生物过程。即



从这个反应看,生物固氮必须满足以下几个基本条件:① 必须具有固氮酶;② 必须提供电子和质子,还原 1 分子 N_2 需要 6 个电子和 6 个质子;③ 必须提供能量,由于 N_2 拥有三个共价键($\text{N} \equiv \text{N}$),打开它需要很多能量;④ 必须有无氧环境,固氮酶对氧高度敏感,遇氧失活;⑤ 必须及时排除氨,固氮产物会产生反馈阻抑。

生物固氮是固氮微生物的特殊生理功能。固氮微生物均为原核生物,至今尚未发现真核生物具有固氮能力。固氮微生物常分为自生固氮微生物与共生固氮微生物。前者是指独立生活时即能固氮的微生物,后者是指只有与高等植物共生时才能固氮或有效固氮的微生物。与此相应,也将生物固氮分为自生固氮与共生固氮。介于它们之间还有一种中间类型,称为联合固氮。联合固氮是指某些固氮菌生活于植物(如水稻、甘蔗、热带牧草等)根际而进行的固氮作用。它与共生固氮的区别是生物之间没有形成独特的形态结构,与自生固氮的区别是生物之间具有较高的专一性。

自生固氮细菌有 100 多种,既有好氧细菌(固氮菌, *Azotobacter*)和兼性厌氧细菌(固氮螺菌, *Azospirillum*),也有厌氧细菌(梭状芽孢杆菌, *Clostridium*)。一些放线菌和蓝细菌也能进行固氮作用。因为所有生物都需要固定态氮,所以固氮菌分布广泛。自生固氮微生物的固氮量较少,每年为 $1 \sim 2 \text{ kg/hm}^2$ (以 N 计)。固氮微生物生长于植物根际,与植物联合,可提高固氮量,每年达 $2 \sim 25 \text{ kg/hm}^2$ 。蓝细菌是水体环境的主要固氮微生物,由于它们能进行光合作用,固氮效率比非光能营养型自生固氮菌高 1~2 个数量级。植物与固氮菌建立共生关系后,固氮效率大大提高。研究得最多的是根瘤菌与豆科植物的共生固氮,其固氮量(N)每年为 $200 \sim 300 \text{ kg/hm}^2$ 。

(二) 共生固氮

根瘤菌侵入豆科植物根系,并在其中繁殖形成根瘤的特性,称为感染性。根瘤菌对感染的豆科植物有一定的选择作用。通常,一种根瘤菌只能感染一种或特定几种植物,这种特性称为专一性。根瘤菌经根毛进入宿主植物根内,在此部位,根毛细胞壁内陷,并分泌一种含纤维素的物质将根瘤菌包围起来。随着根瘤菌的推进,形成一条明显的套状侵入线。

当侵入线进到根系皮层的 3~6 层细胞时,皮层细胞受到刺激而增生,在根表形成根瘤。根瘤菌被释放至皮层细胞内,聚集在宿主细胞的细胞质外围,并开始迅速繁殖,充满细胞。感染初期,根瘤菌呈杆状,着色性强,染色均匀。此后,皮层含菌细胞形成泡囊,每个泡囊最初只含一个细菌,经几次分裂,囊内可多达 8 个细菌。在泡囊内,根瘤菌的形态发生变异,由杆状变为棒状、梨状、X 状、T 状、Y 状等,着色性弱,染色不均匀。这些特殊形态的根瘤菌称为类菌体。转变为类菌体后,根瘤菌不再繁殖,固氮活性增强。根瘤菌在根瘤中固定分子态氮的特性,称为根瘤菌的有效性。

成熟根瘤的外形和大小依植物种类、细菌菌株和环境条件而异。小的如米粒，大的如黄豆，甚至更大。豌豆的根瘤呈长枣形，可聚集成生姜状。大豆的根瘤呈圆形，常常单个存在。生长在主根上，个体较大，表面光滑，呈红色或粉红色，具有固氮活性的根瘤称有效根瘤。反之，生长在侧根上，个体较小，呈白色或灰白色，无固氮活性的根瘤称无效根瘤。

根瘤的功能是：① 含有豆血红蛋白（根瘤呈红色的原因），对氧起调节缓冲作用。以低浓度高流量向类菌体（即根瘤菌）供氧，既满足根瘤菌对氧的需要，同时保护固氮酶免受氧的抑制。② 为类菌体提供能量。豆科植物以光合产物（有机物质）的形式，通过根瘤供给类菌体，以满足其生长和固氮的能量需要。据测定，豆科植物每同化 100 单位碳，约有 32 单位转运到根瘤中。③ 转化氨，解除反馈阻抑。类菌体把氮气还原为氨后，即分泌至细胞外面。这些氨依靠根瘤转运至植物的其他部位。

在培养基上，根瘤菌长成的菌落为圆形，直径 0.5~1.5 cm，边缘整齐，无色、白色或乳脂色，具有光泽。各种根瘤菌的生长速率差别较大。豌豆根瘤菌属快生型根瘤菌，接种 2 d 后即可在培养基上长出菌落。大豆根瘤菌属慢生型根瘤菌，3~4 d 后才开始生长，一周后才长成菌落。

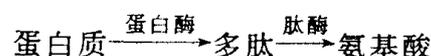
三、氨的同化

将氨合成细胞物质的生物过程称为氨的同化（ammonia assimilation）。生物固氮的产物（氨）可被细胞用于合成氨基酸而进入蛋白质，合成嘌呤和嘧啶而进入核酸，合成 N-乙酰胞壁酸（细胞壁成分）而进入细菌细胞壁。

微生物同化氨的生化途径有两种：① 氨与 α -酮戊二酸结合形成谷氨酸。这个反应受环境中氨浓度的控制。当氨浓度较高（ $>0.1 \text{ mmol/L}$ 或 $>0.5 \text{ mg/kg 土}$ ）而且细胞内存在 NADH_2 时，氨与 α -酮戊二酸结合形成谷氨酸。通常，土壤和水体中的氨浓度都不高，因此这一途径较难发挥作用。② 氨与谷氨酸结合形成谷氨酰胺。该途径包括两个步骤，即氨先与谷氨酸结合形成谷氨酰胺，接着谷氨酰胺与 α -酮戊二酸反应形成两个谷氨酸分子。

四、氨化作用

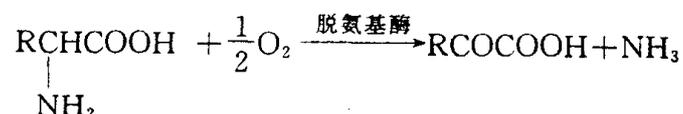
将有机态氮转化为氨的生物反应，称为氨化作用（ammonification）。生物死亡后，机体破坏，细胞壁、蛋白质、核酸、脲素等含氮有机物被分解而释放氨。在自然界，氨化作用是含氮有机物矿化，实现氮素被生物循环使用的重要环节。在微生物的作用下，蛋白质水解成多肽，再水解成氨基酸：



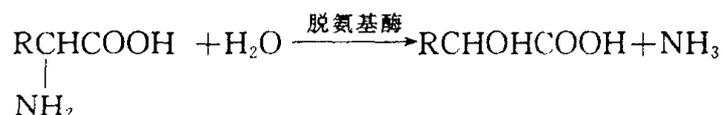
蛋白质是氨基酸通过肽键连结而成的多肽。整个水解过程是在蛋白酶和肽酶的联合催化下进行的。蛋白酶又称内肽酶，能够水解蛋白质分子内部的肽键，产生各种短肽。肽酶又称外肽酶，只能从肽链的一端水解肽键，每次释放一个氨基酸。

氨基酸从蛋白质上释放后，可被摄入细胞。在细胞内，经过多种途径脱除氨基生成相应的有机酸，并释放氨。

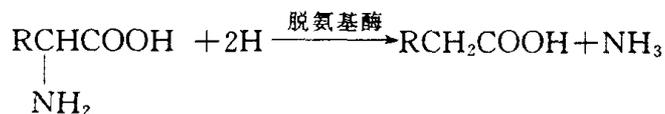
① 氧化脱氨基作用（产生酮酸和氨）



② 水解脱氨基作用(产生醇酸和氨)



③ 还原脱氨基作用(产生饱和脂肪酸和氨)



氨化作用也可在细胞外进行。在胞外酶的作用下,氨基酸被脱除氨基,直接释放至环境中。在脱氨过程中,含硫氨基酸(如半胱氨酸和甲硫氨酸)会产生硫化氢和硫醇(CH_3SH),具有恶臭。

释放的氨又会被微生物再次同化。氨同化作用(生物固定)与氨化作用(矿化作用)究竟以哪个为主?通常,氮受限制时,以生物固定为主;反之,则以矿化作用为主。氮是否成为限制因子,与环境中的碳氮比(C/N比)有关。构成细菌细胞的C/N比为4~5,真菌为10,整个土壤微生物的平均C/N比为8。当C/N比等于8时,生物固定与矿化作用理应达到平衡;但是,微生物吸收的有机物除用于构建细胞外,大量用于产能。在所利用的有机碳中,只有40%结合进生物体,其余均以二氧化碳释放。若将土壤微生物的平均C/N比乘上系数2.5,则刚好与实际情况相符。因此,C/N比等于20不仅是生物固定与矿化作用达到平衡的理论值,也是实际观察值。

施用C/N比小于20的有机肥料时,矿化作用强于生物固定,可释放部分氨氮;然而,当施用C/N比大于20的有机肥料时,生物固定超过矿化作用,不但不能提供氨氮,反而还需从环境中补缺,对植物生长不利。因此,对于秸秆、落叶等碳氮比较高的有机肥料,应加入人类和硫酸铵等富含速效氮的物质,以降低碳氮比,提高肥效。

五、硝化作用

将氨氧化为亚硝酸和硝酸的生物过程,称为硝化作用。硝化作用既可由自养型微生物进行,也可由异养型微生物进行。

(一) 异养型硝化作用

许多异养型生物能够进行硝化作用,但不伴随能量的利用。异养型硝化生物包括细菌、真菌和哺乳动物组织。它们可氧化多种有机或无机氮化物。在异养型微生物中,硝化反应的生理功能因菌而异。

据报道,在某些条件(例如碳源充裕,pH值较低或较高,溶解氧浓度偏低等)下,异养型硝化作用可超过自养型硝化作用。

(二) 自养型硝化作用

1. 硝化细菌及其特性

(1) 硝化细菌 在《Bergey 鉴定细菌学手册》(第九版)中,硝化细菌区分为两个部分,即氨氧化细菌和亚硝酸氧化细菌。前者由5个属组成,后者由4个属组成,且以对亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)和硝化杆菌属(*Nitrobacter*)的研究最多。

(2) 硝化细菌的能量利用特性 硝化作用分两步进行:亚硝化(氨氧化)细菌将氨氧化成亚硝酸,但不能继续氧化成硝酸;反之,硝化(亚硝酸氧化)细菌将亚硝酸氧化成硝酸,但不能氧化

氨。至今还没有发现能够把氨直接氧化成硝酸的微生物。氨和亚硝酸盐依次是亚硝化细菌和硝化细菌进行自养生长的惟一能源。从热力学上看,这两种硝化基质均为低级能源。氨和亚硝酸盐的生物氧化反应为:



ATP 的水解反应为:



比较反应式 8-1、8-2 和 8-3 可知,氨和亚硝酸盐生物氧化所释放的自由能不大;即使全部转化为 ATP,充其量也只能产生 8.4 mol ATP/mol NH_4^+ 和 2.4 mol ATP/mol NO_2^- 。事实上,相对于呼吸链上的电子载体而言,氨和亚硝酸盐的氧化还原电位值 [$E_0'(\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+) = 340 \text{ mV}$, $E_0'(\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-) = 430 \text{ mV}$] 均偏高,氧化磷酸化的效率很低,所能产生的 ATP 非常有限。

从能量利用方式上看,如果把氨氧化成氮气,基质的能量利用率可大幅度提高。氨氧化成氮气的反应为:



它所释放的自由能明显高于硝化反应(反应式 8-1 或 8-2)。此外,由于 $E_0'(\text{N}_2/\text{NH}_4^+) = -270 \text{ mV}$, 低于氨和亚硝酸(盐)的氧化还原电位值,ATP 的合成效率也将显著提高。

值得深思的是:① 硝化基质(氨)本身含能不高,理应用作一种微生物的基质;在自然界,它却偏偏被两种细菌(亚硝化细菌和硝化细菌)分享。② 氨氧化成氮气可比氧化成硝酸盐释放更多的自由能,两种细菌却偏偏将氨氧化成硝酸盐。③ 从基质中获得的能量本身不多,两种细菌却偏偏选择同化中耗能最大的二氧化碳作碳源,致使其同化效率极低(固定 1 mol CO_2 需要 34 mol NH_3 或 100 mol NO_2^-)。

(3) 硝化细菌的生理特性 多年来一直认为亚硝化细菌是严格的好氧化能自养菌,其生理特性为:在供氧充分的情况下,将氨(通过羟胺)氧化成亚硝酸,从中取得能量合成 ATP 和 NADH_2 , 进而同化二氧化碳而生长。简言之,需氧、氨为能源、二氧化碳为碳源。深入研究发现,亚硝化细菌对环境的应变能力远远超出人们的想象。例如,在氧分压较低时,欧洲亚硝化单胞菌可同时利用氧和亚硝酸盐作电子受体;随着氧浓度的降低,亚硝酸盐的消耗比例增大;在无氧时,亚硝酸盐可单独作电子受体。又如,在以亚硝酸盐单独作电子受体时,欧洲亚硝化单胞菌可利用氢、氨和有机物等多种基质作电子供体。其中,以氨为电子供体,亚硝酸盐为电子受体的反应称为厌氧氨氧化。

硝化细菌也曾长期被看成是严格的好氧化能自养菌。一般认为它们的生理特性是:在供氧充分的情况下,将亚硝酸氧化成硝酸,从中取得能量合成 ATP 和 NADH_2 , 进而同化二氧化碳而生长,也即“好氧(O_2)/化能(NO_2^-)/自养(CO_2)”。事实上,它们也能“好氧(O_2)/化能(NO_2^- 或有机质)/异养(有机质)”和“缺氧(NO_2^-)/化能(有机质)/异养(有机质)”。

2. 硝化作用的生化反应

(1) 亚硝化细菌的生化反应

根据现有的知识,亚硝化细菌对氨的转化过程为: $\text{NH}_3 \longrightarrow \text{NH}_2\text{OH} \longrightarrow (\text{NO}) \longrightarrow \text{NO}_2^-$ 。

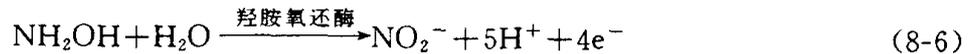
① 氨转化为羟胺。生物氧化反应可表示为



催化这一生化反应的酶是氨单加氧酶(AMO)。AMO 镶嵌于细胞膜内,至今尚未曾分离纯化。有关 AMO 结构和作用机理的资料,都是通过对完整细胞的抑制试验而间接获得的。

AMO 能利用多种基质,除氨以外还可将甲烷氧化成甲醇,把乙烯转化成环氧丙烷,环己烷转化为环己醇,苯转化为苯酚,CO 转化为 CO₂,酚转化为醌。这些基质既可与氨竞争 AMO 活性部位,又可与氨竞争还原剂,因而对氨氧化有抑制作用。乙炔是一种自杀性基质,可被 AMO 转化为不饱和的环氧化物,致使 AMO 结构破坏而永久性失活。Yoshioka 等人发现,AMO 对紫外线敏感。

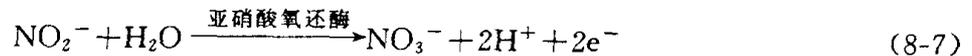
② 羟胺氧化为亚硝酸。氧化所需的氧是由水提供的,也即



催化该反应的酶是羟胺氧化酶(HAO)。该酶位于细胞壁与细胞膜之间。HAO 仅含一种相对分子质量为 63 000 的亚单位,但结构比较复杂。

(2) 硝化细菌的生化反应

在亚硝酸氧化为硝酸的过程中,未检出任何中间产物,因此认为它是一步完成的。结合进硝酸的氧来自水,即



催化此反应的酶称为亚硝酸氧化酶(NOR)。在硝化杆菌细胞中,NOR 含量随生长条件而变。当以亚硝酸盐为能源或以硝酸盐为电子受体时,该菌含有大量 NOR;当环境中不存在亚硝酸盐或硝酸盐时,该菌进行通常的异养生长,细胞内的 NOR 被阻遏。受阻遏的 NOR 可重新诱导产生。异养生长于乙酸盐上的硝化杆菌细胞,经过 3~4 周的适应可重新获得自养生长的能力。

六、硝酸盐还原作用

(一) 同化性硝酸盐还原作用

同化性硝酸盐还原作用是指硝酸盐被细胞吸收后,经还原反应形成氨并结合到细胞物质的生物过程。环境中存在氨时,大多数微生物优先利用氨,抑制同化性硝酸盐还原作用,以避免不必要的能耗。由于同化性硝酸盐还原的目的是利用其中的氮,而并非用作电子受体,因此氧不能代替硝酸盐的功能,也不会抑制硝酸盐的还原。

(二) 异化性硝酸盐还原作用(还原成氨)

异化性硝酸盐还原成氨(DNRA)是指硝酸盐被细胞吸收后,被用作电子受体而还原成氨的生物过程。有机物质相对富裕、电子受体相对贫乏时,有利于 DNRA。在污水污泥、有机质丰富的沉淀物、瘤胃等环境中,易发生 DNRA。虽然该作用的终产物是氨,但它不受氨的抑制,因为 DNRA 的功能是接纳电子。由于作为电子受体,氧比硝酸盐更有效,所以 DNRA 受氧抑制。

(三) 反硝化作用

反硝化作用是指硝酸盐被细胞吸收后,被用作电子受体而还原为氮气的生物过程。

1. 反硝化细菌及其特性 反硝化细菌不像硝化细菌那样在分类学上有专门的类群,它们分散于 10 个不同的细菌科中。就生物的多样性而言,没有一种无机物的转化可与反硝化作用相提并论。自然界最普遍的反硝化细菌是假单胞菌属,其次为产碱杆菌属。相对于这两个属而言,其他反硝化菌属的出现频率较低,只有在某些特殊的环境中才居优势。在土壤中,荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*, 特别是生物 II 型)居绝对优势。

反硝化细菌的能源谱较宽,化学能(包括有机物质和无机物质)和光能均可。其中,有机物质是许多反硝化菌属以及自然界一些优势反硝化菌群的主要能源。反硝化细菌多为兼性厌氧菌,在能量代谢中,可以利用氧或硝酸盐作为最终电子受体。氧受限制时,硝酸盐取代氧的功能。虽然硝酸盐与氧都从呼吸链接受电子,但以硝酸盐作电子受体时,基质释放的能量下降。以硫酸盐取代硝酸盐时,基质释放的能量也会下降。因为基质释能上的差异,硫酸盐还原菌对基质(有机物)的竞争能力不如反硝化细菌,所以在污水处理系统中,即使缺氧(没有氧气,但有硝酸盐),硫酸盐也不会被还原为硫化氢而产生臭味。

2. 反硝化作用的生化反应 根据已有的研究结果,反硝化作用分四步进行,即: $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ 。

硝酸盐还原反应由硝酸还原酶催化。该酶以两种形态存在:一种游离于细胞壁与细胞膜之间,称为膜外硝酸还原酶,有氧时也具催化活性;另一种镶嵌于细胞膜内,称为膜内硝酸还原酶,基质只有进入细胞才能受此酶作用。两种硝酸还原酶的作用产物均为亚硝酸盐。

亚硝酸盐还原反应由亚硝酸还原酶催化。该酶分布于细胞壁与细胞膜之间,有两种类型:一种为二聚体,含 c 和 d₁ 型血红素,称为血红素型亚硝酸还原酶;另一种为三聚体,含两种 Cu 活性中心,称为铜型亚硝酸还原酶。在很长时期内,一直认为 N₂O 是亚硝酸还原酶的作用产物。直至 20 世纪 80 年代末期,才证明并接受 NO 为该酶的作用产物。因为 NO 剧毒,NO 积累可杀死细胞。拥有亚硝酸还原酶,但缺失 NO 还原酶,对细菌具有自杀作用。

NO 还原反应由 NO 还原酶催化。该酶结合于细胞膜内,是四个脱氮酶中最后被分离的酶。它的作用产物是 N₂O。NO 对细胞具有毒性,而 N₂O 没有毒性,抑制后续反应(N₂O→N₂),将有限的电子集中用于 NO 还原是反硝化细菌免遭 NO 毒害的保护机制之一。另一个保护机制是,NO 还原酶对 NO 具有极高的亲和力,可使 NO 浓度维持在低于毒害临界值的水平。

N₂O 还原反应由 N₂O 还原酶催化。该酶位于细胞壁与细胞膜之间,作用产物是 N₂。它易受低 pH 的抑制,对氧的敏感性也高于其他脱氮酶。由于 N₂O 还原酶受到抑制,在氧浓度高和 pH 低的环境中,N₂O 常成为反硝化作用的主要产物。

第三节 硫素循环

一、概述

(一)硫素循环的基本过程

自然界硫素循环的基本过程是:陆地和海洋中的硫通过生物分解、火山爆发等进入大气;大气中的硫通过降水和沉降等作用,回到陆地和海洋;地表径流带着硫进入河流,输往海洋,并沉积于海底。在人类开采和利用含硫的矿物燃料和金属矿石的过程中,硫可被氧化成为二氧化硫和还原成为硫化氢进入大气;也可随酸性矿水的排放而进入水体或土壤。

硫是地球上的第十大元素,也是生物的必需营养元素。除了集约经营的农业系统外,它一般不会成为限制因子。陆地和海洋植物从土壤和水中吸收硫。吸收的硫构成植物本身的机体。经过食物链的传递,成为动物硫化物。动植物死后,残体中的硫通过微生物的分解作用成为硫化氢。硫化氢被硫化微生物氧化为硫酸盐。后者则被硫酸盐还原菌还原为硫化氢。硫通常在 SO₄²⁻ 的 +6 价与 S²⁻ 的 -2 价之间循环变化。

(二) 硫素污染

人类活动干预自然界硫素循环,可造成硫素污染。燃烧含硫燃料(如煤和石油)、冶炼含硫矿石(特别是含硫较多的有色金属矿石)、化工、炼油和硫酸生产等,均可释放大量的二氧化硫。这些人类活动使局部地区(城市和工矿区)大气中二氧化硫浓度大大升高,对人和动植物有伤害作用。二氧化硫转变成的硫酸盐气溶胶散射阳光,使大气能见度降低。硫酸雾和酸性硫酸盐还可腐蚀金属、建筑材料和其他物品,并可造成酸雨。

硫化氢是带有臭鸡蛋味的有毒气体,浓度很低时即可被人们察觉。其他硫化物(主要有甲硫醇、二甲硫、二甲二硫)也因有强烈的臭味而被列为大气污染物。在水体中,硫化氢除发臭外,还对混凝土和金属有侵蚀破坏作用。

露天剥矿将大量含硫矿石暴露于空气中,导致酸性矿水祸害地表。

二、硫的同化

微生物利用硫酸盐和硫化氢,组成本身细胞物质的过程,称为硫的同化作用。大多数微生物利用硫酸盐作为硫源,只有少数微生物同化硫化物。微生物吸收硫酸盐后,需把硫酸盐还原为硫化物,再结合到蛋白质等细胞物质中。这个过程称为同化性硫酸盐还原作用。

为什么多数微生物不直接吸收硫化物呢?原因有二:① 硫化物有毒害作用。在细胞内,硫化物可与细胞色素中的金属反应,产生金属硫化物,毁灭细胞色素的活性。② 硫酸盐适合生物利用。一方面,硫酸盐是环境中主要的有效硫源,易于获得;另一方面,在细胞内硫酸盐还原反应受到控制,硫化物边产生边同化,可保护细胞免受毒害。

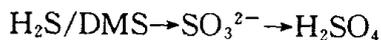
硫酸盐还原是一个需能反应。在硫酸盐被还原以前,需消耗 ATP 将硫酸盐转化成腺苷-5'-磷酸硫酸盐(APS);再消耗第二个 ATP 将 APS 转化成 3'-磷酸腺苷-5-磷酸硫酸盐(PAPS)。尔后,PAPS 还原成亚硫酸盐,再还原成硫化物。产生的硫化物由丝氨酸接受,形成半胱氨酸。

三、脱硫作用

脱硫作用(desulfuration)是指蛋白质或其他含硫有机物被分解而释放硫化氢的生物过程。在有氧的环境中,硫化氢可继续氧化成硫酸盐,供植物和微生物利用。在厌氧条件下,蛋白质腐解产生硫化氢和硫醇,逸入大气可产生恶臭;在土壤中积累会毒害植物根系。

在陆地上,挥发性硫化物(SO_4^{2-})的生物释放量每年约 1 kg/hm^2 。城区使用矿物燃料(含硫),将该值提高到 100 kg/hm^2 。含硫低的矿物燃料的贮量不断萎缩,迫使人们越来越多地开采和使用含硫高的矿物燃料,更加剧了硫的污染问题。

在海洋中,藻类经常合成二甲基磺酰丙酸(DMSP),用于调节细胞渗透压。经微生物降解,DMSP 转化为二甲基硫化物(DMS)。DMS 是挥发性物质,一旦进入大气,就会与硫化氢一起光解形成硫酸盐。



硫酸溶于水蒸气后,使雨水从中性降低至 pH3.5,称之为酸雨。酸雨的危害极大,可损伤植物,腐蚀建筑物,影响土壤和湖泊的 pH 值。

四、硫化作用

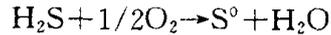
硫化氢、元素硫或硫化亚铁等进行氧化,最后生成硫酸的生物过程,称为硫化作用

(sulphurification)。能进行硫化作用的细菌可分为化能自养型细菌和光能自养型细菌两类。前者又可分为硫磺细菌和硫化细菌。除上所述,许多好氧性微生物(细菌和真菌)可将硫氧化成硫代硫酸盐或硫酸盐,但它们不从中获能。这种异养型硫化作用的途径尚不清楚。

在大多数环境中,自养型硫化细菌被认为是主要的硫化细菌。但是,许多自养型硫化细菌生长的最适 pH 很低,在一些中性至碱性的土壤中,其作用可能不如异养型硫化菌。

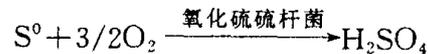
(一)自养型硫化作用

1. 硫磺细菌 硫磺细菌将硫化氢氧化为元素硫,贮积在细菌体内,当环境中缺少硫化氢时,细胞内贮积的硫磺颗粒被继续氧化成硫酸。产生的能量用于固定二氧化碳。

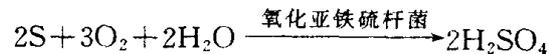
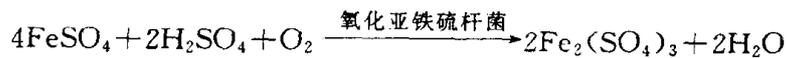


硫磺细菌的生长需要硫化物和氧。通常,两者很难同时满足,存在硫化物的环境中往往缺氧。在进化过程中,它们形成了经济利用氧的能力,可在低氧浓度下旺盛生长。这些微生物多呈丝状,常生活于硫化物丰富的沼泽沉积物内,用显微镜观察沼泽样品时很容易检出。

2. 硫化细菌 硫化细菌氧化硫或硫化物产生硫酸,细胞体内没有硫磺颗粒的贮积。氧化硫硫杆菌(*Thiobacillus thiooxidans*)耐酸性极强,生长的最适 pH 为 2。

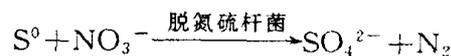


氧化亚铁硫杆菌(*Thiobacillus ferrooxidans*)既能氧化亚铁又耐强酸,可用于细菌冶金。从低品位的矿物中回收稀有金属。



若控制不当,上述反应也可导致酸性矿水的形成,这是硫素循环中破坏性很大的环节。

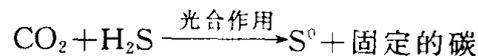
大多数自养型硫化细菌都是严格好氧菌,但脱氮硫杆菌(*Thiobacillus denitrificans*)例外。它是兼性厌氧菌,能以硝酸盐取代氧作为电子受体。



形成的硫酸盐与钙作用产生石膏。脱氮硫杆菌不耐酸,生长的最适 pH 为 7。

(二)光能自养型硫化作用

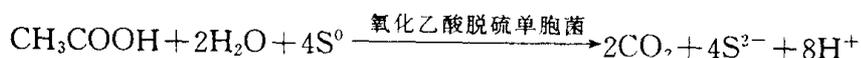
光能自养型硫化作用仅限于绿色硫细菌和紫色硫细菌。它们能在厌氧条件下进行光合作用,但以硫化氢作为供氢体,不释放氧气。



这些微生物常分布在淤泥、硫泉、盐湖中。其生长有赖于硫化物与光共同存在。它们对地球上的初级生产贡献不大,但可从环境中去除硫化物。

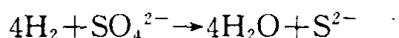
五、硫酸盐还原作用

硫酸盐还原作用有两大类型,即同化型(见硫的同化)和异化型。异化型硫酸盐还原作用是指硫或硫酸盐被用作电子受体而还原成硫化氢的生物过程。其中以硫为电子受体时,反应类似于氧呼吸,因而称为硫呼吸。氧化乙酸脱硫单胞菌(*Desulfuromonas acetooxidans*)是典型硫呼吸细菌。它的生长基质是乙酸、乙醇和丙醇等有机小分子。

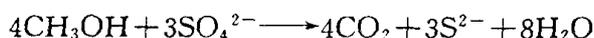


在环境中,以硫酸盐作为电子受体也许是更重要的生物反应。脱硫杆菌(*Desulfobacter*)、

脱硫葱状菌(*Desufobulbus*)、脱硫肠状菌(*Desufotomaculum*)、脱硫球菌(*Desulfococcus*)、脱硫八叠球菌(*Desulfosarcina*)、脱硫弧菌(*Desulfovrio*)都是以硫酸盐作为电子受体的硫酸盐还原菌(SBR),广泛分布于各种环境中。它们能够以氢气作为生长基质。



值得注意的是,该反应并不能使SBR自养生长,因为多数SBR不能固定二氧化碳,而需从有机小分子(如甲醇和乙酸)中取得碳素。利用甲醇的反应为:



硫和硫酸盐还原细菌都是厌氧细菌,都能利用有机小分子(如乙酸、乳酸、丙酮酸)。为什么在厌氧环境中会存在这些有机小分子呢?硫酸盐还原细菌通常是由发酵细菌、硫酸盐还原细菌和产甲烷细菌组成的厌氧群落的成员。这个厌氧群落协同进行有机物质转化为二氧化碳和甲烷的序列反应,其中,发酵性细菌可为SBR提供有机小分子。最近发现,SBR也能利用较复杂的有机物质(如芳香族化合物和长链脂肪酸)。人们正在密切关注SBR应用于污染环境原位修复的可能性,因为很多环境受芳香族化合物污染,这些环境常常缺氧,且充氧比较困难。

第四节 磷素循环

一、概述

(一)磷素循环的基本过程

自然界磷素循环的基本过程是:岩石和土壤中的磷酸盐由于风化和淋溶作用进入河流,然后输入海洋并沉积于海底,直到地质活动使它们暴露于水面,再次参加循环。这一循环又称磷素地质大循环,需若干万年才能完成。

在磷素地质大循环中,存在两个局部的小循环,即陆地生态系统的磷素循环和水生生态系统的磷素循环。陆地生态系统的磷素循环为:岩石的风化向土壤提供磷。植物通过根系从土壤中吸收磷酸盐。动物以植物为食物而得到磷。动植物死亡后,残体分解,磷又返回土壤。在未受人干扰的陆地生态系统中,土壤和有机体之间几乎是一个封闭循环系统,磷的损失很少。水生生态系统的磷素循环为:一小部分陆地生态系统的磷,由于降雨冲洗等作用而进入河流、湖泊,最终归入海洋。在水生生态系统中,磷被藻类和水生植物吸收,然后通过食物链逐级传递。水生动植物死亡后,残体分解,磷再次进入循环。也有一部分磷沉积于深水底泥,从此退出生态循环。人类渔捞和鸟类捕食水生生物,则可使磷返回陆地生态系统,但数量较少。

(二)磷素污染

在自然经济中,一方面从土地上收获农作物,另一方面把废物和排泄物送回土壤,磷的收支基本平衡。但商品经济发展后,不断把农作物和农牧产品运往城市,城市垃圾和人畜排泄物不能返回农田,致使农田磷含量逐渐减少。施用磷肥已成为补偿磷亏损的重要农业措施。部分磷肥可随农田排水进入水体,造成磷的面源污染。某些含磷丰富的工业废水和接纳含磷洗涤剂的城市生活污水,则造成磷的点源污染。含磷废水排入河流、湖泊或海湾,是湖泊发生富营养化和海湾出现赤潮的主要原因。

二、磷的同化

磷是所有生物的基本营养元素。在生物体中,核酸(DNA和RNA)、ATP、磷脂和磷脂蛋

白都是重要的含磷有机物。微生物从环境中吸收可溶性磷酸盐,并将其转化为有机磷化物。例如,在细胞内磷酸盐可与 ADP 反应产生 ATP。

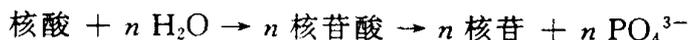
在许多生态系统(包括农业)中,有效磷常成为重大的制约因子。因此,可以用 $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ 来示踪营养物质在食物链上的传递情况。如果把 $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ 引入水体生态系统,初级生产者(浮游植物群落)被迅速标记,而动物性浮游群落(消费者)则由于不直接吸收磷酸盐,被标记较慢。高营养级的生物(鱼和大型无节椎动物)被标记得更慢。在每个营养级上,放射性磷的浓度都经历一个升至最高后再降低的过程。然而,沉积物中的放射性磷浓度却稳定增加。如果实验进行的时间足够长,在沉淀磷和循环磷之间也会建立一个平衡。但两者的最终比例取决于水的化学性质(例如高 pH 值和二价阳离子有利于沉淀)和水力条件(例如分层可限制磷的运动)。

三、有机磷化物的分解

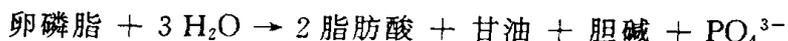
植物和微生物同化的磷,又可在有机磷的分解中重新释放。一些细菌和真菌能产生肌醇六磷酸酶,从肌醇六磷酸(植酸)上释放磷酸。



一些细菌和真菌能产生核酸酶和核苷酸酶,先把核酸水解成核苷酸,再从核苷酸上释放磷酸。



也有一些细菌和真菌能产生磷脂酶,把磷脂水解成脂肪酸、甘油和磷酸。



在分解有机磷化物的过程中,微生物将部分磷转化为自身的细胞物质,多余部分才以磷酸盐的形式释放。有机磷化物是否释放磷取决于它的 C/P 比。C/P 比小于 200 时,有磷酸盐释放;C/P 比为 200~300 时,有机物中的磷全部被微生物同化,既没有磷酸盐的释放,也不需要从环境中吸收;C/P 比大于 300 时,微生物耗尽有机物中的磷,还需从环境中补充。由于微生物的摄磷能力要比植物高 3~9 倍,因此施用高 C/P 比的有机肥,会导致微生物与植物竞争有限的磷。

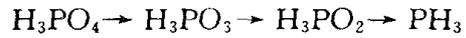
四、难溶磷化物的溶解

H_2PO_4^- 只有一个键与金属离子结合,水溶性较高; HPO_4^{2-} 和 PO_4^{3-} 分别有二个和三个键与金属离子结合,水溶性依次降低。在石灰性土壤中,磷酸盐主要以不溶性的磷酸钙 $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2, \text{CaHPO}_4$ 和 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2]$ 存在;在酸性土壤中,则主要以铁、铝磷酸盐存在。磷酸盐的化学固定严重地限制着植物和微生物对磷的吸收和利用。

能溶解磷酸钙或磷灰石的微生物较多。它们的溶磷方式主要有:① 产生有机酸,促进磷的溶解。某些二羧酸和三羧酸是很强的螯合剂,能够有效地降低钙、铁、铝对磷酸盐的结合,使磷酸盐释放出来。② 产生无机酸(例如,硝化作用产生硝酸,硫化作用产生硫酸),促进磷的溶解。在化肥生产上,通常也采用强酸处理,让氢离子去取代磷灰石中一个或两个与金属离子结合的化学键,使其变成易溶解的磷酸盐。③ 释放二氧化碳,产生碳酸,促进含磷矿石的风化。在微生物分解有机质的过程中,释放大量的二氧化碳,在水溶液中转化成 H_2CO_3 和 HCO_3^- ,可促进含磷矿石的风化,从而增加钙、镁磷酸盐的溶解。④ 在厌氧条件下,一些微生物能使磷酸高铁盐中的 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} ,因溶解度提高而使磷酸盐游离出来。

五、磷酸盐的还原

在一般情况下,磷酸盐不能被微生物还原,但当环境中不存在硫酸盐、硝酸盐和氧时,磷酸盐也可能作为电子受体而被还原。



PH_3 易挥发,遇氧自燃,产生蓝色火焰。在有机物质大量降解的坟堆和沼泽附近,有时可见 PH_3 产生。 PH_3 遇氧自燃后,可点燃这些环境中产生的沼气而诱发“鬼火”。不过,目前还没有这方面的实验证据。

复习思考题

1. 什么叫生物地球化学循环?
2. 简述微生物在碳素循环中的作用。
3. 简述有机物质好氧与厌氧分解的一般途径。
4. 简述纤维素的微生物分解方式。
5. 氮素循环包括哪几个环节?
6. 什么叫生物固氮?有哪几种类型?
7. 简述硝化和反硝化作用的生化过程。
8. 为什么大多数微生物利用硫酸盐而不利用硫化氢作为硫源?
9. 硫磺细菌与硫化细菌有何差别?
10. 微生物促进磷酸钙或磷灰石溶解的方式有哪些?

第九章 微生物对环境的污染与危害

环境微生物既有其有利的方面,也有其不利的方面。对人和生物有害的微生物污染大气、水体、土壤和食品,可影响生物产量和质量,危害人类健康,这种污染称为微生物污染。按照被污染的对象,可分为大气微生物污染、水体微生物污染、土壤微生物污染、食品微生物污染等。根据危害方式,则可分为病原微生物污染、水体富营养化、微生物代谢物污染等。本章着重介绍环境微生物所致的环境污染及其对人类的危害,并简单介绍微生物风险评估知识。

第一节 环境中病原微生物的传播与危害

能使人、禽畜和植物致病的微生物,统称为病原微生物。病原微生物可通过空气、水体、土壤和食物而在环境中传播。

一、大气微生物污染

由于微生物污染,大气环境质量恶化,生物生存、人体健康和人类活动受到影响或危害的现象,称为大气微生物污染。

大气不是微生物产生和生长的自然环境。但是,由于种种原因,大气中常常存在微生物。许多微生物寄生在人和动物体内,可从呼吸道排出,直接污染大气;也可随排泄物(如痰液、脓汁或粪便等)排出而进入地面,随灰尘飞扬,间接污染大气。土壤中的微生物附着在尘埃颗粒上,飘浮空中,也可造成大气微生物污染。

污染大气的微生物种类很多,其中对外界环境抵抗能力较强的种类,如八叠球菌、细球菌、枯草杆菌以及霉菌和酵母菌的孢子等,在大气中的停留时间较长,是造成大气污染的主要种类。

在室外空气中,微生物的数量与所在地区的人口密度、动物和植物的数量、土壤和地面的铺垫情况、以及气温、湿度、气流和日照等因素有关。一般靠近地面的空气污染程度最严重,随高度的上升,空气中微生物的数量减少,大气上层几乎没有微生物。

在室内空气中,特别是在通风不良、人员拥挤的环境中,可能存在较多的微生物,其中包括病原微生物,如结核杆菌、白喉杆菌、溶血性链球菌、金黄色葡萄球菌、脑膜炎球菌、感冒病毒、流行性感冒病毒、麻疹病毒等。一般室内空气中的细菌总数远高于室外空气。

微生物污染空气,可使空气成为传播呼吸道传染病的媒介,造成某些传染病的流行。此外,空气中的微生物还会污染食品,使之腐败变质。

防止大气微生物污染的措施有:① 室内通风。通过空气流动、空气稀释和微生物沉降,可使室内空气中微生物数目明显减少。影剧院、礼堂、会议室等人员拥挤的场所应该采用这一措施。② 空气过滤。对空气清洁程度要求较高的场所,如手术室、无菌实验室等可采用多种空气

过滤器,以除去含有微生物的尘埃。③ 空气消毒。常用的空气消毒方法有物理法、化学法两类。物理消毒法主要是紫外线照射。紫外线能有效地杀灭空气中的微生物。化学消毒法主要是用各种化学药品喷洒或熏蒸。常用的药品有甲醛、乳酸、次亚氯酸钠(或漂白粉)、三乙烯乙二醇、过氧乙酸、丙二醇等。

二、水体微生物污染

致病微生物进入水体,或某些藻类大量繁殖,使水质恶化,直接或间接危害人类健康或影响渔业生产的现象,称为水体微生物污染。

地面的微生物、大气中飘浮的微生物均可进入水中污染水体。河川、湖泊中微生物的数量一般取决于季节、降雨量和流入水量。邻近城镇的水体,含有害微生物较多。地下水(如井水和泉水)埋藏愈深,微生物愈少。海水中病原菌比淡水少,但海滨、港口因接纳污水,也常含有病原菌。

(一)病原性细菌

在自然界清洁水体中,1 mL 水中的细菌总数在 100 个以下,而受到严重污染的水体可达 100 万个以上。污染水体的细菌,主要是肠道细菌(大肠菌群、粪链球菌、梭状芽孢杆菌等)和病原菌。比较起来,病原菌的危害性更大。污染水体的病原菌主要有:

1. 沙门氏菌属 沙门氏菌(*Salmonella*)病患者的粪便、畜栏粪污和屠宰场污水都含有沙门氏菌。水产养殖场受污染后,在水产品中也可检出沙门氏菌。在污染水体中经常可检出的沙门氏菌有鼠伤寒沙门氏菌(*S. typhimurium*)、肠炎沙门氏菌(*S. enteritidis*)、乙型副伤寒沙门氏菌(*S. paratyphi B*)、伤寒沙门氏菌(*S. typhi*)、猪霍乱沙门氏菌(*S. choleraesuis*)、婴儿沙门氏菌(*S. infantis*)、德比沙门氏菌(*S. derby*)、都柏林沙门氏菌(*S. dublin*)等。在临床上除伤寒和副伤寒分别由伤寒沙门氏菌和副伤寒沙门氏菌引起外,急性胃肠炎、腹泻与腹痛等病症也是由其他一些沙门氏菌引起的。细菌性食物中毒通常也是由沙门氏菌属细菌引起的。

2. 志贺氏菌属 该属一般只存在于菌痢患者和短时带菌者的粪便中,有时在污水中捕得的鱼体内也可检出,但在家畜的粪便中一般很少发现。志贺氏菌病主要通过食物或接触传染,如饮用水源受到污染,可引起水型痢疾暴发流行。引起痢疾的志贺氏菌主要是弗氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*)和宋内氏志贺氏菌(*Sh. sonnei*),此外还有痢疾志贺氏菌(*Sh. dysenteriae*)和鲍氏志贺氏菌(*Sh. boydii*)。

3. 霍乱弧菌和 *El Tor* 弧菌 这两种细菌可引起霍乱和副霍乱疾病,它们是通过饮水传播的一种烈性传染病。

4. 致病性大肠杆菌 粪便中存在的某些血清型大肠杆菌可引起腹泻、呕吐等症状,这种大肠杆菌通称为致病性大肠杆菌。有些大肠杆菌产生的肠毒素,能引起强烈腹泻,此种大肠杆菌又称产肠毒素大肠杆菌。

5. 结核杆菌 水中结核杆菌主要来自医院或疗养院排放的污水。在牛栏污水和肉类加工厂污水中,还可经常检出牛结核分支杆菌(*Mycobacterium bovis*),该菌也能使人致病。

(二)钩端螺旋体

钩端螺旋体存在于已受感染的动物(如猪、马、牛、狗、鼠)的尿液内,可以水为媒介,通过破损的皮肤或粘膜侵入人体,引起出血性钩端螺旋体病。病原性钩端螺旋体对外界环境因素的抵抗力较一般细菌弱。

(三) 病毒

病毒存在于人的肠道,并可通过粪便污染水体。主要病毒有:脊髓灰质炎病毒(*Poliovirus*)、柯萨奇病毒(*Cox-sackievirus*)和人肠细胞病变孤儿病毒(*Echovirus*)等肠道病毒,以及腺病毒(*Adenovirus*)、呼肠孤病毒(*Reovirus*)和肝炎病毒等。

对于病毒性传染病的水型暴发流行,研究较多的是传染性肝炎。流行病学调查证明,在世界各地传播的传染性肝炎,主要是水体受污染引起的。

(四) 其他微生物

有些微生物虽然不会直接影响人体健康,但是可以改变水的感官性状,恶化水质,使水质产生异臭和异味,或妨碍水的处理。其中,藻类污染已引起人们的关注(详见本章第二、三节)。

水体微生物污染,特别是饮用水源的病原菌污染可给人类带来巨大的灾难。例如,人类是霍乱弧菌(*V. cholerae*)的天然寄主。霍乱病患者的粪便处理不当,可通过多种途径污染食物和饮用水源,导致霍乱病传播。1991年1月秘鲁发生霍乱爆发流行,并蔓延至中美洲和南美洲各国。共出现病例104万个,致死近万人。事后流行病学调查发现,这次霍乱爆发流行的病因是饮用水消毒不彻底,其中含有霍乱弧菌。又如,原生动物隐孢子虫(*Cryptosporidium*)的卵囊可通过人类和动物排泄物进入环境。卵囊对氯气消毒的抵抗力很强,能够在经过氯气消毒处理的饮用水中存活;对人类的感染力超常,只要饮用水或食物中存在少数卵囊,即可危害人类的健康。1993年4月,美国40多万人因饮用消毒不彻底的供水而受隐孢子虫感染,死亡人数超过50人。

防治水体微生物污染的主要措施有:①加强污水处理,主要是加强医院、畜牧场、屠宰场、禽蛋厂的污水处理。这类污水只有达标后才允许排放。②加强饮用水处理,保证生活饮用水符合水质标准。对农村分散式给水,通过煮沸或加漂白粉等方式杀灭水中的病原体。

三、土壤微生物污染

一个或几个有害的微生物种群,从外界环境侵入土壤,大量繁衍,破坏原来的动态平衡,对人体健康或生态系统产生不良影响的现象,称为土壤微生物污染。

造成土壤微生物污染的污染物主要是未经处理的粪便、垃圾、城市生活污水、饲养场和屠宰场的污物等。其中危险性最大的是传染病医院未经消毒处理的污水和污物。传染性细菌和病毒污染土壤后,不仅可对人体健康产生严重危害,而且还可危害植物,造成农业减产。

土壤并非是病原微生物生存的适宜环境。病原微生物在土壤中的存活时间,受土壤有机质种类与数量、pH、温度、日照等因素影响。一般而言,无芽孢杆菌存活时间为几小时至数月。例如在潮湿的冬季,沙门氏菌能在污水灌溉的土壤中存活70d,而在干燥的夏季为35d。芽孢杆菌则能存活更长时间。病毒易吸附于土壤颗粒内而延长存活时间。据报道,在污灌土壤中,脊髓灰质炎病毒冬季存活96d,夏季存活11d;灌溉停止23d后仍可在该土壤的蔬菜叶面上检出病毒。土壤的粘土含量愈高,对病毒的吸附力愈大;反之则小。试验表明,砂壤土对污水中病毒的滤除率高达99.9%;而在砂土中,病毒可透过土层污染地下水。此外,pH值低有利于病毒吸附,pH值升高则有利于病毒释放。

土壤病原体危害人类的主要途径有:①人体排出的病原体直接或经施肥和污灌污染土壤,在被污染的土壤上种植蔬菜瓜果,人体与污染土壤接触或生吃这些蔬菜瓜果而感染致病(人-土壤-人途径)。②患病动物排出病原体污染土壤,然后感染人体(动物-土壤-人途径)。③自然土壤中存在致病菌,人体与土壤接触而感染得病(土壤-人途径)。

防治土壤微生物污染的主要措施是,对人畜粪便和污水污泥进行灭菌处理,再作肥料使用。粪便无害化处理的方法很多,可结合当地的施肥习惯及卫生要求,因地制宜。

第二节 水体富营养化

一、水体富营养化的概念

水体富营养化(eutrophication)是指氮、磷等营养物质大量进入水体,使藻类和浮游生物旺盛增殖,从而破坏水体生态平衡的现象。湖泊、内海、港湾、河口等缓流水体易发生富营养化。

对水体富营养化的成因有不同的见解。多数研究者认为,氮、磷等营养物质浓度升高,是藻类大量繁殖的主要诱因,其中又以磷为关键因素。影响藻类生长的物理、化学和生物因素极为复杂,很难预测藻类的发展趋势,也难以定出表征富营养化的指标。目前一般采用的富营养化指标是:水体含氮量大于 $0.2\sim 0.3\text{ mg/L}$,含磷量大于 $0.01\sim 0.02\text{ mg/L}$,生化需氧量大于 10 mg/L ,细菌总数(淡水, $\text{pH}7\sim 9$)达 10^5 个/mL,叶绿素a(藻类生长量的标志)大于 $10\text{ }\mu\text{g/L}$ 。

在未受污染前,水体中存在着大量的微生物种群,种群之间关系密切,各具特性。生物群体的特点是种类较多,每个种的个体数量较少。水体受污染后,生物群体的种数减少,存活种的个体数量增加。污染严重时,往往只能看到少数种,但其个体数量很大。由于优势藻所含的色素不同,水体可呈现蓝、红、棕、乳白等不同颜色。

赤潮(又称红潮,red tide)是海域中一些浮游生物爆发性繁殖所引起的水色异常现象,主要发生在近海海域。20世纪以后,赤潮发生的次数逐年增加。赤潮的颜色是由形成赤潮的优势浮游生物种类的颜色决定的。江河、湖泊中也可出现类似的现象,通常称为水华(又称水花,water bloom)。

二、富营养化水体中的主要生物种群

在富营养化水体中出现的生物主要是微型藻类。在海洋中形成赤潮的藻类很多,现已查明有60多种,常见的有:腰鞭毛虫(*Dinofla gellata*)、裸甲藻(*Gymnodinium aeruginosum*)、短裸甲藻(*Gymnodinium breve*)、梭角藻(*Ceratium fusus*)、原甲藻(*Prorocentrum micans*)、中肋骨条硅藻(*Skeletonema costatum*)、角刺藻(*Chaetoceros*)、卵形隐藻(*Cryptomonas ovata*)、无纹多沟藻(*Polykrikos schwartzi*)、夜光藻(*Noctiluca milialis*)等。其中,腰鞭毛虫又称为甲藻(*Dinoflagellate*)、沟鞭藻,常见于北纬或南纬 30° 的海水中,单细胞,具有两根鞭毛,含有光合色素,细胞呈深褐、橙红、黄绿等颜色。赤潮发生时,甲藻数目可达 5×10^4 个/mL,使局部海水呈现甲藻的颜色;此外甲藻可发荧光,即使在黑夜中亦清晰可见。占优势的藻类不同,赤潮的颜色也不同。例如,夜光藻、无纹多沟藻等形成的赤潮呈红色,绿色鞭毛藻大量繁殖时呈绿色,硅藻多时则呈褐色。

在湖泊中形成水华的藻类以蓝藻(蓝细菌)为主,常见的有:微囊藻属(*Microcystis*)、鱼腥藻属(*Anabaena*)、束丝藻属(*Aphanizomenon*)和颤藻属(*Oscillatoria*)。蓝藻是含有光合色素的原核生物,其光合作用的方式不同于光合细菌,相同于植物和真核藻类。蓝藻种类很多,在水体富营养化时大量繁殖的约有20种。每种蓝藻旺盛繁殖的持续时间各不相同。过度繁殖后,可造成水体缺氧而降低繁殖速度。一种蓝藻的衰退可促进其他蓝藻的增殖,从而发生各种蓝藻的演替现象。一些蓝藻能进行固氮作用。存在固氮蓝藻时,磷成为发生水华的限制因素。有的固

氮蓝藻含有气泡,气泡随藻龄的增长而加大。气泡的功能是为蓝藻提供浮力。光照较弱时,气泡膨胀,使蓝藻上浮至水表;光照很强时,气泡萎缩,使蓝藻下沉至弱光区。因此,在不同水体和不同光照条件下,水华蓝藻在水体中的分布不尽相同。

三、水体富营养化的形成和影响因素

(一) 水体富营养化的形成

水体富营养化是水体生态演变的一个阶段。这种演变既可以是“天然的”,也可以是“人为的”。天然的水体富营养化是自然环境因素改变所致的生态演变,其过程极为缓慢,常需几千年甚至上万年。它与湖泊的发生、发展和消亡密切相关,并受地质地理环境演变的制约。控制这种水体富营养化的因子主要是内源性的。水体中的藻类以及其他浮游生物能够源源不断地得到营养物质而繁殖;死亡后,通过腐烂分解,又可把氮、磷等营养物质释放至水中,供下一代藻类利用。死亡的藻类残体沉入水底,一代又一代地堆积,使湖泊逐渐变浅,直至成为沼泽。一些高山、极地湖泊的富营养化大多属于天然的富营养化。

人为的水体富营养化是在人类活动的影响下发生的水体生态演变。这种演变很快,可在短期内出现。其控制因子主要是外源性的。例如,人为破坏湖泊流域的植被,促使大量地表物质流向湖泊;或过量施肥,造成地表径流富含营养物质;或向湖泊洼地直接排放含有营养物质的工业废水和生活污水,均可加速湖泊富营养化。据1986—1990年对我国26个湖库的调查,湖泊富营养化几乎都是人为的富营养化。

(二) 影响因素

藻类的生长与繁殖与水体中的氮、磷含量成正相关,并受温度、光照、有机物、pH值、毒物、捕食性生物等因素的制约。这些因素相互作用,一起影响水体富营养化的进程。

1. 营养物质 水体生物生长所需的营养元素约有20~30种。从藻类的组成($C_{106}H_{263}O_{110}N_{16}P_1$)看,除碳、氢、氧外,需要量最大的营养元素是氮和磷。氮和磷是制约藻类生长的限制因子。一般认为这两种营养元素诱发水体富营养化的浓度为:含氮量大于0.2~0.3 mg/L,含磷量大于0.01~0.02 mg/L。当这两种营养元素的浓度低于上述临界值时,藻类不会过度增殖而导致富营养化。

在自然水体中,氮、磷以多种形态存在。氮的主要存在形态有氮气、铵、亚硝酸盐、硝酸盐以及有机氮等。其中以溶解的无机氮(铵和硝酸盐)最易被藻类利用。磷的主要存在形态有正磷酸盐、聚合磷酸盐和有机磷等。其中溶解的正磷酸盐最易被吸收。在大多数内陆湖泊中,因有固氮蓝藻,磷常成为富营养化的限制因子;在海洋中,氮与磷的重要性相当。

生活污水、工业废水、农田径流均含氮和磷;经过二级处理的出水亦含有大量氮和磷。将这些污水排入水体,可为藻类提供充足的养料。一旦其他条件适宜,藻类便可旺盛繁殖。

2. 季节与水温 藻类是中温型微生物,因此在气温较高的夏季易发生藻类徒长。夏季的水体会产生分层(stratification),上层水暖比重小,下层水冷比重大。若无风,上下二层不会混层。这种情况尤以深水湖中为甚。由此导致水体上下层中藻类活动、营养状况及供氧状况不同。

3. 光照 充足的光照是藻类旺盛繁殖的必要条件。在水体中,上层光照较好而成为富光区,藻类的光合作用也相应较强,释放的氧气可使溶解氧量达到过饱和的程度。当上层藻类的生长密度较大时,光线不易透过,下层即成为弱光至无光区,藻类和其他异养菌主要进行呼吸作用,消耗大量的溶解氧而使下层水处于缺氧状态。

4. pH值 藻类生长的pH值范围为7~9。我国大多数湖泊的pH值均在7.5~9.0之间,因而易发生藻类的过度增殖。

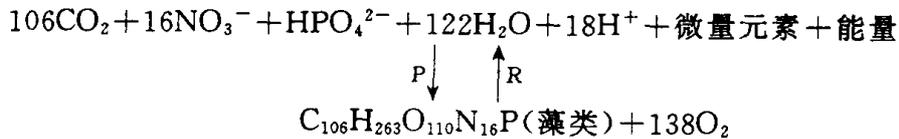
5. 其他生物的影响 水体中不存在其他拮抗性生物(如捕食性生物和藻体病原菌)时,有利于藻类增殖而发生富营养化症状。

四、水体富营养化的评价

水体富营养化的评价方法较多,如测定光合作用强度与呼吸作用强度之比、测定藻类生产潜力、测定光合作用产氧能力、测定水体透明度、测定氮和磷含量、测定叶绿素a含量等。这里只讨论前两种方法。

(一)光合作用强度与呼吸作用强度之比

光合作用是指水体中藻类的合成作用(简称为P),呼吸作用是指藻类的分解作用(简称为R)。其生物反应为:



P/R是评价水体健康与否的重用指标。在贫营养湖中,P/R=1,光合作用与呼吸作用达到平衡。它指示水体健康、无污染。在富营养化湖中,P/R变化较大。当水中氮和磷营养物充分,日暖光足时,藻类光合作用旺盛,P/R>1。当营养物逐渐减少,光照不足时,光合作用衰退,呼吸作用旺盛,P/R<1。

(二)藻类生产潜力

对于生产潜力的测定,欧美和日本等国制定了淡水及海水藻类培养试验的标准方法。这种方法是,在水样中接种特定藻类,置于一定光照度(4 000~6 000 lx)和温度(20℃)下培养,直至该藻生长稳定,然后测定干重(或细胞数),计算1L培养物的干重,即为该水样的藻类生产潜力(Algae Growth Potential,缩写为AGP)。接种的藻类通常是该水域中最占优势的藻种,如蓝藻、绿藻、硅藻等。

在日本,天然贫营养湖的AGP为1 mg/L,中营养湖为1~10 mg/L,富营养湖为5~50 mg/L。若排入经过二级处理的生活污水,AGP明显增加。

五、水体富营养化的危害

水体富营养化破坏了水体自然生态平衡,可导致一系列恶果。其危害主要有:

(1) 藻类大量繁殖,覆盖水面,影响景观。某些藻类产生红色素,繁殖后数天内使海水变成红色,使人感到一片萧条的景象。藻类过度繁殖会阻塞鱼鳃和贝类的进出水孔,影响它们的呼吸作用。

(2) 消耗溶解氧,致使水生生物大量死亡。在藻类进行呼吸作用以及藻类尸体被微生物分解的过程中,溶解氧被大量消耗,造成水体严重缺氧,使鱼、贝窒息而死。水产渔业蒙受严重的经济损失。

(3) 某些藻类体内及其代谢产物含有生物毒素,引起鱼、贝中毒病变或死亡。如链状膝沟藻(*Cyaulax catenella*)产生的石房蛤毒素是一种剧烈的神经毒素。

(4) 产生气味化合物,使水体散发不良气味。藻类以及厌氧菌的代谢活动可产生多种具气

味的化合物,如土臭味素(geosmin)、硫醇、吲哚、胺类、酮类等,使水体散发土腥味、霉腐味、鱼腥味等臭味。

5. 影响给水处理和饮用水质量。如果自来水厂以富营养化水体为水源,水中的藻体可堵塞滤池而影响生产;水中的毒素和气味物质也难以除尽,严重影响饮用水的质量。

六、水体富营养化的防治

要防止水体富营养化,首先,必须控制营养物质(主要是磷和氮)进入水体。要加强水体生态学管理,合理施肥,防止肥料进入河道。严格执法,禁止生活污水和工业废水的直接排放。对二级处理出水进行深度处理,以去除氮、磷营养物。其次,要控制藻类的生长。可使用化学杀藻剂,在藻类尚未大量滋生前,杀死藻体。也可使用生物杀藻剂,利用噬藻体(藻类的致病菌),杀死藻体。采用机械或强力通气使水层搅乱混合,也可收到显著的抑藻效果。

治理富营养化水体,可采取疏浚底泥,去除水草和藻类,引入低营养水稀释和实行人工曝气等措施。但这些措施所需的费用很大,时间也长。富营养化水体中含有丰富的营养物质,可设法利用。例如,在保证水中溶解氧量的条件下,饲养草食性或杂食性鱼类;引水灌溉;捞取水草做饲料和肥料;挖取水体底泥作肥料、燃料或沼气原料。

第三节 微生物代谢产物的污染

进入环境后,每种物质都会受一种或多种微生物的作用,并产生复杂多样的代谢中间体与终产物。在正常情况下,这些代谢产物不断产生,也不断转化,处于动态平衡之中。

然而,在特定条件下,有些代谢产物会大量积累,造成环境污染;有些代谢产物则是特殊的化合物,会对人类或其他生物产生不利的影晌;更有甚者,有些代谢产物属于致癌、致畸、致突变物质。上述各类代谢产物长时间、低剂量地作用于人群,对人体健康构成了严重的威胁。

一、生物毒素

自1888年发现白喉杆菌毒素以后,陆续发现了许多微生物毒素。细菌、真菌、藻类和放线菌均可产生毒素。

(一)细菌毒素

根据毒素的释放情况,可分为内毒素与外毒素。内毒素是微生物细胞的组分,通常为细胞壁的某一成分,只有当菌体裂解或融溶时才能释放。外毒素由微生物合成后,分泌到细胞外面。外毒素的毒力强于内毒素,但耐高温性不及内毒素。温度升至60℃以上时,外毒素遭到破坏。

在环境中,一般内毒素的危险不大,因为细菌内毒素只有在动物循环系统中释放时才产生毒效。相反,外毒素则对人类的危险很大。常见的外毒素有白喉毒素、破伤风毒素、气坏疽毒素、霍乱肠毒素、肉毒毒素、葡萄球菌肠毒素等。

肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*),革兰氏阳性,产芽孢,能运动,专性厌氧,能产生并分泌肉毒梭菌毒素。广泛存在于土壤、淤泥、粪便中。根据菌体的生化反应及其毒素的血清学反应,可将肉毒梭菌分为A型、B型、C型、D型、E型、F型和G型。其中,A型、B型、E型和F型能引起人体中毒,C型和D型引起动物中毒,G型对人和动物的致病性还不清楚。肉毒梭菌可侵染水果、蔬菜、鱼、肉、罐头、香肠等食品。在我国,多起肉毒中毒事故均由植物性食品(如臭豆腐、豆酱、豆豉等)中的肉毒梭菌所致。

肉毒梭菌的生长条件与产毒条件一致:厌氧;pH>4.5,最适pH5.5~8.0;温度5.0~42.5℃,因菌株而异;当环境含盐量高于10%时,该菌完全停止生长。肉毒梭菌毒素是已知毒素中毒性最强的一种毒素,属剧毒物。1 μg A型毒素即能使人致死,1 mg A型毒素则能毒死2 000万只小鼠。各型肉毒梭菌毒素对热敏感,在80℃、30 min或100℃、10~20 min的条件下完全丧失功能。

肉毒梭菌毒素是一种极强的神经毒素,主要作用于神经和肌肉的连接处及植物神经末梢,阻碍神经末梢乙酰胆碱的释放,导致肌肉收缩不全和肌肉麻醉。中毒致死率一般为20%~40%,最高可达76.2%。

(二)真菌毒素

真菌毒素(mycotoxin)是指以霉菌为主的真菌代谢活动所产生的毒素。早在15世纪就有麦角使人中毒的记载。直至今日,人畜食用霉变谷物而中毒的事件也时有发生。但是,只有在20世纪60年代末至70年代初先后发现岛青霉毒素及黄曲霉毒素的致癌性以后,真菌毒素才真正引起人们的重视。

真菌毒素致病有下列几个特点:①中毒常与食物有关,在可疑食物或饲料中经常检出产毒真菌及其毒素。②发病有季节性或地区性。③真菌毒素是小分子有机化合物,而不是高分子蛋白质,它在机体中不产生抗体,也不能免疫。④患者无传染性。⑤人和家畜家禽一次性大量摄入含有真菌毒素的食物和饲料,往往发生急性中毒;长期少量摄入则发生慢性中毒和致癌。

至今发现的真菌毒素达300种。其中,毒性较强的有黄曲霉毒素、棕曲霉毒素、黄绿青霉素、红色青霉毒素B、青霉酸等。能使动物致癌的有黄曲霉毒素B₁、黄曲霉毒素G₁、黄天精、环氯素、柄曲霉素、棒曲霉素、岛青霉毒素等。担子菌纲中的某些蘑菇含有胍及胍的衍生物,具有毒性,且可使小鼠等动物患肝癌或肺癌。

1960年,英国伦敦附近的某养鸡场,数月内发生了10万只火鸡相继死亡的事故。追踪调查获知,系食用污染了霉菌的花生粉所致;以后查明,一种黄曲霉菌产生的黄曲霉毒素导致了火鸡的中毒死亡。

黄曲霉毒素是剧毒物,也是致癌物。其毒性为氰化钾的10倍、砒霜的68倍。按照毒理学标准,半致死剂量(LD₅₀)<1 mg/kg的毒物属于特剧毒物。黄曲霉毒素B₁的半致死剂量为0.294 mg/kg,因此它是特剧毒物。此外,动物实验证明黄曲霉毒素还是强致癌物。它的主要靶器官为肝脏,亦可引起胃、肠、肾的病变。流行病学调查获知,凡是食物中黄曲霉污染严重、人体实际摄入量高的地区,其肝癌发病率均较高。

产生黄曲霉毒素的真菌主要为黄曲霉(*Aspergillus flavus*)和寄生曲霉(*Asp. parasiticus*)。黄曲霉中并非所有菌株都产毒素。但研究发现,产毒菌株的比例有上升的趋势,早期发现的产毒菌株约占10%,现在已升至60%以上。寄生曲霉中产毒菌株所占的比例为100%。黄曲霉可侵染粮谷、蔬菜、烟草、豆类、水果、乳品、肉类、干果等,其中尤以玉米、花生最为常见,大米、小米、高粱次之。

现已发现的黄曲霉毒素有B₁、B₂、G₁、G₂、B_{2a}、G_{2a}、M₁、M₂、P₁等。有17种黄曲霉毒素的化学结构已经确定。黄曲霉毒素可发出荧光。根据所发荧光颜色,可将黄曲霉毒素分为B族和G族。B族黄曲霉毒素发蓝紫色荧光,G族黄曲霉毒素发黄绿色荧光。在黄曲霉毒素中,B₁的毒性和致癌性最强。值得注意的是,在分离自花生和土壤的1626株黄曲霉中,90%菌株产生B₁,检出率很高。黄曲霉毒素B₁的结构如图9-1所示。

在真菌毒素中,黄曲霉毒素 B₁ 是最为稳定的一种。它耐高温,2 h 高压灭菌(121℃)仅破坏 1/3~1/4,4 小时破坏 1/2。抗紫外线。耐酸性和中性,但不耐碱性。在 pH 9~10 的碱性条件下,黄曲霉毒素 B₁ 迅速分解。次氯酸钠、氯气、NH₃、H₂O₂、SO₂ 等也可使之失效。

鉴于黄曲霉毒素的严重危害,许多国家制订了食品中允许的黄曲霉毒素含量标准,世界卫生组织 1966 年定为 30 μg/kg,1970 年降为 20 μg/kg,至 1975 年再降为 15 μg/kg。我国的标准是:玉米、花生油、花生及其制品不得超过 20 μg/kg;大米及其他食用油不得超过 10 μg/kg。其他粮食、豆类、发酵食品不得超过 5 μg/kg;婴儿代乳食品不得检出。

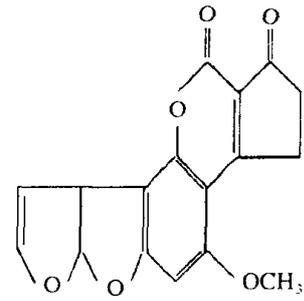


图 9-1 黄曲霉毒素 B₁ 的结构

(三)藻类毒素

甲藻是藻类中对人类威胁最大的藻种,它产生的毒素对人类剧毒。其毒性急,能在短期(2~12 h)内使人致死。但是,如果患者能活过 24 h,则能康复并不留后遗症。盐类、醇类可减弱藻类毒素的毒力,至今还没有找到有效的解药。藻类毒素可在贻贝及蛤体中积累,人食之即可中毒。赤潮发生时,贻贝将藻毒素积于内脏;赤潮过后,二周内积蓄的毒素即见消失;蛤将毒素积于呼吸管中,毒素稳定,赤潮过后一年仍未见消失。

有人从贻贝及蛤中提取获得纯的腰鞭毛虫毒素,后来又从链状膝沟藻(*Gonyaulax catenella*)培养物中获得此毒素,说明贝类的毒素来自甲藻。如果链状膝沟藻的含量超过 200 个/mL,食用该水中收获的贻贝易发生中毒。腰鞭毛虫毒素对小鼠的 LD₅₀为 10 μg/kg 体重(腹腔注射),人口服 1 mg 即被致死。该毒素溶于水,对热稳定,罐头加工中的杀菌处理只能破坏 70%。但是,由于在贝类体内毒素多积存于内脏,如果食用前将肝、胰腺等去除,可确保安全。

(四)放线菌毒素

某些放线菌的代谢产物可使人中毒,甚至引起肿瘤或致癌。洋橄榄霉素是肝链霉菌(*Streptomyces hepaticus*)的产物,毒性很强,可诱发肝、肾、胃、脑、胸腔等发生肿瘤。洋橄榄霉素的结构类似苏铁苷,故认为它的致癌作用也类似于苏铁苷。苏铁苷本身不具致癌性,但在动物肠道内被微生物水解后即成致癌物。

二、气味代谢物

气味是影响环境质量的重要因子。在环境污染中,它有早期预警的作用。闻到气味说明污染物可能已达有害浓度。供水系统的不良臭味是生物学家、公共卫生学家及水处理工程师共同关心的一个老问题。世界上有许多城镇以河流、湖泊、水渠、港口水为饮用水源,水源周期地产生不良气味给生活带来了诸多不便。气味物质不仅污染大气和水体,造成感官不悦,而且还可被水生生物吸收并蓄积于体内,影响水产品(如淡水鱼)的品质。

人们对生物来源的气味代谢物的化学本质进行了较为深入的研究,并取得了很大的进展。已从放线菌产生的土腥味物质中分离到土腥素(或土臭味素)。土腥素是一种透明的中性油,相对分子质量 182,嗅阈值极低(<0.2 mg/L)。具有土腥味的鱼肉中也可检出土腥素,鱼肉的味阈值为 0.6 μg/100g 鱼肉。另一种挥发性的樟脑/薄荷醇味(土霉味)物质被鉴定为 2-甲基-异茨醇。这种气味物质为白色固体结晶,分子式 C₁₁H₂₀O,相对分子质量 168,嗅阈值 0.1 mg/L。

其他引起环境污染的微生物气味代谢物有氨、胺、硫化氢、硫醇、(甲基)吡啶、粪臭素、脂肪

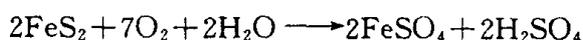
酸、醛、醇、脂等。

三、酸性矿水

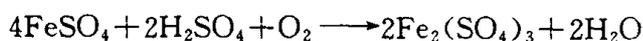
黄铁矿、斑铜矿等含有硫化铁。矿山开采后,矿床暴露于空气中。由于化学氧化作用,矿水酸化,pH降至4.5~2.5。在这种酸性条件下,只有耐酸微生物(如氧化硫硫杆菌和氧化硫亚铁杆菌)能够生存。氧化硫硫杆菌(*Thiobacillus thiooxidans*)能把硫氧化为硫酸,氧化亚铁亚铁杆菌(*Ferrobacillus ferroxidans*)则能把硫酸亚铁氧化为硫酸铁。经过这些细菌的作用,矿水酸化加剧,有时pH降到0.5。这种酸性矿水随雨水径流,或渗漏至地下,或顺河道下流,可破坏自然生物群落,毒害鱼类,影响人类生活。

矿水酸化以及耐酸细菌的作用过程为:

- ① 黄铁矿(FeS_2)经自然氧化(化学氧化)生成硫酸亚铁和硫酸



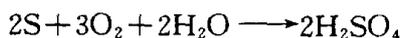
- ② 氧化硫亚铁杆菌与氧化亚铁亚铁杆菌将硫酸亚铁氧化为硫酸高铁



- ③ 强氧化剂硫酸高铁与黄铁矿作用,产生更多硫酸



- ④ 氧化硫杆菌将元素硫氧化为硫酸



四、甲基汞

在微生物的作用下,汞、砷、镉、碲、硒、锡和铅等重金属离子,均可被甲基化而生成毒性很强的甲基化合物。其中,给世人留下深刻印象的首推甲基汞化合物。震惊世界的日本水俣病以及瑞典马群的大量死亡,均为甲基汞中毒所致。从1953年到1960年,日本水俣湾的渔民先后有116人因食用含汞的鱼、贝而发生不可逆转的中毒,其中有43人死亡。他们都是氯乙烯工厂排放含汞污水的受害者。

在自然条件下,汞可发生非酶促甲基化和酶促甲基化。

1. 汞的非酶促甲基化 在中性水溶液中,以甲基钴胺素作为甲基供体,汞可被转化为甲基汞。这种转化是纯化学反应,能快速而定量地进行。在有氧和厌氧条件下,汞的甲基化均能顺利完成。

2. 汞的酶促甲基化 在自然界,除个别情况外,甲基汞都是在微生物的作用下形成的。微生物的作用可分为直接作用与间接作用。直接作用是指直接在微生物酶的催化下发生的甲基化过程。例如,一些微生物借助胞内的甲基转移酶,将甲基钴胺素上的甲基转移给汞离子而形成甲基汞。间接作用则是指在微生物体外发生的甲基化过程。例如,微生物将环境中的维生素 B_{12} (钴胺素)转化成甲基钴胺素,然后通过化学反应与汞合成甲基汞;或者微生物将环境中的锡转化成甲基锡,然后通过化学反应转移甲基,形成甲基汞。与甲基锡类似,甲基镉也可作为汞甲基化的甲基供体。

排入环境的汞大多为无机汞(元素汞和汞离子),经过微生物的甲基化作用后,形成的甲基汞毒性增强,使汞的危害大大加剧。

水体中酶促甲基化的速率受pH值的影响。在中性和碱性条件下,微生物的转化产物主要是二甲基汞。这种化合物不溶于水,易挥发而逸入大气。在弱酸性条件下,微生物的转化产物

主要是甲基汞,二甲基汞也易分解为甲基汞。甲基汞溶于水,可在水中长期滞留并被鱼、贝类水生生物吸收。实验室研究与野外调查都证实,酸性水域中捕获的鱼体含汞量较高,反之则低。

水体中酶促甲基化的速率也受通气的影响。虽然在厌氧及有氧条件下微生物均可进行甲基化作用,但在缺氧时,水体会产生大量硫化氢,汞与硫离子结合生成难溶的硫化汞,使汞的甲基化反应难以进行。在自然水体中,微生物的甲基化作用限于底泥表层,这与通气有关。如果污泥中有动物搅动,污泥层的甲基化区域可向下深入。

水体中酶促甲基化的速率还受微生物种类的影响。在含有 $10 \mu\text{g/mL}$ 氯化汞(相当于汞 $7 \mu\text{g/mL}$)的培养液中培养 60 h,匙形梭状芽孢杆菌可产生 $0.14 \mu\text{g/mL}$ 甲基汞(相当于汞 $0.13 \mu\text{g/mL}$),无机汞的转化率约为 2%。在另一种菌的培养液里,经过 44 h 转化, $2 \mu\text{g}$ 氯化汞只产生 6 ng 甲基汞,转化率仅为 0.3%。

在汞污染水域,鱼体内的汞主要以甲基汞的形态存在。关于鱼体内甲基汞的形成机理,有如下几种解释:① 鱼直接从水中吸收甲基汞;② 鱼从水中吸收无机汞,在鱼体内,细菌将其转化为甲基汞;③ 鱼从水中吸收无机汞,自身将无机汞转化成甲基汞;④ 细菌产生甲基汞,经食物链传递,鱼从食物中获得甲基汞。

第四节 微生物的风险评价

一、风险与风险评价的概念

风险(risk)是指不幸事件发生的可能性与其发生后可能造成的损害的乘积。不幸事件发生的可能性称为风险概率(P)或风险度;不幸事件发生后可能造成的损害称为风险后果(D);一个具体事件或事故(x)的风险(R)可表示为风险概率与风险后果的乘积。即

$$R(x) = P(x) \cdot D(x) \quad (9-1)$$

如果一个事件由 n 个独立的事件组合而成,则

$$R(x) = \sum_{i=1}^n P(x_i) \cdot D(x_i) \quad (9-2)$$

如果该事件连续作用,其发生概率与后果随 x 变化而变化,则

$$R(x) = \int_0^{\infty} P(x) \cdot D(x) dx \quad (9-3)$$

式中, $P(x)$ 表示单位时间内事件发生的次数; $D(x)$ 表示每次事件发生的后果。

环境风险是指由自然原因和人类活动引起的,可通过环境介质传播的,能对人类社会及自然环境产生破坏、损害乃至毁灭性作用的不幸事件发生的概率及其后果。按风险源,环境风险可分为化学风险、物理风险、生物风险以及自然灾害风险等。按承受风险的对象,环境风险可分为设施风险、人群风险以及生态风险等。

环境风险评价是对人类的各种开发行为所引发的或面临的环境风险进行评估,并据此进行管理和决策的过程。微生物风险评价起始于 20 世纪 80 年代,归入人群风险评价,是环境风险评价的重要组成部分。

二、风险评价基本内容

风险评价包括危害识别、暴露评价、暴露-反应关系评价和风险表征四个基本内容。

(一)危害识别

在一个特定的环境中,往往某一部分比其他部分更易出现危害,因此风险评价的第一步就是要把整个环境系统分解为若干个子系统,以确定危害的来源。危害识别的主要步骤是:① 确定危害性质(有毒有害物质引起中毒?病原菌感染?……);② 确定危害的来源(贮存罐?病房?……);③ 确定危害的成因(自然老损?人为破坏?……)。

(二)暴露评价

暴露评价包括两个方面:其一是分析污染物从污染源进入环境的迁移转化过程,以及它们在不同环境介质中的分布和归趋。其二是查明受体的暴露途径、暴露方式和暴露量。暴露评价的主要步骤是:① 污染物的环境过程分析(进入哪些环境介质?环境介质之间分配?迁移途径?转化方式?……);② 建立模式(物理模式或数学模式);③ 参数估算;④ 模型校验;⑤ 转归分析(利用源强资料和数学模型,分析污染物在环境中的转归过程和时空分布);⑥ 暴露途径分析(分析污染物与受体接触并进入受体的途径,食物?饮用水?……);⑦ 暴露方式分析(呼吸摄入?皮肤接触?从口而入?……)⑧ 暴露量计算(进入受体的污染物数量?被受体吸收并发生作用的污染物数量?……)。

(三)暴露-反应关系评价

暴露-反应关系评价主要研究不同暴露水平下,受体对危害因子的响应。其主要步骤是:① 资料调研(调查、收集与研究有关的暴露-反应资料,以利用现有资料或数据);② 方案设计和实施;③ 结果分析(剂量-反应、时间-剂量-反应);④ 外推分析(根据同类污染物的现有资料和外推关系进行外推;将实验室建立的关系外推到自然生态系统;将一种类型的试验结果外推到另一种类型,例如用生物个体的毒性试验结果外推到种群大小的变化)。

(四)风险表征

风险表征是将上述分析结果综合起来作出风险评价的过程。主要步骤有:① 确定表征方法(定性?定量?……);② 综合分析(风险大小);③ 不确定性分析(不确定的环节、不确定的性质、不确定性在评价过程中的传播……);④ 风险评价结果陈述。

三、微生物的风险评价

水源遭到严重污染时,周围地区易发生病原微生物所致的水介疾病的爆发流行。在这种情况下,污染物的剂量很高,受体的暴露明显,因果关系相对容易确定。但是,如果污染物的剂量很低,受体的暴露被掩蔽,流行病学上的因果关系就难以确定,甚至不可能确定。对于微生物的风险评价,至今没有正式的框架,但可参照其他风险评价的方法来操作。

(一)微生物危害的识别

微生物产生危害的方式较多,病原菌可以感染人和生物而致病;藻类和浮游生物可以疯长而造成水体富营养化;某些微生物还可以产生有毒代谢物污染环境,等等。为了讨论方便,这里只介绍病原菌的危害。

病原菌产生危害的过程也很复杂。对人和生物的危害程度取决于微生物的病原性、人和生物的感受性以及环境条件。人受某种病原菌感染后,可以没有临床症状(亚临床疾病),也可以表现临床症状(临床疾病),严重时则导致死亡。

亚临床疾病患者受病原菌感染,但不表现临床症状。亚临床感染的比例因病原菌而异。例如,脊髓灰质炎病毒侵染人体后,很少产生明显的临床症状,发展为临床疾病的比例低于1%。亚临床疾病是否恶化成临床疾病,与患者所感染的病原菌剂量无关,主要取决于病原菌毒株的

类型、患者的年龄和免疫力。

临床疾病患者受病原菌感染,且表现临床症状。临床感染与患者的年龄有关。例如,在患甲型肝炎的病例中,小于5岁的儿童的发病率约为5%,成年人为75%。免疫力是临床感染另一影响因素。对甲型肝炎病毒而言,患者获得的免疫力是终生的。

病原菌感染患者的最严重恶果是致死。肠道病原菌致死人命的病例时有发生。成年甲肝病毒感染者的死亡率通常高于儿童。免疫力弱的人群(如幼儿、老人、爱滋病患者)一般高于正常人群。

病原微生物的种类繁多,分布广泛,在风险评价中辨识微生物的危害决非易事。

(二)微生物的暴露评价

化学污染物从污染源进入环境的迁移转化过程相对稳定,它们在不同环境介质中的分布和归趋也有一定的规律可循,因此调查受体对化学污染物的暴露途径、暴露方式和暴露量相对容易着手。微生物的暴露评价要比化学污染物复杂得多。微生物产生的危害通常与其生命活动相关联。丧失生命,它们的危害也随之停止。但是,微生物能够生长繁殖,作为特殊的污染物,它们会不断扩增放大。例如,某人饮用受病原菌污染的饮水后,本人会被感染患病;在患者体内,病原菌大量增殖,又可通过人与人之间的接触或通过受污染物品(如玩具、餐具、洁具等)的接触而传染其他人。这种现象称为二次侵染。二次侵染是水介疾病爆发流行和加剧的重要原因。此外,微生物的感染剂量难以确定。虽然有人对志愿者作了肠道微生物的感染剂量试验,但资料依然不足。由于病原菌感染的专一性(有些病原菌以人体为惟一寄主),动物试验中得到的感染剂量很难外推至人类。

(三)微生物的暴露-反应关系评价

要准确地评价微生物产生的风险,选择合理的剂量-反应模型是极为重要的。在评价人类受肠道微生物感染的可能性时,常用 β -Poisson模型(式9-4)来计算。

$$P(x) = 1 - \left(1 + \frac{N}{\beta}\right)^{-\alpha} \quad (9-4)$$

式中, $P(x)$ 表示一次暴露后发生微生物感染的风险概率; N 表示每次暴露受体摄入微生物的数量; α 、 β 表示宿主与微生物相互作用的特征参数。通过人体试验获得的一些肠道水介传染病病原菌的 α 和 β 值见表9-1。

表9-1 肠道病原菌的剂量-反应模型与参数

微生物	模型	模型参数
艾可病毒群 12	β -Poisson 模型	$\alpha = 0.374$ $\beta = 186.69$
轮状病毒	β -Poisson 模型	$\alpha = 0.26$ $\beta = 0.42$
脊髓灰质炎病毒 1	指数模型	$r = 0.009102$
脊髓灰质炎病毒 1	β -Poisson 模型	$\alpha = 0.1097$ $\beta = 1524$
脊髓灰质炎病毒 3	β -Poisson 模型	$\alpha = 0.409$ $\beta = 0.788$
隐孢子虫	指数模型	$r = 0.004191$
兰伯氏贾第虫	指数模型	$r = 0.02$
沙门氏菌	指数模型	$R = 0.00752$
大肠杆菌	β -Poisson 模型	$\alpha = 0.1705$ $\beta = 1.6 \times 10^6$

对于某些微生物,选用指数模型(式 9-5)来计算风险概率更为合适。

$$P(x) = 1 - \exp(-rN) \quad (9-5)$$

式中, $P(x)$ 表示一次暴露后发生微生物感染的风险概率; r 表示在受体摄入的微生物中存活并发生感染的微生物分数。模型参数 r 值见表 9-1。

假设每天所暴露的病毒浓度恒定,一次暴露后发生感染的风险概率服从 Poisson 分布,则年度感染风险和终生感染风险分别可用式 9-6 和式 9-7 计算。

$$P_A = 1 - [1 - P(x)]^{365} \quad (9-6)$$

$$P_L = 1 - [1 - P(x)]^{25550} \quad (9-7)$$

式中, P_A 表示发生微生物感染的年度风险(365 天); P_L 表示发生微生物感染的终生风险(假设寿命为 70 年,共 25 550 天)。

感染并患临床疾病以及感染致死的风险分别可用式 9-8 和式 9-9 计算。

$$P_I = P(x)I \quad (9-8)$$

$$P_M = P(x)IM \quad (9-9)$$

式中, P_I 表示发生微生物感染并患临床疾病的风险概率; P_M 表示发生微生物感染并致死的风险概率; I 表示微生物感染后产生临床疾病的百分率; M 表示微生物感染后引起死亡的百分率。

应用上述模型,可以估计不同感染剂量下发生微生物感染、临床疾病乃至死亡的风险。表 9-2 列举了不同感染剂量下轮状病毒发生感染、临床疾病乃至死亡的风险。假设 100 L 饮用水中含有一个轮状病毒,每人每天饮用 2 L 水,每天饮水者被轮状病毒感染的风险为 1.2×10^{-3} (表 9-2),也即每天 1 000 人中约有 1 人被这种病毒感染。如果按年计,感染的风险增大到 3.6×10^{-1} (表 9-2),也即每年 3 人就可能有 1 人被感染。发生临床疾病的年度风险已不容忽视。由该例可见,长期接触低剂量的病原菌,被感染致病的风险是相当大的。

表 9-2 轮状病毒引发感染、疾病乃至死亡的风险

每百升中的病毒数量	风险	
	每天	年度
	感染	
1000	9.6×10^{-2}	1.0
10	1.2×10^{-3}	3.6×10^{-1}
1	1.2×10^{-4}	4.4×10^{-2}
	疾病	
1000	5.3×10^{-2}	5.3×10^{-1}
10	6.6×10^{-4}	2.0×10^{-1}
1	6.6×10^{-5}	2.5×10^{-2}
	死亡	
1000	5.3×10^{-5}	5.3×10^{-5}
10	6.6×10^{-8}	2.0×10^{-5}
1	6.6×10^{-9}	2.5×10^{-6}

美国环保局最近建议,水厂应把饮用水的年度感染风险降低到 1/10 000 以下(10 000 人中少于 1 人被感染)。按此标准,饮用水中的病毒浓度必须控制在 1 个/kL 以下(表 9-2)。如果水源中的肠病毒浓度为 1 400 个/kL,水厂的病毒去除率应高于 99.99%。

(四) 案例分析

众所周知,摄食生的甚至熟的蛤和牡蛎,可使消费者患传染性肝炎和病毒性胃肠炎。从某水域收获的蛤中,艾可病毒群 12 的浓度为 8 PFU(plaque-forming units)/100g 蛤肉。如果人们进食这种蛤肉,每人消费 60 g(一餐),那么他们受艾可病毒群 12 感染而得病的风险有多大?

解:60 g 蛤中的艾可病毒群 12 的数量(N)为

$$\begin{aligned}8 \text{ PFU} / 100\text{g} &= N / 60\text{g} \\ N &= 8 \times 60 / 100 = 4.8 \text{ PFU}\end{aligned}$$

查表 9-1 可知, $\alpha = 0.374$, $\beta = 186.69$ 。由 β -Poisson 模型(式 9-4)求得被感染的可能性为

$$\begin{aligned}P(x) &= 1 - \left(1 + \frac{N}{\beta}\right)^{-\alpha} \\ &= 1 - \left(1 + \frac{4.8}{186.69}\right)^{-0.374} \\ &= 9.4 \times 10^{-3}\end{aligned}$$

假设该病毒感染导致临床疾病的百分率(I)为 50%,根据式 9-8 求得食蛤发生临床疾病的风险(P_I)为

$$\begin{aligned}P_I &= P(x)I \\ &= 9.4 \times 10^{-3} \times 50\% \\ &= 4.7 \times 10^{-3}\end{aligned}$$

假设该病毒感染的病死率(M)为 0.001%,则死亡风险(P_M)为

$$\begin{aligned}P_M &= P(x)IM \\ &= 9.4 \times 10^{-3} \times 50\% \times 0.001\% \\ &= 4.7 \times 10^{-8}\end{aligned}$$

如果每人每天进食 1 次蛤肉,每次消费 60 g($N = 4.8$ PFU),则由式 9-6 求得食蛤肉引发临床疾病的年度风险(P_A)为

$$\begin{aligned}P_A &= 1 - [1 - P(x)]^{365} \\ &= 1 - (1 - 9.4 \times 10^{-3})^{365} \\ &= 0.97\end{aligned}$$

复习思考题

1. 简述大气微生物污染的特点及其防治措施。
2. 什么是水体微生物污染? 引起水体微生物污染的常见的病原菌有哪些?
3. 什么是土壤微生物污染? 土壤病原体危害人类的主要途径有哪些?
4. 简述水体富营养化的形成原因、种群特点以及评价方法。
5. 简述水体富营养化的危害与防治措施。
6. 生物毒素有哪些类型? 试举例说明其危害。
7. 简述酸性矿水的成因和危害。
8. 试以病原菌的危害为例,说明微生物的风险评价过程。

第十章 污染环境的微生物净化与修复

在人类的生活和生产活动中,不断有废弃物输入环境。进入环境后,它们会引起环境质量下降而有害于人类与其他生物的正常生存和发展,即环境污染。这些引起环境污染的物质,称为污染物。按污染物的性质,可分为化学污染物、物理污染物和生物污染物。化学污染物又可分为无机污染物和有机污染物。有机污染物进入环境后,经过生物降解和生物转化作用,会分解成无害物质,但也可能转变成新的危害更大的污染物。

本章着重介绍有机污染物的微生物降解与转化规律,以及微生物在环境自净和环境修复中的作用。

第一节 有机污染物的微生物降解与转化

生物降解是指微生物对有机物的破坏或矿化作用。生物降解的研究内容主要包括生物的降解能力、有机物降解的难易程度以及有机物的降解途径等。生物转化则是指各种有机物通过生物的吸收和代谢而改变形态或转变成另一种物质的过程。研究污染物的生物降解和生物转化作用,对阐明污染物的环境行为和污染趋势具有十分重要的作用。

一、微生物降解的潜力

按来源,有机污染物可分为天然有机污染物和人工合成有机污染物。前者是指由生物体的代谢活动以及其他生物化学过程产生的有机物质,后者则是指现代化学工业合成的有机物质。许多天然有机物原本是生产中的有用物质,有的甚至是人和生物必需的营养元素。这些有机物如果不充分利用或者不回收重复利用,进入环境就可能成为污染物。这些有机物是否成为污染物,取决于它们在特定环境中的数量(或浓度)和滞留时间。如果某种物质的数量(或浓度)低于某个水平(如低于环境标准容许值或不超过环境自净能力)或存在时间非常短暂,它就不会造成环境污染。天然有机物在环境中的数量和存在时间固然与“上游”的排放有关,但也与“下游”的微生物降解有关。经过漫长的进化和发展过程,地球上的微生物已成为种类繁多、数量巨大、代谢多样、分布广泛的生物群体。对于天然有机物,几乎每种物质都有相应的降解菌,因而都能被生物降解或转化。

人工合成有机物(以下简称人工有机物)的种类很多,产量巨大,且飞速增长。据统计,1930年全球生产的人工化合物约10万吨,1950年增至7百万吨,1970年增至6千多万吨,1985年增至2.5亿吨,至今已达5亿吨。1990年美国化学文摘登记的人工化合物达1千万种,并以每周6千种的速度增加。这些人工化合物大部分是有机物,涉及塑料、合成纤维、合成橡胶、洗涤剂、染料、溶剂、涂料、农药、食品添加剂、药品等行业。种类如此之多,数量如此之巨的人工有机物,最终都以各种各样的形式进入环境,对全球环境产生了巨大的冲击。

与悠久的生物进化史相比,人工有机物面世的时间极其短暂。对于这些自然界的“不速之客”,微生物还来不及“认识”而显得“陌生”,但微生物“正学着对付”它们。由于微生物抗逆性强,个体微小,繁殖迅速,结构简单,容易变异,适应人工有机物的能力大大强于其他生物。当有新的化合物进入环境时,微生物能通过突变形成新的变种;或通过诱导合成新的酶系来适应这些物质。值得一提的是,许多微生物含有降解性质粒,能够降解人工有机物。降解性质粒在微生物种群内和种群间传递,可大大加速人工有机物的降解和转化。

对于污染物,人们最关心的是它们对人类的危害。根据对人体的危害,有机污染物可分为无毒有机污染物和有毒有机污染物(简称有机毒物)。有机毒物又可分为可生物降解的有机毒物和难生物降解的有机毒物。对于可生物降解的有机毒物(如酚、氰等),它们可被微生物降解,最终成为简单的无机物质,毒性也会因此而消失。对于难生物降解的有机毒物(如有机氯、有机汞等),由于它们的化学性质稳定,很难被微生物分解,因而在环境中的持续时间很长,称为持久性污染物。持久性有机毒物对人类的危害极大,即使它们在环境中的数量很少,也可能经过生物浓缩、生物积累和生物放大作用,对人体健康构成威胁和危害。

许多人工有机物是持久性有机毒物。它们源源不断地进入环境,对人类的生存和发展提出了空前严重的挑战。研究并开发微生物对这类有机污染物的降解与转化潜能,是环境微生物学工作者义不容辞的责任,也是环境微生物学工作者不懈追求的目标。

二、工程菌的构建

对于一些难降解有机污染物,微生物是通过一系列酶促反应而降解的。在自然界,这些酶促反应分别由几种微生物协同完成,不但降解速率很慢,而且极易导致中间产物的积累。如何使只有部分代谢功能的菌株变成具有全部代谢功能的菌株(也即构建工程菌),来扩大生物降解的污染物范围和提高生物降解的效率,就成了消除持久性有机污染物的突破口。

(一)质粒分子育种

降解性质粒是一类编码某些有机化合物代谢途径的质粒。通过接合、转化或转导,降解性质粒可由一个菌株转移至另一个菌株,使后者获得降解某种有机化合物的能力。目前常用的质粒转移方法,是细菌细胞之间的接合。为了消除海上溢油污染,1972年美国 Chakrabarty 等人将假单胞菌不同菌株的 CAM、OCT、XAL 和 NAH 四种降解性质粒,通过接合转移至一个菌株中,构建了一株能同时降解芳香烃、多环芳烃、萜烃和脂肪烃的“多质粒超级菌株”(图 10-1)。应用该工程菌消除浮油,使天然菌需要花费一年以上的除油时间,缩短至几小时。

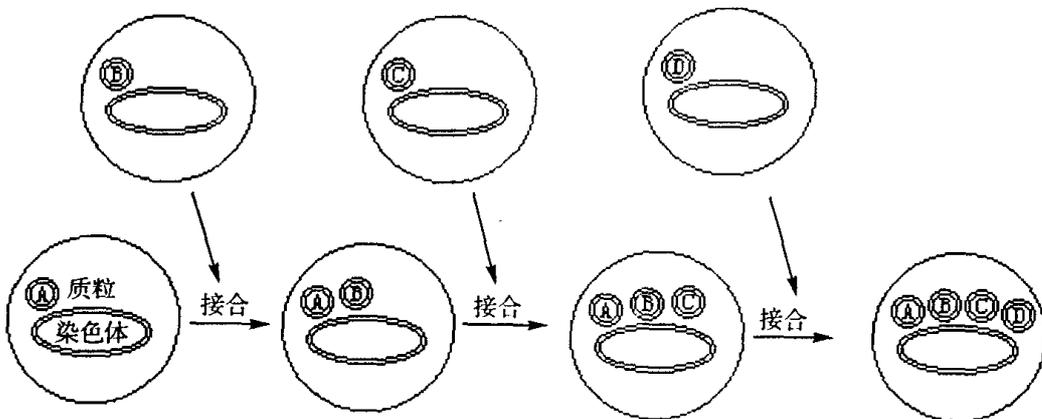


图 10-1 构建多质粒降解菌模式图

质粒分子育种(plasid-assisted molecular breeding, 简称为 PAMB)是美国 Chakrabarty 等人提出的一种培育新功能菌株的方法。在施加选择性压力的条件下,将多种微生物置于恒化器中长期混合培养,通过微生物之间质粒的自然传递,使某些菌株获得外来降解性质粒而具有新的代谢功能。2,4,5-T 是一种除草剂,虽然它已问世 40 多年,但一直未能从自然界分离获得以它为惟一碳源和能源的降解菌株。为了培育 2,4,5-T 降解菌,Chakrabarty 等人从堆放有毒废物垃圾的地方取样,分离菌种并将它们接种至恒化器中,与带有 CAM、TOL、SAL、pAC21、pAC25 和 pAC31 等降解性质粒的一些恶臭假单胞菌混合培养。试验开始时,在培养基中加入低浓度的 2,4,5-T(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和较高浓度的甲基苯甲酸盐、水杨酸盐、氯代苯甲酸盐(250 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。连续培养两周后,逐步提高 2,4,5-T 浓度,降低苯甲酸盐等成分浓度。至培养 7 个月时,只加 2,4,5-T(500 $\mu\text{g}/\text{mL}$),停加其他碳源基质。继续培养两个月后,培养液中出现 7~8 种菌落特征不同的细菌,其混合培养物能以 2,4,5-T 作为惟一碳源和能源。采用更高浓度的 2,4,5-T 培养后,菌落类型减少至 3~4 种。再经两个月的培养,从中分离获得了一株能以 2,4,5-T 为惟一碳源和能源的培养物。经鉴定,该菌属于洋葱假单胞菌,命名为 AC1100。试验证明,菌株 AC1100 的降解功能是由质粒控制的。单独以 2,4,5-T 为碳源对同样的菌株进行长期富集培养,则未能获得以 2,4,5-T 为惟一碳源的降解菌。这一事实证明,必须借助质粒分子育种技术才能培育具备该功能的新菌株。

(二)基因工程育种

基因工程是指把外源 DNA,通过具有复制能力的载体分子(如质粒、噬菌体、病毒等)形成重组 DNA 分子,导入到不具有这种重组分子的受体细胞内,进行持久稳定的复制和表达,使受体产生新的生物性状的操作过程。基因工程的主要操作步骤如图 10-2 所示。

1. 基因分离 要进行基因的人工重组和转移,必须获得纯化的完整基因。获得纯化基因的方法有三种:① 基因提取,即用物理、化学和生物学方法直接从供体细胞中分离提取所需的目的基因;② 酶促合成,以 mRNA 为模板用反转录酶合成相应的 DNA(基因);③ 化学合成,以单核苷酸为原料经化学反应合成基因。

2. DNA 体外重组 获得供体 DNA 和载体后,选用适宜的限制性内切酶对供体 DNA 和载体质粒(或病毒、噬菌体)进行剪切,使两者在切口部分形成粘性末端;然后在 5~6°C 的低温条件下,将它们混合(即“退火”),使两者的粘性末端通过氢键自动靠拢;最后在外加 DNA 连接酶的作用下,使供体 DNA 片段和质粒 DNA 片段“缝合”起来,形成一个完整的具有复制能力的“杂种质粒”。

3. 载体传递 将带有供体基因并具有复制能力的“杂种质粒”通过转化或转导引入受体细胞。受体细胞一般是经过筛选的限制-修饰系统缺陷的变异株,即不含限制性内切酶和甲基化酶的突变株,以免破坏引进的供体 DNA。

4. 复制与表达 在理想条件下,“杂种质粒”进入受体细胞后,能通过自我复制而扩增,并使供体基因所固有的遗传性状在受体细胞中表达。

5. 筛选与繁殖 目前的 DNA 分离技术还难以获得纯基因,“杂种质粒”的性状以及该质粒在受体细胞内的复制和表达也不一定满足人们的要求,因此必须从大量的个体中筛选具有目标性状的个体,再加以繁殖利用。

研究证明,在气杆菌(*Aerobacter*)和氢单胞菌(*Hydrogenomonas*)的协同作用下,农药 DDT 可被降解为氯苯乙酸,而氯苯乙酸降解菌易从土壤中分离获得,据此,Pemberton 提出了利用上述三个菌株构建 DDT 全代谢降解菌的设想。如果取得成功,就会有自然界不存在的新菌株问世。

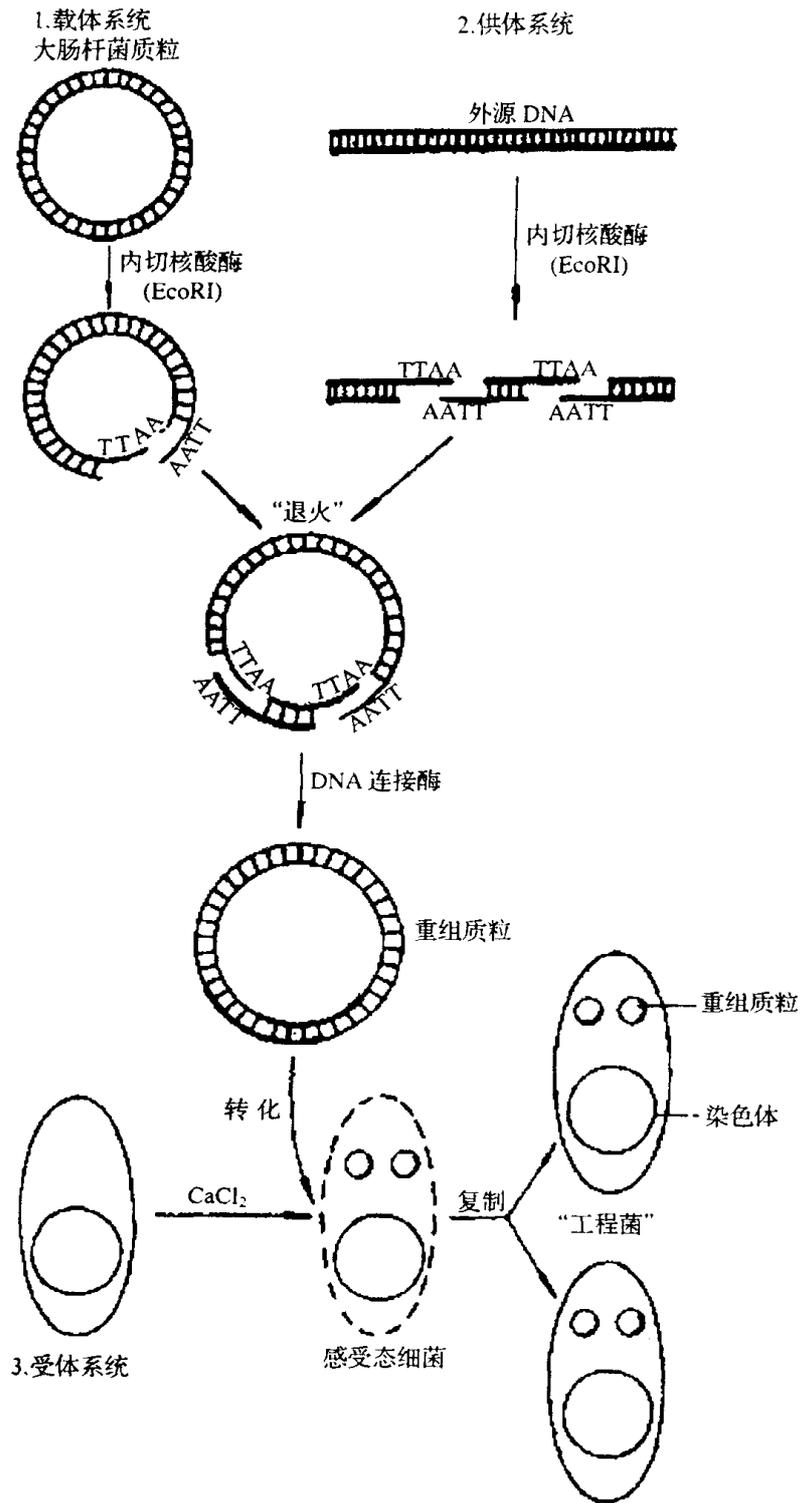


图 10-2 基因工程操作示意图

具有新功能的工程菌的不断构建和逐渐应用,将大大提高微生物对有机污染物的降解潜力。

三、有机污染物的可生物降解性

已知的环境污染物高达上百万种,其中多数是有机污染物。这些有机污染物虽可经光分

解、化学分解与生物分解等多种途径破坏,但主要是生物降解。因此,可生物降解性在很大程度上决定了有机污染物在环境中的命运和归宿。

(一)可生物降解性(biodegradability)

可生物降解性是指在微生物作用下大分子有机物转变成小分子化合物的可能性。如果将该有机物彻底分解,最终转化成二氧化碳和水,则称为终极降解(ultimate biodegradation)。

根据微生物的降解能力,有机污染物可分为:① 可生物降解性物质,如单糖、蛋白质、淀粉等;② 难生物降解性物质,如纤维素、农药、烃类等;③ 不可生物降解性物质,如塑料、尼龙等。

(二)可生物降解性的评定

评定有机污染物可生物降解性的方法较多,这里仅介绍常用的三种。

1. 按基质性质指标评定 测定有机污染物的综合性质指标(如 BOD_5 , COD , VS , TS 等),并用 BOD_5/COD 和 VS/TS 的比值来评定某种有机污染物的可生物降解性。以 BOD_5/COD 比值评定有机污染物可生物降解性的参考数据见表 10-1。

表 10-1 BOD_5/COD 比与生物分解速率的关系

BOD_5/COD	>0.4	0.4~0.3	0.3~0.2	<0.2
生物分解速率	较快	一般	较慢	很慢

2. 按基质可生物氧化率评定 以基质(待测的有机污染物)微生物分解的需氧量为分子,以同一基质彻底氧化的理论需氧量为分母所得的比值,称为该基质的可生物氧化率,可用公式表示为:

$$\text{可生物氧化率} = \frac{\text{基质微生物分解的需氧量}}{\text{基质彻底氧化的理论需氧量}} \times 100\% \quad (10-1)$$

在实验室中,基质微生物分解的耗氧量常用瓦氏(Warburg,亦称华氏)呼吸仪测定。瓦氏呼吸仪是一种精密的气体测量仪,包括定容的反应瓶及测压计两个主要部件。将基质置于反应瓶中,经过微生物的呼吸作用,气体体积会发生改变,通过测压计测出释放的二氧化碳的数量或消耗的氧气的数量,便可查知这种基质的可生物降解性。

3. 按基质生化呼吸线评定 基质生化呼吸线也称基质耗氧线,是指微生物分解基质的耗氧量随时间的变化曲线。为了评价基质的可生物降解性,需将基质生化呼吸线与内源呼吸线进行比较。内源呼吸线是在无外源基质的条件下,微生物内源呼吸的耗氧量随时间的变化曲线。由于内源呼吸中微生物的耗氧速率恒定不变,因此内源呼吸线通常为直线。将基质呼吸线与内源呼吸线进行比较,可以出现三种情况(图 10-3)。

第一种情况是基质呼吸线位于内源呼吸线之上,说明该基质可被生物降解。基质呼吸线的斜率愈大,降解愈快。在 t 时间内,基质呼吸线的斜率逐渐减小,至 A 点后基本上与内源呼吸线平行,说明此时基质的分解已近完成,微生物进入内源呼吸期。

第二种情况是基质呼吸线与内源呼吸线几乎重叠,说明该基质不可被微生物降解;因为微生物只进行内源呼吸,没有利用基质。

第三种情况是基质呼吸线位于内源呼吸线以下,说明该基质不仅难以被微生物降解,而且对微生物具有毒性,致使内源呼吸减弱。

(三)可生物降解性与化学结构的关系

有机污染物生物降解的难易程度不仅与生物特性有关,同时也与有机污染物的特性有关。

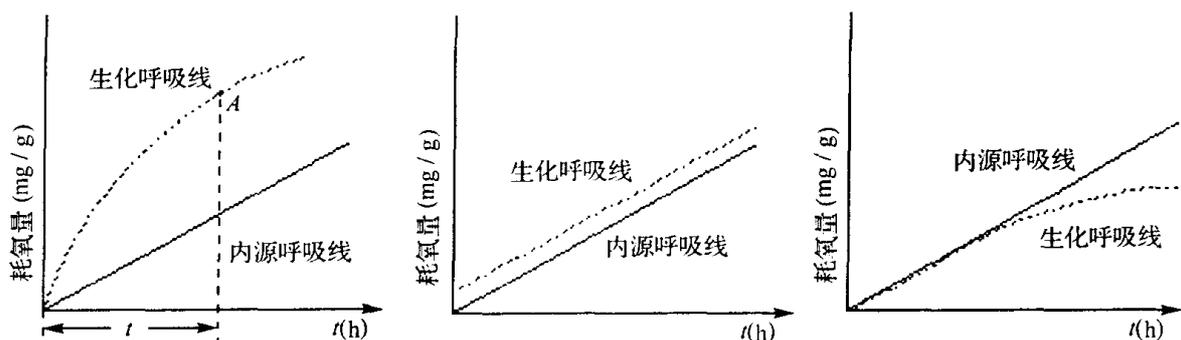


图 10-3 生化呼吸线与内源呼吸线的比较

有机污染物化学结构的复杂程度、基团的性质与位置,都可影响微生物的酶促反应。研究证明一般具有如下规律:

① 对于烃类化合物,一般链烃比环烃易降解,直链烃比支链烃易降解,不饱和烃比饱和烃易降解。

② 当有机化合物主要分子链上的碳被其他元素取代时,对生物降解的阻抗性加强,其中以氧的影响最为显著(醚很难被生物降解),其次为硫和氮。

③ 每个碳原子上至少保持一个氢碳键的有机物,其支链对生物降解的阻抗较弱。相反,当碳原子上的氢全部被烷基或芳基取代时,就会产生很强的阻抗作用。

④ 相对分子质量的大小是影响有机物生物降解的重要因素。对聚合和复合而成的高分子化合物,由于微生物及其酶系统不能触及化合物的内部,袭击其敏感的化学键,可生物降解性降低。

⑤ 官能团的性质、多少以及有机物的同分异构作用,对可生物降解性影响很大。当苯环上的氢被羟基或氨基取代而形成酸和苯胺时,可生物降解性提高。卤代作用则降低苯的可生物降解性。伯、仲醇易被微生物降解,而叔醇却对生物降解有很强的阻抗作用。

⑥ 有机化合物与其他成分混合,可改变生物降解的性能。很多不饱和有机物,可发生聚合作用而降低生物降解性能。两种或两种以上的化合物形成的复合物,也可降低生物降解性能。

四、几种典型有机污染物的微生物降解

(一) 苯与烷基苯类化合物

苯与烷基苯类化合物(如甲苯、乙苯、二甲苯)主要来源于石油产品。由于它们是天然有机物,因此一般可被微生物降解。

1. 好氧微生物降解 在好氧条件下,通过单加氧酶或双加氧酶的羟化作用,苯转化成邻苯二酚;接着通过间位或邻位途径,邻苯二酚环开裂形成有机酸;随后的氧化过程与脂肪族化合物的降解类同,最终进入 TCA 循环,彻底分解为二氧化碳和水(图 10-4)。

烷基苯类化合物的好氧生物降解可能有两种途径:一种是先进行苯环氧化,形成烷基邻苯二酚;再进行苯环开裂,由烷基邻苯二酚形成有机酸。另一种是先发生烷基的氧化反应,形成芳香醇类;接着进行苯环氧化,形成二羟基芳香醇类;再进行苯环开裂。是由烷基还是由苯环开始氧化,取决于细菌种类。大多数细菌将烷基苯氧化为烷基邻苯二酚。

苯环的开裂有两种不同的途径,即邻位开环和间位开环。邻位开环发生在邻苯二酚的两个羟基之间,而间位开环则发生在邻苯二酚的两个羟基之外(某个羟基的邻位)。间位开环的断裂

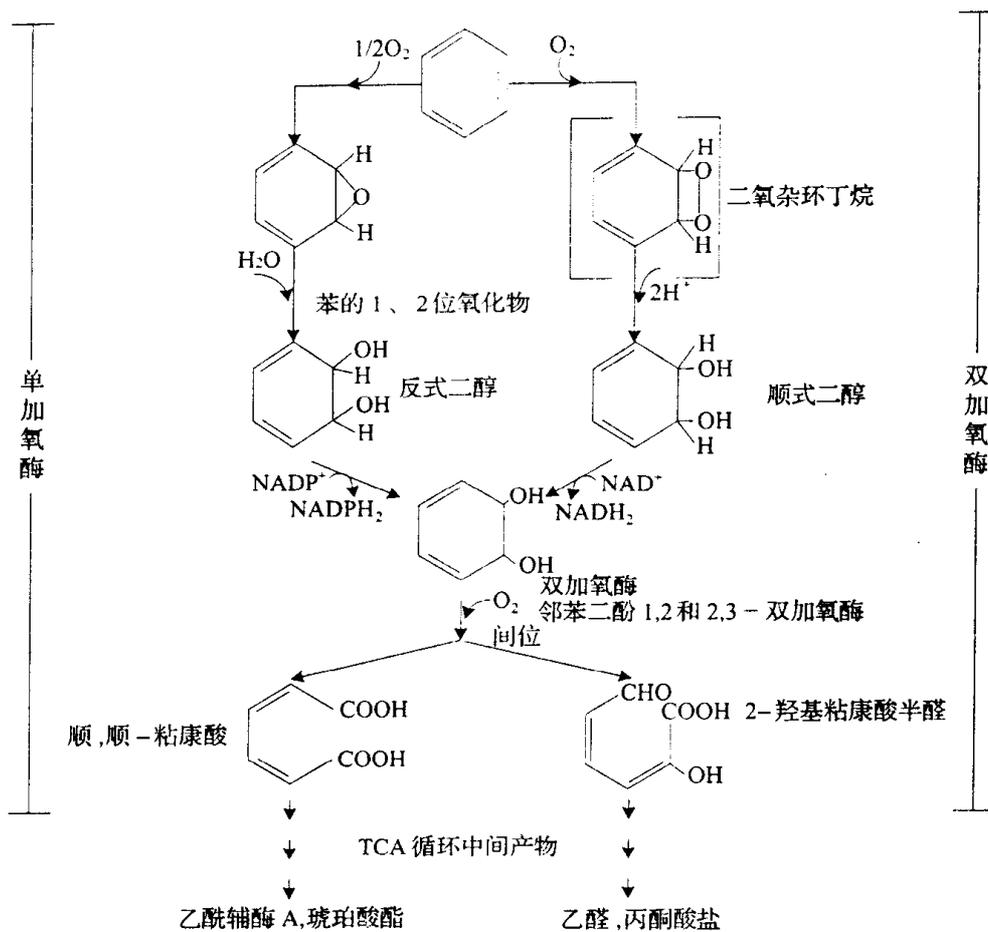


图 10-4 苯的微生物降解途径

点可以在远离烷基的一端,也可以在邻近烷基的一端。开环方式与芳香烃种类、细菌种类及其酶合成的诱导方式有关。同一细菌常常可以分别进行两种不同的开环反应。例如,由某种基质诱导产生的邻苯二酚 1,2-双加氧酶,能以 3-甲基、4-甲基或 3-异丙基邻苯二酚为底物。这对难降解化合物的生物分解十分有利。

经过邻位开环或间位开环,邻苯二酚或烷基邻苯二酚转化为有机酸,裂解产物再转化为三羧酸循环的中间产物。在邻位开环途径中,邻苯二酚通过 3-己二酮酸形成琥珀酸和乙酰 CoA (图 10-4);在间位开环途径中,则形成丙酮酸和乙醛。烷基邻苯二酚(如 3-甲基邻苯二酚和 4-甲基邻苯二酚)分别生成乙酸和甲酸。含对位羟基的芳香化合物(如 2,5-二羟基苯甲酸),开环位置在羟基和羧基之间,形成富马酸和丙酮酸。

2. 厌氧生物降解 在厌氧生境中,微生物分别能进行硫酸盐还原、硝酸盐还原以及产甲烷反应。苯及烷基苯类化合物可与这些反应相偶联,进行厌氧转化与降解,最后被部分矿化或完全矿化。在产甲烷混合培养物中,苯转化为苯酚,而甲苯转化

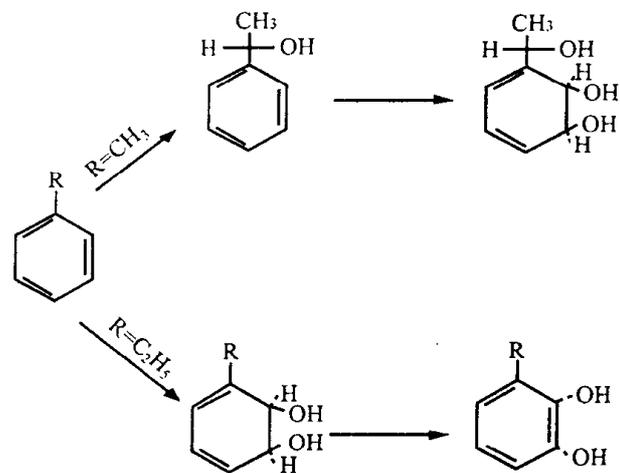


图 10-5 甲苯和乙苯的厌氧生物降解

为对-甲酚、邻-甲酚、苯甲醇或苯甲酸。苯及烷基苯的厌氧降解见图 10-5。

(二) 多环芳烃

多环芳烃(PAH)是指两个以上苯环连在一起的有机化合物。常见的多环芳烃污染物有联苯、萘、蒽、菲、芘、茚、苯并[a]芘等,具有不同程度的“三致”作用。

在各种酶的混合作用下,多环芳烃转化成环氧化物、二氢二醇环氧化物、二氢二羟基环氧化物、酚、醌、葡糖苷、葡糖苷酸等。其代谢途径见图 10-6。

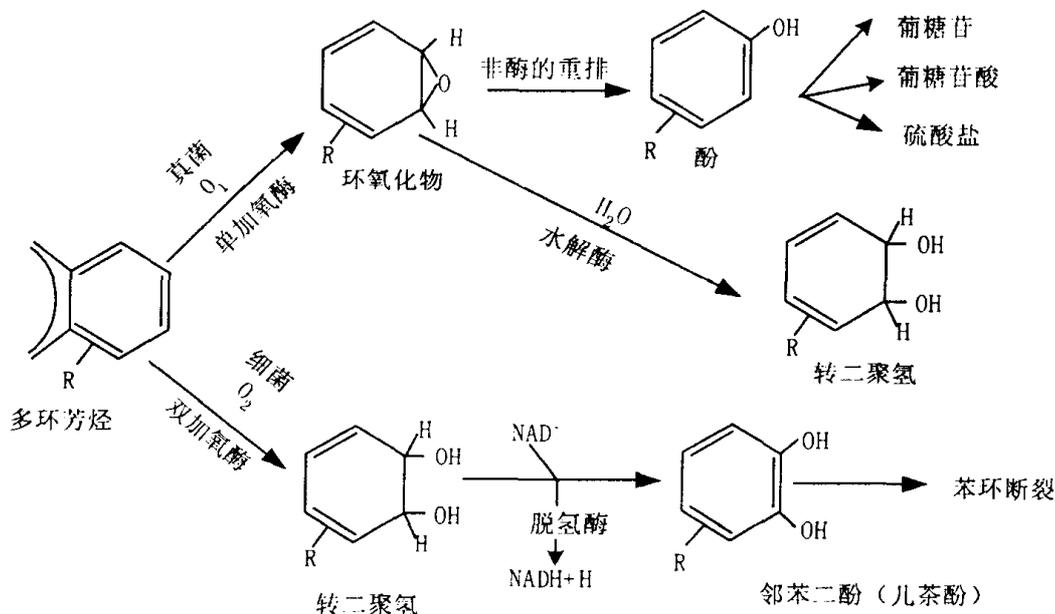


图 10-6 PAHs 的代谢途径

下面以萘为代表来介绍微生物的降解情况。自 1964 年以来,已分离得到许多以萘为唯一碳源的细菌培养物。萘的微生物降解途径见图 10-7。先通过双加氧酶,产生顺 1,2-二羟基-1,2-二氢萘、1,2-二羟基萘、邻苯二酚;然后再通过间位开环而实现矿化。

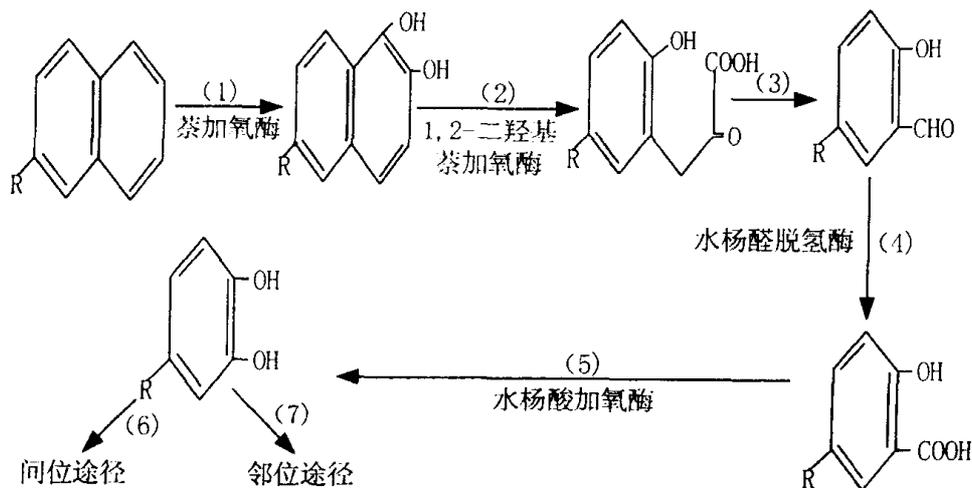


图 10-7 恶臭假单胞菌对萘的代谢过程及有关酶

(1)~(4)反应由质粒控制,从(5)反应开始由染色体控制

红球菌属和假单胞菌属的一些菌株,先将萘转化为龙胆酸(2,5-二羟基苯甲酸),再开环继

续进行分解。真菌则通过共代谢、胞外木质素酶或过氧化物酶来降解萘。

在硫酸盐还原、硝酸盐还原或产甲烷的条件下,萘可被经过驯化的厌氧富集培养物降解。但降解途径尚不清楚。

(三) 氯代芳烃

氯代芳烃种类繁多,广泛用作化工原料、中间体及有机溶剂,诸如氯代苯、氯代苯酚、氯代苯胺及多氯代二噁英等。它们以多种渠道进入环境。微生物的降解与转化是这类污染物在环境中的重要转化方式。

1. 好氧生物降解 在好氧条件下,氯代芳烃的生物降解起始于脱氯反应。脱氯有两条途径,即先脱氯后开环与先开环后脱氯。前一途径最早在假单胞菌降解 3-氯苯甲酸时发现,主要通过水解作用形成羟基苯甲酸。在黄杆菌属和红球菌属细菌降解氯酚时,也存在氯被羟基取代的现象。后一途径的共同特征是:在加氧酶的作用下氯代芳烃形成卤代邻苯二酚,开环产生不稳定的碳-氢键后脱氯。大多数氯代芳烃(如氯苯、氯苯胺、氯苯甲酸、五氯酚、2,4-D,2,4,5-T 及氯代联苯等)的好氧降解都通过这一途径,最终形成氯代邻苯二酚(图 10-8)。

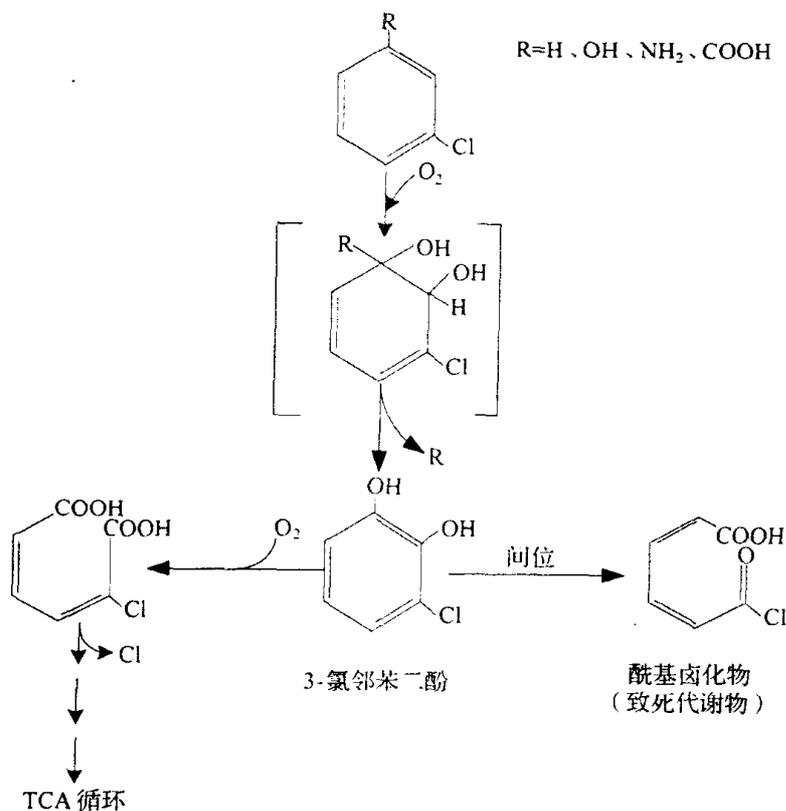


图 10-8 氯代芳烃的好氧生物降解

2. 厌氧生物降解 1982年,美国密执安州立大学 Suflita 和 Tiedje 利用城市污水处理厂消化污泥作为接种物,首次发现 3-氯苯甲酸(3-CBA)可被厌氧脱氯并转化为甲烷和二氧化碳。现已证实,许多氯代芳烃化合物都可通过还原脱氯的途径降解。

(1) 厌氧生物降解的特点及途径。众多研究发现,氯代芳烃化合物厌氧生物降解具有如下的特点:① 在厌氧微生物群中,还原脱氯反应十分普遍,它是氯代芳烃化合物厌氧生物降解的重要反应。② 接种物的来源不同,对污染物的降解程度、降解速率、脱氯位点以及降解途径均不相同。这些特性可通过驯化或某些基质的诱导而改变。一般而论,苯环上的氯取代基越多,

还原脱氯的速率就越高。③ 还原脱氯反应所需的电子供体,可来自于细胞内源性基质和外源性有机物。在培养体系中添加碳源(如葡萄糖、短链脂肪酸)可刺激氯代芳烃化合物的生物降解,提高降解速率。④ 接种物中的微生物类群丰富多样,单一菌株难以完成整个“脱氯-矿化”过程。⑤ 还原脱氯过程可为某些脱氯微生物提供维持能,即脱氯微生物具有氯呼吸产能(chlorespiration)的特性。

接种物不同,氯代芳烃化合物的降解途径和降解产物也各不相同。1986年,Mikesell等人采用未驯化的新鲜消化污泥作接种物时,PCP先以邻位方式进行还原脱氯,转化成3,4,5-TCP、3,5-DCP和3-CP,最后形成二氧化碳和甲烷。以经过驯化并形成颗粒的活性污泥作接种物时,则以间位方式进行还原脱氯,使PCP转化为2,4,6-TCP,4-CP或矿化成二氧化碳和甲烷。Bhatnagar等人综合多种研究结果,提出PCP的降解途径如图10-9所示。

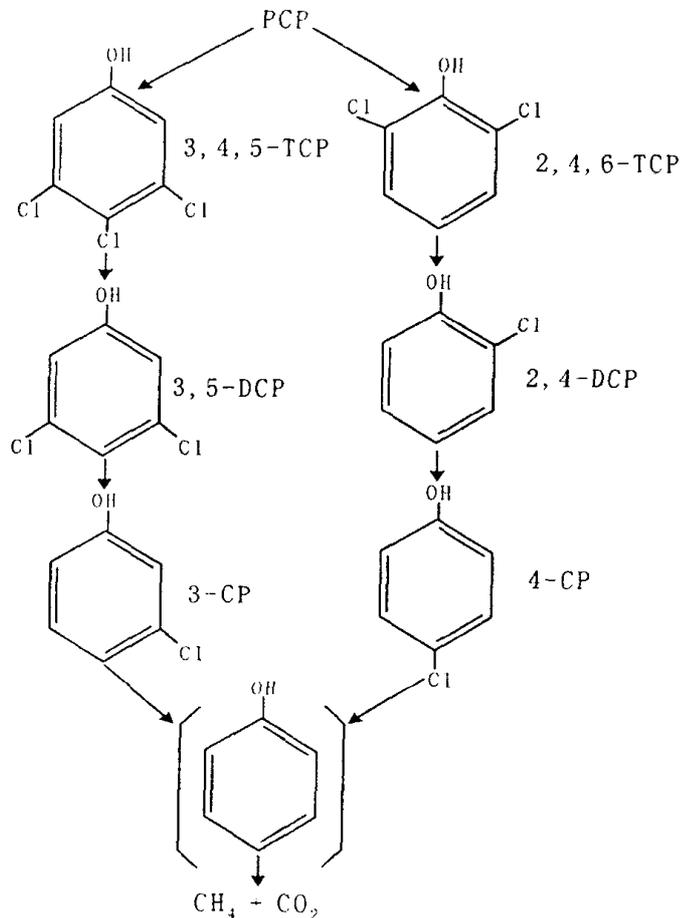


图 10-9 PCP 降解途径

(2)可降解氯代芳烃化合物的混合培养物 业已发现消化污泥、水体沉积物、厌氧富集培养物、厌氧颗粒污泥等都具有降解氯代芳烃化合物的潜力,并从中分离获得了脱氯细菌纯培养物。沉积物、消化污泥、富集培养物、反应器颗粒污泥所具有的还原脱氯作用和矿化作用,是通过多种微生物协同反应而实现的。这些混合培养物对氯代芳烃化合物的脱氯位点、脱氯程度、脱氯速率的差异,直接与其中的微生物种类有关。尽管在降解氯代芳烃化合物的混合培养物中,微生物的组成与功能还未完全阐明,但已取得一定进展。现已证明,降解3-CBA的混合培养物是由四种细菌组成的共生菌群(consortium)。这四种细菌分别为蒂氏脱硫念珠菌(*Desulfomonile teidjei*)菌株DCB-1,菌株BZ-2,产甲烷螺菌和产甲烷八叠球菌,它们之间的关系是互营关系。菌株DCB-1将3-CBA降解为苯甲酸;接着菌株BZ-2将苯甲酸降解为乙酸、氢和二氧化碳;乙酸被产甲烷八叠球菌用作产甲烷基质,氢和二氧化碳则被产甲烷螺菌用作产甲烷基质。氢还可被菌株DCB-1用作还原脱氯反应的电子供体。产甲烷螺菌和菌株DCB-1竞争氢,可形成低氢分压,使苯甲酸的生物降解在热力学上更为有利。除了基质上的联系以外,菌株BZ-2和产甲烷螺菌还可为菌株DCB-1提供脱氯反应所需的维生素类生长因子。

第二节 污染环境的自净作用

污染环境的自净作用(即环境自净)是指环境受到污染后,在物理、化学和生物的作用下,逐步消除污染物达到自然净化的过程。环境自净可分为水体自净、土壤自净、大气自净等。

一、污染水体的自净

(一)水体污染

由于人类活动排放的污染物进入河流、湖泊、海洋或地下水等水体,水和水体底泥的物理、化学性质或生物群落组成发生变化,从而降低了水体的使用价值,这种现象称为水体污染。早期的水体污染主要是人口稠密的大城市的生活污水造成的。产业革命以后,工业排放的废水和废物成为水体污染物的主要来源。随着工业生产的发展,水污染范围不断扩大,污染程度日益严重。尤其是工业废弃物对水体的污染还具有潜在的危险性。

根据污染物质的不同,可将水体污染分为:病原体污染、需氧物质污染、植物营养物质污染、石油污染、有毒化学物质污染。

1. 病原体污染 生活污水,畜禽饲养场污水,以及制革、洗毛、屠宰业和医院等排出的废水,常含有各种病原体,如病毒、病菌、寄生虫。水体受到病原体污染,会传播疾病。历史上流行的瘟疫,有的就是水媒型传染病,如1848年和1854年英国两次霍乱流行,各死亡万余人;1892年德国汉堡霍乱流行,死亡7500余人,都是由于水污染引起。由水体引起的传染病主要有病菌引起的痢疾、伤寒、副伤寒、霍乱、副霍乱等;病毒引起的有小儿麻痹症、传染性肝炎等;其他病原体引起的有姜片虫病、血吸虫病、阿米巴痢疾、钩端螺旋体病等。

2. 需氧物质污染 生活污水、食品加工和造纸等工业废水中,含有碳水化合物、蛋白质、油脂、木质素等有机物质。这些物质以悬浮或溶解状态存在于污水中,可通过微生物的生物化学作用而分解。在其分解过程中需要消耗氧气,因而被称为需氧污染物。这类污染物可造成水中溶解氧减少,影响鱼类和其他水生生物的生长。水中溶解氧耗尽后,有机物将进行厌氧分解,产生硫化氢、氨和硫醇等难闻气味,使水质进一步恶化。

3. 植物营养物质污染 生活污水和某些工业废水中,经常含有一定量的磷和氮等植物营养物质。施用磷肥、氮肥的农田水中,也含有磷或氮。含洗涤剂的污水也有不少的磷。这些物质都可引起水体富营养化,使水质恶化。

4. 石油污染 主要发生在海洋,危害是多方面的。如在水面上形成油膜,能阻碍水体的复氧作用。油类粘附在鱼鳃上,可使鱼窒息;粘附在藻类、浮游生物上,可使它们死亡。油类会抑制水鸟产卵和孵化,破坏它们羽毛的不浸水性能。石油污染还能使水产品品质劣化。

5. 有毒化学物质污染 主要是重金属和难分解的有机物的污染。难分解的有机物主要是有机氯化物、多环有机化合物、有机氮化合物(芳香胺类)和有机重金属化合物等。其中,有不少难分解有机物是致癌物。难分解有机物污染水体,对人类危害极大。

按照水体的不同,水体污染可分为:河流污染、湖泊(水库)污染、海洋污染和地下水污染。其中,河流是陆地上最重要的水体。世界上的大工业区和城市大都建立在河流之滨,依靠河流供水、运输,也将废水排入河流。如今工业地区的河流和人口密集地区的河流,大多数受到不同程度的污染。例如美国约有16500个下水道系统和30多万个工厂将废水排入河流等水体中。全美国52条主要河流都受到不同程度的污染,其中有10条河流受污染的河道长度为总长度

的 90%。

(二) 水体自净

广义的水体自净是指受污染的水体由于物理、化学、生物等方面的作用, 污染物浓度逐渐降低, 经一段时间后恢复到受污染前的状态。狭义的水体自净则是指水体中微生物氧化分解有机污染物而使水质净化的作用。

水体自净机理包括沉淀、稀释、混合等物理过程, 氧化还原、分解化合、吸附凝聚等化学和物理化学过程以及生物化学过程。各种过程同时发生, 相互影响, 并相互交织进行。一般说来, 物理和生物化学过程在水体自净中占主要地位。

存在溶解氧时, 需氧微生物可将悬浮和溶解于水体中的有机污染物, 氧化分解为简单的、稳定的无机物, 如二氧化碳、水、硝酸盐和磷酸盐等, 使水体得到净化。在生物净化过程中, 需要消耗一定量的溶解氧。除水体原有的溶解氧以外, 其他溶解氧主要来自水面复氧和水体中水生植物的光合作用。复氧和耗氧同时进行。溶解氧的变化状况反映了水体中有机污染物的净化过程, 因而可把溶解氧作为水体自净的标志。

溶解氧的变化可用氧垂曲线表示(图 10-10)。若曲线中 C_p 点的溶解氧量大于有关规定的数量, 说明从溶解氧的角度看, 污水的排放未超过河段的自净能力。若排入有机污染物过多, 超过河流的自净能力, 则 C_p 点低于规定的最低溶解氧含量, 甚至在排放点下的某一段会出现无氧状态, 此时氧垂曲线中断, 水体失去自净能力。在无氧情况下, 水中有机物因厌氧微生物作用进行厌氧分解, 产生硫化氢、甲烷等, 水质变坏, 腐化发臭。

水体自净是环境科学中的重要研究课题。对不同水体进行考察并掌握各种水体的自净规律, 就能充分利用水体自净能力, 减轻人工处理污染物的负担, 保证水体不受污染, 并据此安排合理的生产布局, 以最经济的方法控制和治理污染源。

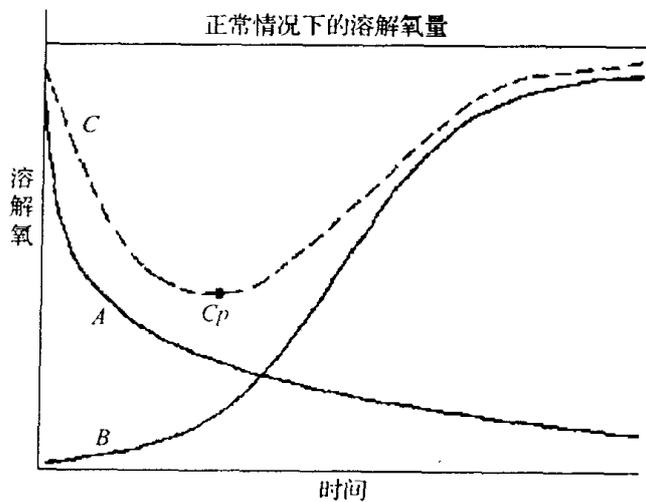


图 10-10 氧垂曲线

A: 有机物分解的耗氧曲线;
B: 为水体复氧曲线; C: 氧垂曲线;
 C_p : 最大缺氧点

二、污染土壤的自净

(一) 土壤污染

土壤污染是指人类活动产生的污染物进入土壤并积累到一定程度, 引起土壤质量恶化的现象。天然土壤具有纯粹的自然属性。人类最初开垦土地, 主要是为了从中索取更多的生物量。于是, 已开垦的土地逐渐变得贫瘠, 人们就向农田补充一些物质——肥料。农田获得肥力, 同时也受到了污染。譬如施用人畜粪尿作为肥料, 确能保持农田的良好生产性能, 但同时粪尿中的病原体也随着进入农田, 造成土壤污染。产业革命以来, 特别是 20 世纪 50 年代以来, 由于现代工农业生产的飞跃发展, 农药、化肥的大量施用, 大气烟尘和污水对农田的不断侵袭, 土壤的生产性能和利用价值受到重大影响, 于是土壤污染引起了人们的注意。1955 年日本发生了“镉米”事件: 富山县的农民长期用神通川上游铅锌冶炼厂的废水灌溉稻田, 致使土壤和稻米中镉

含量增加。人们食用这种稻米,镉在体内积累,引起全身性神经痛、关节痛、骨折,以至死亡。这种疾病以剧烈疼痛为主要症状,故被称为痛痛病。残留在土壤中的镉至今还难以清除。1974年春季,中国天津地区蓟运河畔的农田,因引灌被三氯乙醛污染的河水,三氯乙醛在土壤中分解产生三氯乙酸,致使大面积的小麦受害。

土壤污染物主要来自工业和城市的废水和固体废物、农药和化肥、牲畜排泄物、生物残体以及大气沉降物等。农药是土壤的主要有机污染物,目前有杀虫效果的化合物超过6万种,大量使用的农药约有50种。直接进入土壤的农药,大部分可被土壤吸附。残留于土壤中的农药,由于生物和非生物的作用,经历转化和降解过程,形成具有不同稳定性的中间产物,或最终成为无机物。质地粘重的土壤对农药的吸附能力强,砂土对农药的吸附能力弱。水分增加时,土壤对农药的吸附减弱,蒸发加强。随着土壤水分的蒸发,农药从土壤中逸出。土壤有机质含量高、微生物种类多时,会加速土壤中农药的降解,减少农药的残留量。石油、多环芳烃、多氯联苯、三氯乙醛等,也是土壤中常见的有机污染物。

(二)植物残毒

植物从污染土壤中吸收各种污染物质,经过体内的迁移、转化和再分配,有的分解为其他物质,有的部分或全部以残毒形式蓄积在植物体各个部位,特别是可食部位,构成对人体健康的潜在性危害。土壤污染决不只限于引起植物生育障碍和产量减少,更严重的是可能看上去收成良好,但作物内部却积累了有毒物质,人类食用后引起慢性中毒,造成公害病。

很多易分解的有机污染物通过各种途径进入土壤后,可以不必担心残毒问题。例如对酚、氰、苯烯腈、三氯乙醛(包括在土壤中的分解产物三氯乙酸)、硝化抑制剂2-氯-6-(三氯甲基)吡啶(CP)等的研究表明,由于它们在土壤中比较容易分解,不可能长期残留,因此只要控制进入土壤的数量,一般不会造成植物残毒。

在土壤中农药受到物理、化学和微生物的作用,按照其被分解的难易程度可分为两类:①易分解类,如2,4-D和有机磷制剂等;②难分解类,如2,4,5-T和有机氯制剂等。易分解的农药一般不必担心植物残毒;难分解的农药则很可能造成植物残毒。不同植物对同一种农药的有毒成分的吸收量是不同的。例如对有机氯农药中的艾氏剂和狄氏剂的吸收量,按下列次序递增:洋葱<莴苣<黄瓜<萝卜<<胡萝卜。在土壤中农药可以转化为其他有毒物质,例如DDT可转化为DDD、DDE,它们都能成为植物残毒。

(三)土壤自净

土壤-植物系统是陆地生态系统的基本结构单元,包括绿色植物及其根系周围的土壤环境。这个系统通过物理、化学和生物学的过程,能起到消除污染、维护生态平衡的作用,即土壤自净。

在生态系统中,土壤生物特别是微生物能分解有机废物,使之矿化为无机营养物质,供给植物生长、发育的需要,保证地球上生物小循环的正常进行。土壤自净主要由下列要素构成:①绿色植物根系的吸收、转化、降解和生物合成作用;②土壤中细菌、真菌和放线菌等微生物区系的降解、转化和生物固定作用;③土壤的有机、无机胶体及其复合体的吸收、络合和沉淀作用;④土壤的离子交换作用;⑤土壤和植物的机械阻留作用;⑥土壤的气体扩散作用。

几千年来,中国有利用人粪尿、厩肥和垃圾等废物作农业肥料的传统,并且积累了丰富的经验。随着城市和工农业的发展,近年来全国开辟了十多个污水灌区。这些污灌区农田生态系统不仅在利用水肥资源、增加农业产量方面取得显著效果,而且由于农田生态系统对污水有强大的净化能力,在保护环境方面也作出了贡献。例如,沈阳抚顺灌区使沈阳南塔水源和浑河的

水质明显好转;白洋淀上游的保定市截污灌田,使白洋淀水质有很大改善;齐齐哈尔引污治嫩工程建成后,对保护嫩江的水质也起了重要作用。

各个污水灌溉系统,由于灌溉水质、植物种类、耕作制度和自然条件不同,净化效果也不相同。在沈阳抚顺灌区,通过对含酚石油污水灌溉水稻的土壤生物学特性的研究,还发现随着污水灌溉定额的增加,土壤中酚降解细菌和硫化细菌等微生物类群的数量明显提高。但是试验也发现,土壤中酚降解细菌对酚的忍受程度是有限的,最大耐酚量为 0.05%,如果超过这个限度,会影响土壤-植物系统对酚的净化功能。

微生物在土壤中所引起的各种生物化学过程,主要是借助于它们所产生的酶系来实现的。在含酚石油污水灌区土壤中形成了能分解酚的多酚氧化酶系,其含量变化与微生物类群数量的消长相一致。因此,长期利用适量的含酚石油污水灌溉水稻田,在土壤中不会出现酚的累积。此外,在灌区土壤中已分离出多种能分解石油污水中烷烃类和多环芳烃[包括苯并(a)芘]的细菌。

对土壤-植物系统功能的研究还包括农药在土壤中的消长状况。农药分解过程有化学分解和生物分解,其中以生物分解为主。农药品种不同,土壤微生物的分解作用也有很大的差异。以除草剂为例,2,4-D 在土壤中能很快被微生物分解,但 2,4,5-T 却因苯环上 Cl⁻对微生物有抗性,很难被分解。在土壤-植物系统中农药的消长过程涉及其降解中间产物和最终产物的动态过程。现代农业科技人员必须充分掌握土壤-植物系统对不同化学物质的净化功能及其作用机理,以用之于生产实践。

第三节 污染环境的生物修复

一、生物修复概述

在自然环境中,存在着许多土著微生物,自然地进行着污染环境的净化作用。但是,由于受电子受体、营养物质、污染物浓度及其可生物降解性等因素的限制,生物降解与生物转化的速率通常很低。生物修复(bioremediation)是指人为利用微生物和其他生物的代谢活动,现场将污染环境(如土壤、海洋、地下水)中的污染物(如有毒有机污染物)转化成无害物质(二氧化碳和水),使环境恢复到受污染前的状态的过程。国外对生物修复的研究大约起始于 20 世纪 80 年代初期,至今已有大量成功的工程实例。生物修复在治理大面积区域污染上的作用日趋明显。

与物理修复和化学修复相比,生物修复具有如下的优势:① 费用省。在 20 世纪 80 年代末,采用生物修复技术处理 1 立方米污染土壤约需投资 75~200 美元,而采用焚烧或填埋处理则需 200~800 美元。生物修复是所有处理技术中最经济的。② 副作用少。生物修复只是自净过程的强化,最终产物是二氧化碳和水,不会产生二次污染或导致污染物转移,可达到永久去除污染物的目标;同时使土地的破坏和污染物的暴露降到最低程度。③ 残留浓度低。经过生物修复处理,污染物的残留浓度可降到很低,甚至低于仪器检测下限。④ 独特的应用场合。如果受污染的土壤位于建筑物或公路下面,不能挖掘,也不能搬出,原位生物修复具有独到的优势。⑤ 生物修复技术可以同时处理受污染的土壤和地下水。

当然,生物修复也有局限性。其实施的前提条件有:① 必须存在具有代谢活性的微生物。② 这些微生物必须有一定的降解速率,并能使污染物浓度降低到环保标准。③ 这些微生物必

须没有毒性产物。④ 污染场地必须不含降解菌的抑制剂,否则需要预处理(如稀释或破坏抑制剂)。⑤ 污染场地必须有足够的营养物质、氧气或其他电子受体,适宜的湿度和温度。⑥ 处理费用必须低于其他技术。

目前,生物修复存在的主要问题有:① 微生物不能降解进入环境的所有污染物。对于难以生物降解的、不溶性的污染物,以及与土壤腐殖质或泥土结合的污染物,生物修复很难发挥作用。② 微生物会阻塞生物修复所需的构筑物。对污染场地及其存在的污染物,需进行详细而具体考察,渗透性低的土壤不适宜采用生物修复技术,因为在这类土壤中所挖的注水井或这类土壤本身都会因细菌生长过量而阻塞。③ 微生物活性受当地温度和其他条件的影响。④ 在有些情况下,经过生物修复,残余的污染物浓度依然较高,因为当污染物浓度低至一定值后,它不足以维持降解菌生长而继续下降。

二、生物修复的技术要点

生物修复实质上是对自净作用的强化。在实施生物修复时,应综合考虑微生物、有机污染物和被污染环境的特性。

(一) 营养物质

在土壤和地下水中,尤其是在地下水中,氮、磷浓度一般不高,是限制微生物生长和代谢的重要因素。要使污染物原位降解,不但需要接种相应的微生物,更需要添加适量的营养物质。许多研究表明,外加氮、磷、酵母废液(或酵母膏),可以明显促进石油烃类化合物的降解。通过添加营养物质来强化生物降解和生物转化的过程,通常称为生物激活(biostimulation)。

是否需要添加营养物质以及添加营养物质的效应,与受污染环境的养料含量、C/N 比例、所加营养物质的类型、添加速度等有关。有些研究发现,添加氮源会抑制芳烃和脂肪烃矿化。由此可见,营养物质对微生物修复的影响比较复杂,在选择养料及其配比时最好先做小试。国外研制的“亲油”型缓释肥料,将尿素或磷酸盐包埋于石蜡中,缓慢释放,肥效持续时间较长,已成功地应用于海洋石油污染的生物修复。

(二) 电子受体

自然环境中存在的主要电子受体有:溶解氧、硝酸盐、硫酸盐、高价铁、有机物分解的中间产物。所用的电子受体不同,微生物的代谢类型和代谢速率都不相同。电子受体一般处于供不应求的状态。

在好氧环境中,溶解氧通常是污染物生物降解与转化的限制因子。工程上采用的增氧措施有:① 在被处理的地下水或土壤中布设通气管道,将压缩空气强制送入需氧部位;② 投加氧发生剂(通常用过氧化氢),经驯化的微生物可以耐受的过氧化氢浓度为 1 000 mg/L。

在厌氧环境中, NO_3^- 、 SO_4^{2-} 、 Fe^{2+} 等都可以作为污染物生物降解的电子受体。许多典型的有机污染物(如氯代苯系物)不能在好氧条件下降解,却可在厌氧条件下被矿化成二氧化碳和水。以 NO_3^- 作为电子受体时,应特别注意中间产物对地下水的二次污染。

(三) 共代谢基质

根据目前对共代谢的认识,只有存在微生物生长所需的能源和碳源时,才能进行某些有机污染物的生物降解和转化作用。已有人将共代谢原理应用于地下水的微生物修复。他们将甲烷(共代谢基质)和氧注入地下水中,利用甲烷营养菌的生长和代谢来净化地下水中的有机污染物,使地下水得到修复。

(四)有机污染物的理化特性

有机污染物的许多理化特性会影响土壤和地下水的生物修复,因此需要加以了解。这些理化特性为:①化学品的类型,如酸性、碱性、极性、非极性、有机物、无机物等。②化学品的性质,如相对分子质量、熔点、结构、水溶性、蒸汽压、Henry 常数等。③化学反应,如氧化、还原、水解、沉淀、聚合等。④环境介质吸附参数,如 Freudlich 吸附常数、辛醇-水分配系数(K_{ow})、有机碳吸附系数(K_{oc})。⑤降解性,如半衰期、一级速度常数、相对可生物降解性等。

污染物的理化性质与它的可生物降解性密切相关。疏水性污染物(如石油烃、PCB、卤代溶剂)形成独立的非水相,难以直接被微生物降解和转化,而易被沉积物、土壤颗粒吸附,并与其有机复合体形成结合态。被土壤固相吸附的可降解有机物,解吸速率慢于生物降解速率,因此生物修复的总反应速率常常受控于解吸,而不是微生物的代谢。污染物进入环境的时间越长,其可生物利用性越低,即污染物老化(ageing)。污染物老化的原因并非是微生物的活性受到抑制,也不是营养物缺乏,而是在污染物与天然有机物质结合后或被土壤颗粒吸附后,传质受到限制。为了提高污染物的水溶性,从而加速污染物的生物降解,一些研究者使用了表面活性剂。表面活性剂应当有如下特性:①对微生物无毒害;②易被生物降解;③不造成环境物理性质的恶化等。

提高生物修复效果的综合对策见表 10-2。

表 10-2 提高生物修复效果的综合对策

障碍因子	对策	实例
1. 微生物		
无降解性种群	外源接种	采用白腐菌增强油污染土壤 PHA 降解 (Brokkord, 1992)
降解菌数量低	补充 N、P, 原地富集 固定降解菌 (PU 微胶丸)	微胶丸包埋 <i>Flavobacterium</i> 降解 PCP (Crawford, 1992)
2. 污染物		
低生物利用率	改变污染物的物理性质	加亲油剂增加油-细胞接触面 (Atlas, 1992)
非微生物生长基质	投加共基质	用苯甲酸作为降解 PCBs 菌株 <i>Acinetobacter</i> 的共基质代谢 PCBs (Adrient, 1992)
降解酶合成受抑制	用污染物类似物诱导	加联苯诱导强化土壤 PCBs 降解 (Brauner, 1985)
3. 环境因子		
极端物理条件 (缺乏电子供体)	改变条件使之适宜微生物生长和代谢	投加产氧剂, 建立丙(撑)二酸降解所需的好氧环境 (Hoover, 1995) 投加磷酸盐缓冲液和淀粉, 建立 TNT 降解所需的厌氧环境 (Funk, 1995) 投加短链脂肪酸, 强化 2,4-D 还原脱氯降解速率 (Gibson, 1990)

三、生物修复工艺

主要有原位生物修复工艺、非原位固相生物修复工艺和非原位液相生物修复工艺。

(一) 原位生物修复工艺

该工艺是向污染点直接提供接种物、氧气、营养物,从而使污染物降解的生物修复方法(图 10-11)。原位生物修复工艺主要包括 P/T(Pump/Treatment) 法,渗滤(Percolation) 法,生物通气(Bioventing)法和空气扩散法等。下面以 P/T 法为例加以介绍。

P/T 法主要应用于地下水饱和的受污染区域的修复。其流程为“抽吸地下水→生物处理→处理水回注”,或“抽吸地下水→加营养物和空气(或 H_2O_2) →回注”。Kaempfer(1993)采用该工艺处理被石油污染的地下水时,通过添加适量的 N、P 养料和 NO_3^- 、 H_2O_2 ,回注抽出水,2d 后烃降解细菌的数量即明显增加,石油烃浓度明显下降。

原位生物修复工艺的特点是:① 强化有机污染物降解,缩短清除时间;② 工艺相对简单,费用较低;③ 生态风险小。

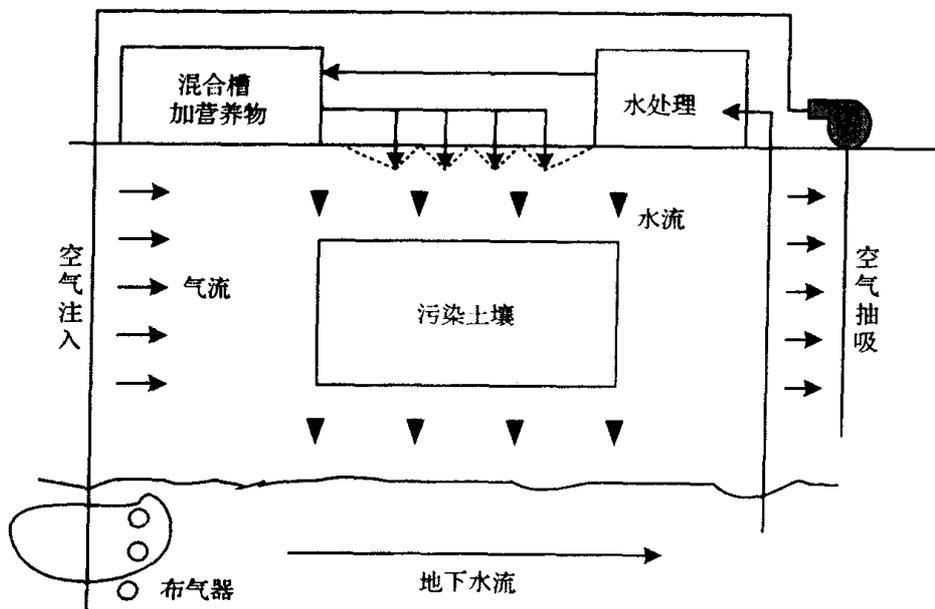


图 10-11 原位生物修复工艺示意图

(二) 非原位固相生物修复工艺

该工艺是将受污染的土壤和沉积物移离原地,在异地进行处理的生物修复方法(图 10-12)。主要有土地耕作(land-farming)法、堆肥(composting)法和生物堆层(biopiles)法。下面以土地耕作法为例加以介绍。

土地耕作法是在非透性垫层和砂层上,以 10~30 cm 的厚度平铺受污染的土壤,并淋撒营养液和降解菌株接种物,定期翻动充氧,以满足微生物生长的需要;处理过程产生的渗滤液,回淋于土壤表面,以彻底清除污染物。该工艺已成功地用于受 PCP、杂酚油、石油加工废水污泥、石油加工产品(焦油)、农药污染土壤的修复。例如,1995 年 Hyzy 等人采用土地耕作法,对规模为 4 000 m^3 的受 PAH 污染的池塘沉积物实施修复后,PAH 浓度由 1 000 mg/L 降至 100 mg/L。

非原位固相生物修复工艺的优点是费用低,比较经济;缺点是修复效果较差,运行时间较

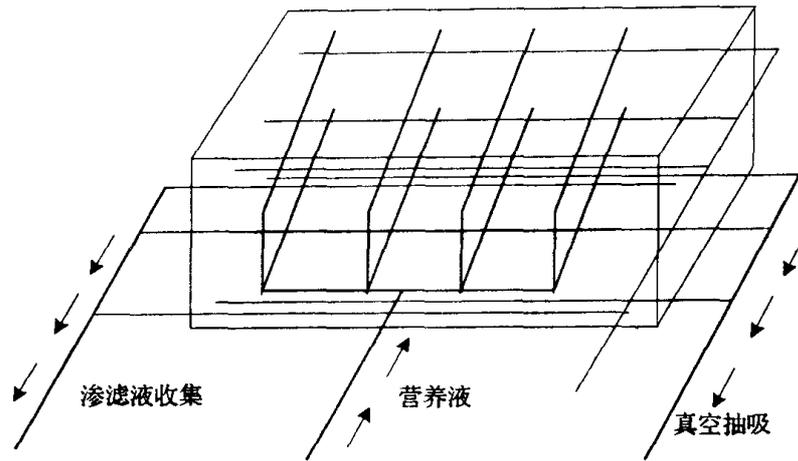


图 10-12 非原位固相生物修复工艺

长,受环境因子影响也较大。

(三)非原位液相生物修复工艺

非原位液相生物修复工艺主要包括生物反应器法、土壤泥浆(slurry)反应器法和稳定塘(lagoon)处理法(图 10-13)。应用对象包括受污染的土壤、沉积物、地下水和地表水。

在结构上,生物反应器工艺与常规生物处理单元相似。降解菌存在的主要形式为絮体和生物膜,为了强化目标污染物的生物降解,通常外源投加营养物质。应用于污染土壤的修复时,考虑到有机污染物的结合残留与吸附,需用一些易降解的有机溶剂或表面活性剂进行清洗,使污染物由固相转移到液相,再将此清洗液用反应器进行处理。已有一些研究者在实验装置上研究生物反应器修复受 PCP、TCE、DCA 污染的地下水/土壤的性能。Stucki 等采用规模为 $20 \text{ m}^3/\text{h}$ 的生物反应器,处理含 $2\,000\sim 15\,000 \mu\text{g}/\text{L}$ 二氯乙烷(DCA)的地下水,通过投加自养黄色杆菌(*Xanthobacter autotrophicus*)和假单胞菌 DE1 以及营养基质和过氧化氢,处理出水的 DCA 浓度低于 $10 \mu\text{g}/\text{L}$,至 1994 年已成功地运转 5 年。

在适宜的 pH、营养物质、接种物以及污染物负荷的条件下,非原位液相生物修复工艺修复土壤的性能良好,但投资与运行费用相对较高。

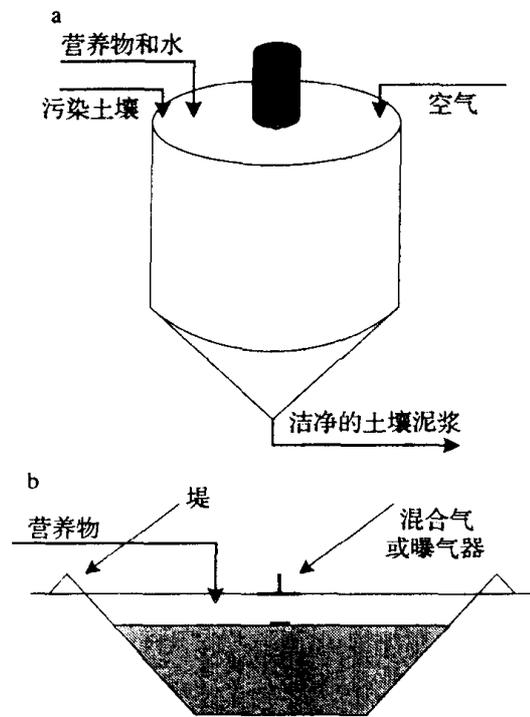


图 10-13 生物修复用的生物反应器

- a. 土壤泥浆反应器
- b. 稳定塘

复习思考题

1. 简述微生物对有机污染物的降解与转化潜力。
2. 简述质粒分子育种和基因工程育种的操作过程。
3. 何谓可生物降解性？简述评定有机污染物可生物降解性的三种方法。
4. 简述烷基苯和氯代芳烃生物降解的途径和特点。
5. 简述水体自净和土壤自净过程。
6. 试分析生物修复的利弊。
7. 简述生物修复的技术要点。
8. 简述三类生物修复工艺。

第十一章 废水生物处理的微生物学原理

产业革命后,工业生产迅速发展,人类排放的污染物大量增加,环境污染不断加剧。环境污染有不同的类型。按环境要素可分为大气污染、水体污染和土壤污染等;按污染物的形态可分为废气污染、废水污染和固体废物污染等。在人类同环境污染作斗争、保护和改善生存环境的过程中,逐渐形成了环境工程学。环境工程学主要研究大气污染防治工程、水污染防治工程、固体废物的处理和利用等。在“三废”(废气、废水和废渣)治理中,生物处理具有不可替代的重要作用。

环境微生物学的研究,实际上也是从废水生物处理的研究和应用开始的。至今,由水体自净过程发展而来的废水生物处理技术,已在环境工程上广泛应用。对各种废水生物处理系统(人工环境)中的微生物状况的研究,不仅为废水生物处理技术的改进和提高打下了坚实的基础,也有力地推动了整个环境微生物学的发展。进入 21 世纪,现代生物技术的飞速发展,又为环境微生物学注入了新的活力。它在环境污染预防与控制上的发展空间将更加广阔。

限于篇幅,本章着重介绍废水生物处理的微生物学原理。

第一节 废水生物处理的作用与类型

一、废水生物处理的作用

(一) 废水处理的方法

废水处理方法有物理法、化学法、生物法。

1. 物理法 废水物理处理法是通过物理作用分离和去除废水中不溶解的悬浮固体(包括油膜、油品)的方法。可分为废水气液交换处理法、废水高梯度磁分离处理法、废水吸附处理法、废水沉淀法(或重力分离法)、废水筛滤截留法、废水离心分离法、废水浮选法(气浮法)、废水吹脱法、废水反渗透法等。

2. 化学法 废水化学处理法是通过化学反应改变废水中污染物的化学性质或物理性质,使它或从溶液、胶体或悬浮状态转变为沉淀或漂浮状态,或从固态转变为气态,进而从水中除去的废水处理方法。废水化学处理法可分为废水中和处理法、废水混凝处理法、废水化学沉淀处理法、废水氧化处理法、废水萃取处理法等。

3. 生物法 废水生物处理法是利用微生物的代谢作用去除废水中有机污染物的一种方法,又称废水生化法。它可分为需氧生物处理法和厌氧生物处理法。

废水生物处理法是 20 世纪初出现的污水治理技术。发展至今,已成为世界各国处理城市生活污水和工业废水的主要手段。它是目前最重要的废水处理方法。

(二) 废水处理的级别

城市污水处理一般分为三个级别,称为污水一级处理、二级处理、三级处理。

1. 一级处理 污水处理三个级别的第一级,用以去除废水中的漂浮物和部分悬浮状态的污染物,调节废水 pH 值,减轻废水的腐化程度和后续处理工艺负荷。

一级处理应用物理处理方法,即用格栅、沉砂池、沉淀池等构筑物,去除污水中不溶解的污染物和寄生虫卵。污水经一级处理后,一般达不到排放标准。所以一般以一级处理为预处理。

2. 二级处理 污水处理三个级别中的第二级。污水经过一级处理后,进行二级处理,以除去污水中大量有机污染物,使污水得到进一步净化。

长期以来,一直把生物处理作为污水二级处理的主体工艺,通过微生物的代谢作用,将污水中各种复杂的有机物氧化降解为简单的物质。生物处理对污水水质、水温、供氧量、pH 等都有一定的要求。

3. 三级处理 污水处理三个级别中的最后一级,又称污水高级处理或深度处理。污水经过二级处理后,仍含有氮、磷和难以生物降解的有机物、矿物质、病原体等,需要进一步净化处理,以便彻底消除污染。

三级处理通常是用生物化学(硝化-反硝化)法、碱化吹脱法或离子交换法除氮;用化学沉淀法除磷;用臭氧氧化法、活性炭法或超过滤法去除难降解有机物;用反渗透法去除盐类;用氯化法消毒等单元过程的一种或几种组合成的污水处理工艺。在脱氮除磷中,生物处理的作用越来越大。

二、废水生物处理的类型

根据不同的标准,废水生物处理可以划分为不同的类型。

(一) 按所利用的微生物种类划分

根据生物处理系统中的微生物种类,可把废水生物处理分为好氧生物处理(利用好氧微生物)、厌氧生物处理(利用厌氧微生物)和兼性生物处理(利用兼性厌氧微生物)。活性污泥法是好氧处理的代表,污泥厌氧消化是厌氧处理的代表。好氧生物膜法则具有兼性生物处理的特点,在生物膜表层主要由好氧微生物起作用,而在生物膜内则主要由兼性厌氧微生物起作用。

(二) 按微生物的存在状态划分

根据生物处理系统中微生物的存在状态,可把废水生物处理分为悬浮生长系统和固定膜系统(附着生长)。在悬浮生长系统里,微生物群体以悬浮状态存在于废水中,起着降解废水中有机物的作用,如好氧活性污泥法。在固定膜系统中,微生物群体附着于填料上生长繁殖,群体扩展、加厚,形成生物膜,废水通过时,其中的污染物因生物膜的作用而被降解,如生物滤池。生物接触氧化法和上流式污泥床工艺则是悬浮系统与固定膜系统的结合。

(三) 按反应器的类型划分

在废水生物处理过程中,人们设计开发了多种结构和操作类型的生物反应器。按照反应器的操作方式,可分为间歇式反应器和连续流反应器。按照反应器的水力流态,可分为全混合式反应器(如完全混合式曝气池)和推流式反应器(如推流式曝气池)。按照反应器中的物料状态,可分为固定床反应器(如生物滤池)和流化床反应器(如好氧流化床)等。

(四) 按被处理的污染物种类划分

根据被处理的污染物种类,可把废水生物处理分为生物除碳、生物脱氮和生物除磷。生物除碳主要是去除废水中的碳质 COD 或碳质 BOD₅,包括各种二级生物处理。生物脱氮主要是

利用微生物的硝化和反硝化作用,去除废水中的各种含氮污染物。生物除磷主要是利用微生物的过量摄磷作用,去除废水中的各种含磷物质。

第二节 废水好氧生物处理的微生物学原理

废水好氧生物处理是利用好氧微生物(主要是需氧细菌)分解废水中的有机污染物,使废水无害化的一种废水生物处理法。这种处理的最终产物是生物体(活性污泥)、二氧化碳、水、氨、硫酸盐和磷酸盐等。在废水排放前,通过二次沉淀池从中分离和去除活性污泥。

常用的好氧生物处理工艺有活性污泥法和生物膜法。

一、好氧活性污泥法

活性污泥法又称曝气法,1914年由英国人 Ardern 和 Lockett 创建。它以污水中的有机污染物作为培养基,在有氧的条件下培养各种微生物群体形成充满微生物的絮状物——活性污泥,通过凝聚、吸附、氧化、分解、沉淀等过程去除废水中的有机污染物。活性污泥法在国内外污水处理中占据首要地位。其处理废水的流程如图 11-1 所示。

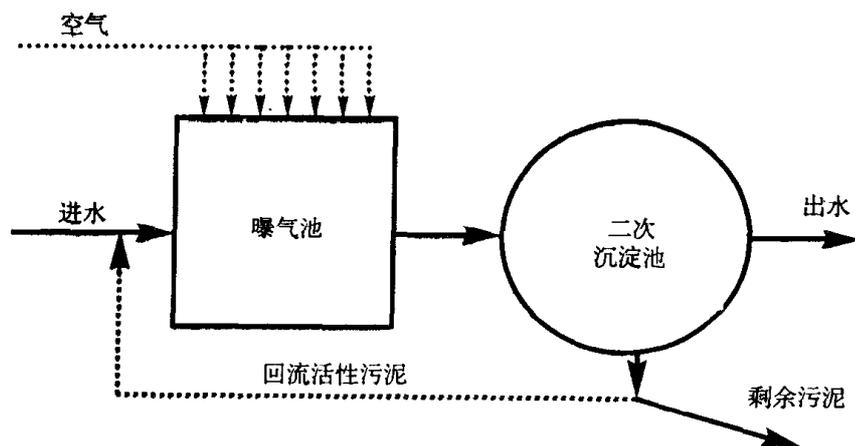


图 11-1 活性污泥法处理废水流程

(一) 活性污泥及其性状

活性污泥是由多种多样的好氧微生物、兼性厌氧微生物以及少量其他生物与吸附态有机物或无机固形物交织一起而形成的絮体。在活性污泥法废水处理系统中,它是特殊的生物吸附剂与生物催化剂。

活性污泥的颜色呈深灰、灰褐或灰白;含水率约 99%;密度为 $1.002\sim 1.006\text{ g/cm}^3$,混合液污泥和回流液污泥略有差异,前者为 $1.002\sim 1.003\text{ g/cm}^3$,后者为 $1.004\sim 1.006\text{ g/cm}^3$;沉降性能较好。它具有生物活性,能吸附、氧化有机物。对于废水中的大分子基质,它可通过胞外酶将它们水解为小分子,进而吸收到体内氧化分解。活性污泥能自我增殖,絮体绒粒大小为 $0.02\sim 0.2\text{ mm}$,比表面积为 $20\sim 100\text{ cm}^2/\text{mL}$,呈弱酸性(pH 约为 6,7)。

(二) 活性污泥净化废水的机理

活性污泥净化废水的主要过程为:有机物的吸附与附聚、有机物的扩散传递、有机物的分解与生物体的合成。

1. 有机物的吸附与附聚 活性污泥具有高亲水性,其外表围绕着固定水层,即液膜。活

性污泥絮体,特别是当微生物处于内源呼吸时,对有机物有强烈的吸附性能。在曝气池内,废水中的溶解态有机物频繁地与活性污泥絮体碰撞。一旦两者接触,有机物即被活性污泥絮体吸附。此外,活性污泥絮体含有凝聚性物质,可促进胶体有机物在絮体表面凝聚,即附聚。

实验发现,当活性污泥絮体与废水充分混合后,废水中的有机物可在短时间内迅速减少。多数学者认为,这一现象是絮体对有机物的吸附以及有机物向絮体的附聚所致。微小颗粒和胶体有机物主要通过附聚作用去除,溶解态有机物则主要通过吸附作用去除。

2. 有机物的扩散传递 吸附或附聚于活性污泥表面的有机物质,只有进入微生物细胞才能被最终分解。有机物从废水向活性污泥絮体以及微生物细胞传递的步骤为:① 有机物从废水中向活性污泥絮体表面传递;② 在絮体表面,先扩散透过液膜,再通过絮体内的间质向细胞表面传递;③ 小分子有机物透过细胞膜进入菌体内部。

Pasveer 等人认为,在活性污泥法处理工艺中,基质扩散进入生物絮体(细胞)是整个有机物去除过程的限速步骤。这一观点得到了许多实验证据的支持。

3. 有机物的分解与生物体的合成 经过传质过程,废水中的低分子有机物直接通过细胞膜进入细菌体内;高分子和胶体有机物则需在水解酶作用下降解为单体才能进入细菌体内。在细菌体内,有机物通过代谢作用而被分解。

当废水有机物丰富时,活性污泥絮体表面可附着高浓度有机物,如果其他条件合适,细菌即会迅速增殖。增殖的细菌大部分形成絮体,小部分呈游离状态。由于废水中食料充沛,包埋在絮体中的细菌也会从絮体上游离。此时,虽然废水有机物被大部分去除,但因存在大量游离细菌,出水 COD 或 BOD₅ 浓度仍然较高。

废水有机物成为细菌生长的制约因素后,细菌的活性减弱,活性污泥的凝聚作用加强,在胞外多糖的搭桥作用下,细菌粘聚成团,形成新的絮体。与此同时,以细菌为食料的原生动物迅速繁殖,掠食游离细菌,使处理出水最终变清。

(三) 活性污泥的微生物组成

废水净化的关键是其中有机污染物的矿化,矿化任务主要由活性污泥中的微生物承担。活性污泥中的生物相十分复杂,除大量细菌以外,尚有原生动物、霉菌、酵母菌、单胞藻类等微生物,以及轮虫、线虫等后生动物。

1. 细菌 在活性污泥中,细菌起着主导作用,它们是污水净化的主力军。其数量约为 $10^8 \sim 10^9$ 个/mL。优势菌群因废水性质、操作条件、环境因素等而不同。从生理类型上看,主要以化能异养菌和化能自养菌为主,光能异养菌虽也存在但数量较少。大多数细菌为革蓝氏阴性细菌。据报道,活性污泥中数量较多的细菌有:丛毛单胞菌属(*Comomonas*)、假单胞菌属、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、噬纤维菌属(*Cytophaga*)、副球菌属(*Paracoccus*)、产碱杆菌属、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)等(表 11-1)。

表 11-1 各类群细菌在活性污泥中的分布

细菌类群	占总分离物的百分比(%)
丛毛单胞菌属和假单胞菌属	50.0
黄杆菌属和噬纤维菌属	13.5
副球菌属	11.5
产碱杆菌属	5.8
棒状杆菌属	5.8

许多细菌具有形成活性污泥絮体的能力,称为菌胶团细菌。它们是构成活性污泥絮体的主体,有很强的吸附、氧化有机物的能力。已知的菌胶团形成菌有数十种。形成的絮体有球形、分枝、蘑菇、片状、椭圆及指形等各种形状。活性污泥絮体的可能结构如图 11-2 所示。

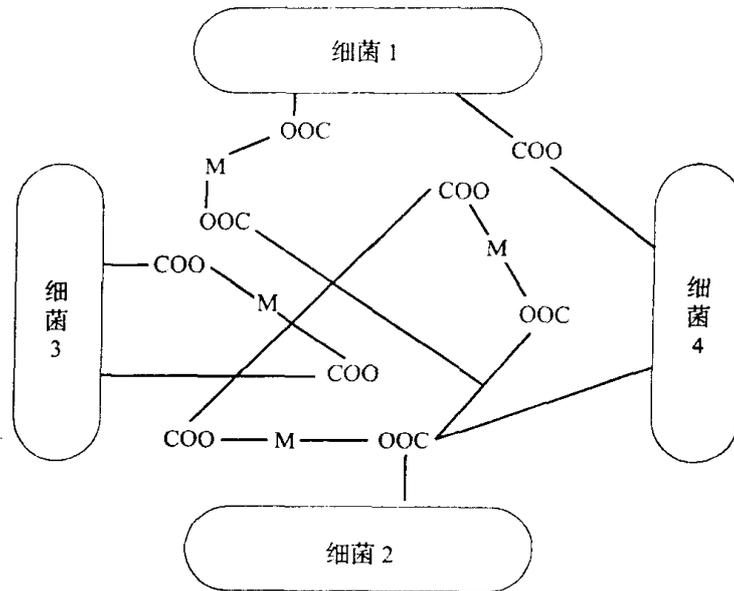


图 11-2 活性污泥絮体的可能结构
(其中 M 表示重金属)

除菌胶团细菌外,丝状细菌也是活性污泥絮体的重要成员。它们或者交叉交织于菌胶团内,构成活性污泥的骨架;或者附着生长于絮体表面;少数游离于污泥絮粒之间。丝状细菌具有很强的氧化分解有机物的能力。但丝状细菌过度繁殖时,往往引起污泥膨胀。

关于活性污泥絮体的形成机制,至今还没有统一认识,存在多种学说,如粘液学说、荚膜学说、电荷学说、多聚 β -羟丁酸学说、离子结合学说、原生动物学说等。

2. 真菌 活性污泥中的真菌,主要为丝状真菌,已报道的有:毛霉属、根霉属、曲霉属、青霉属、镰刀霉属(*Fusarium*)、木霉属(*Trichoderma*)、头孢霉属(*Cephalosporium*)、地霉属(*Grotrichum*)等。

一般认为,真菌不是活性污泥微生物中的重要成员,这是因为它们的生长速率(μ_{max})较低,难与细菌竞争。真菌在活性污泥中出现往往与水质有关,在某些含碳较高或 pH 较低的工业废水处理系统中,经常可见一些霉菌。有人从活性污泥中分离了 20 种真菌,其中菌落出现率最高的是头孢霉属(占 38%),其他为牙枝霉属(占 22%)、青霉属(占 19%)和酵母菌(占 1%)。Jenkins 等(1993)报道,在低 pH 条件下,真菌会引发活性污泥膨胀。

3. 原生动物 原生动物不但对废水净化起重要作用,而且可作为处理系统运转状况的指标。据报道,在活性污泥中所能见到的原生动物有 80 属,228 个种。正常活性污泥混合液中的原生动物数量为 5 000~20 000/mL,70%~80%为纤毛虫。原生动物只能以游离的细菌为食;对于大量的、裹在凝絮体内的细菌,却无能为力。因此,活性污泥中的原生动物的数量与游离细菌的数量直接相关。

在活性污泥处理系统中,原生动物出现的规律是:先出现直接以有机物颗粒为食的小鞭毛虫和根足虫;随着细菌增殖,开始有了以细菌为食的纤毛虫;随着菌胶团的增加,固着型纤毛虫逐渐代替了游泳型纤毛虫;至污水处理系统正常运转时,以有柄纤毛虫占优势。这反映了食物

因素变化所引起的生态食物链的变化。一般认为,当曝气池中出现大量钟虫、等枝虫等固着型纤毛虫时,说明污水处理系统运转正常;反之,当出现大量鞭毛虫、根足虫等时,说明运转不正常。但不能一概而论。

原生动物作为指示生物的作用体现在以下几方面:① 根据原生动物和微型后生动物的种类,判断所培养的活性污泥的成熟程度。② 根据原生动物种类,判断活性污泥法处理效果的优劣。③ 根据原生动物个体形态的改变,判断水质变化和运行问题。例如,当溶解氧不足或其他环境条件恶化时,钟虫会由正常虫体向孢囊演变,产生许多变态。如果环境条件改善,虫体可恢复原状。原生动物个体形态的变化对进水水质和运行条件具有预警和预报作用。

4. 微型后生动物 活性污泥中出现的微型后生动物主要有轮虫、线虫和寡毛虫。它们多以细菌、原生动物及活性污泥碎片为食。在环境不利时,轮虫可形成胞囊,外有胞壳,以度过不良环境。一般说来,轮虫的出现反映有机质含量较低、水质较好。但轮虫大量出现则是污泥老化的表现。

线虫体形为圆形,在城市污水厂的活性污泥中,或在生物转盘、塔式生物滤池生物膜的厌氧区(或缺氧区),均有大量线虫存在。

活性污泥中的寡毛虫以颤体虫(又称颤蚯蚓)为代表,它是活性污泥中体形最大、分化较高的一种多细胞动物,在处理生活污水或某些工业废水的活性污泥、生物膜中均可见到。

(四) 活性污泥的培养与驯化

活性污泥的培养可分为间歇曝气培养和连续曝气培养。

1. 间歇曝气培养 活性污泥培养有接种污泥、驯化污泥和增殖污泥三个阶段。

① 接种污泥。从污水处理厂取得接种所需的活性污泥,投放到待启动的曝气池中,进行扩大培养。

② 驯化污泥。如果接种污泥与本厂的水质不同,需对菌种进行驯化。先进低浓度的废水,曝气一定时间(如 23 h),沉淀一定时间(如 1 h),排放上清液,再进同一浓度的废水,继续曝气培养。每种浓度运行 3~7 d,可观察到活性污泥数量增加。调高进水浓度,重复上述操作,直至进原废水。若活性污泥活性高、沉降性好,驯化结束。此时,进水流量可能没有达到设计要求。

③ 增殖污泥。将驯化好的活性污泥改用连续曝气培养。通过镜检和化学测定,确定培养进度。随培养时间的延长,活性污泥形成结构紧密的大颗粒絮体,沉降性能提高(沉淀 30 min 后混合液中的污泥体积与混合液体积之比 SV_{30} 高于 50%; SVI 在 100 mL/g 左右),活性污泥中大量出现钟虫等固着型纤毛虫和轮虫,表明活性污泥成熟。当曝气池内活性污泥的 $MLSS$ 达到 2000 mg/L 左右,进水达到设计流量时,活性污泥培养结束,正式投入运行。

2. 连续曝气培养 在处理生活污水和工业废水时,如果接种污泥与本厂的水质相符,可直接采用连续曝气培养活性污泥。活性污泥的接种量为曝气池有效体积的 5%~10%。启动初期(头几天),采用闷曝,溶解氧维持在 1 mg/L 左右;然后以小流量进水,每上调一个流量梯度,并维持一周的运行时间。随着进水流量的逐渐增大,溶解氧的浓度应逐渐提高。达到设计流量时,对于处理工业废水的曝气池,应维持如下条件:进水 BOD_5 为 200~300 mg/L, $MLSS$ 约 3 000 mg/L 左右,溶解氧为 2~3 mg/L;对于处理生活污水的曝气池,应维持:进水 BOD_5 为 150~250 mg/L, $MLSS$ 约 2 000 mg/L 左右,溶解氧为 1~2 mg/L。

判断活性污泥是否培养成熟的标准,与间歇曝气培养相同。

(五) 活性污泥的膨胀

在采用活性污泥法处理废水的运行过程中,常会遇到活性污泥膨胀问题。活性污泥膨胀分

为两类：一类是丝状细菌引起的丝状菌污泥膨胀，另一类是由非丝状细菌引起的菌胶团污泥膨胀。两类活性污泥膨胀的共同特征是：SVI(Sludge Volume Index)由正常活性污泥的 50~150 mL/g 增大至 200 mL/g 以上，沉降性能恶化。由于丝状菌污泥膨胀的发生频率较高，各国研究的重点也放在这一方面。

1. 诱发丝状菌污泥膨胀的微生物类群 诱发活性污泥丝状菌膨胀的微生物种类很多。在从世界各国收集的几千个样品中，已分离出 30 多种出现于丝状菌膨胀污泥中的微生物。其中常见的有诺卡氏菌属(*Nocardia*)、浮游球衣菌(*Sphaerotilus natans*)、微丝菌属(*Microthrix*)、发硫菌属(*Thiothrix*)、贝日阿托氏菌属(*Beggiatoa*)等。

国内于 20 世纪 70 年代末开始研究诱发活性污泥丝状膨胀的微生物。据报道，在上海市的污水处理厂中，诱发活性污泥丝状膨胀且出现频率较高的微生物是浮游球衣菌、微丝菌属、发硫菌属、贝日阿托氏菌属、亮发菌属、纤发菌属等。

2. 活性污泥丝状菌膨胀的成因 活性污泥丝状菌膨胀的主要原因在于絮体内菌胶团细菌与丝状细菌的生长比例失调，具体表现为：① 废水浓度过高时，曝气池缺氧抑制菌胶团细菌生长，促进耐低氧的球衣细菌的繁殖；② 废水浓度过低时，絮体内的菌胶团细菌得不到足够的养料，丝状细菌则能通过形成长长的丝状体来增大表面积，加强对养料的吸收。

关于活性污泥丝状菌膨胀的机制，至今还没有统一认识，存在多种学说。比表面学说认为：在单位体积中，呈丝状扩展生长的丝状细菌的比表面积大于菌胶团细菌，在对限制性营养物质的竞争上具有优势，菌胶团细菌则处于劣势，因此，丝状细菌的生长和繁殖就会超过菌胶团细菌而成为活性污泥的优势菌群，疏松的菌丝体导致活性污泥密度下降，即活性污泥丝状菌膨胀。比表面学说可解释低基质浓度下氮、磷缺乏引起的丝状菌膨胀。

3. 活性污泥丝状菌膨胀的控制对策 控制活性污泥丝状菌膨胀的对策是：① 调控环境条件，通过改变曝气池中的环境条件，促进菌胶团细菌的生长；② 调控细菌的代谢机能，利用菌胶团细菌和丝状细菌代谢机制上的差异，加速菌胶团细菌的生长，抑制丝状细菌的生长。

具体措施是：① 控制溶解氧。充分供氧，使曝气池内的溶解氧浓度维持在 2 mg/L 以上。② 控制有机负荷。BOD₅ 污泥负荷超过 0.38 kg/(kgMLSS·d) 时，易发生活性污泥丝状菌膨胀。宜将活性污泥保持在 0.2~0.3 kg/(kgMLSS·d)。③ 补充微量金属。投加微量金属元素，可提高菌胶团细菌的生长和代谢活性，有效地抑制污泥膨胀。它属于代谢机能调控方法。④ 改革工艺。丝状细菌(如浮游球衣菌)去除有机物的能力较强，对净化污水有积极意义，但它会使污泥沉降性能变差，影响出水水质。如果控制得当，使丝状细菌在活性污泥中不占优势，就可解决上述矛盾。常用工程手段为：将活性污泥法改为生物膜法(如在曝气池中投加填料改为生物接触氧化法)；将二沉池沉淀法改为气浮法；开发能克服活性污泥丝状菌膨胀的新工艺(如 A/B 法、A/O 系统、A²/O 系统、SBR 法等)。⑤ 生物选择器。在全混合曝气池中，基质没有明显的浓度梯度，由于菌胶团细菌对基质的亲和力低于丝状细菌，常处于抑制状态，易诱发污泥膨胀。在曝气池前面设置分格的高负荷接触池(即选择器)，可充分利用高进水浓度造成选择器中的高 F/M 值，促进菌胶团细菌的快速生长而成为优势菌群。在选择器中，占优势的菌胶团细菌能在短时间内吸附废水中的大部分可溶性有机物，并在后置的全混合曝气池中继续代谢和增殖；丝状菌则因基质限制而受到抑制，从而控制污泥的丝状菌膨胀。

二、好氧生物膜法

生物膜法指使废水流过生长在固定支承物表面上的生物膜，利用生物氧化作用和各相间

的物质交换,降解废水中有机污染物的方法。用生物膜法处理废水的构筑物有生物滤池、生物转盘、生物接触氧化池及生物流化床等。生物膜是生物膜法废水处理的基础。

(一) 生物膜的微生物学特征

1. 微生物种群的多样性 在活性污泥法中,增殖较慢的生物会随出水流失,难以栖息于污泥中。而在生物膜中,增殖很慢的生物也能生存。此外,有些微型后生动物对搅拌敏感,在活性污泥法中,这些种群容易受到冲击,在生物膜法中则可免受冲击。因此,与活性污泥相比,生物膜上微生物的种群多样性增加,在去除污染物上更具广谱性。

2. 优势微生物的区域性 在多段的生物膜法处理系统中,与净化程度相对应,不同区域会出现不同的微生物优势种群。据研究,没有污泥回流是各段微生物分异的重要原因。

3. 较长的食物链 与活性污泥相比,生物膜上原生和后生动物的比例提高。在生物膜上,不仅栖息着捕食细菌的生物,也存在更高营养级的生物,食物链明显长于活性污泥。

由于高营养级的生物多,食物链传递中能量消耗增大,污泥产量降低。实验证明,生物膜法的污泥产量可比活性污泥法少 20%左右;而且动物性成分高的污泥,固液分离良好,上清液大多较为透明。

4. 固定硝化细菌和脱氮细菌 硝化细菌的增殖较慢。在一般的活性污泥法中,这类细菌很容易流失。然而在生物膜法中,即使比硝化细菌增殖更慢的细菌也能被持留并稳定地生长。在低浓度有机废水的膜法处理系统中,硝化细菌甚至可成为生物膜的优势菌群。生物膜内常有厌氧微域,在这里可发生脱氮作用。与活性污泥法相比,生物膜法的脱氮效率明显较高。

5. 较高的微生物浓度 在生物膜法反应器(如生物滤池)中,微生物分布于反应器的整个空间,单位体积生物量远比活性污泥法高。例如,在生物流化床反应器中,污泥浓度高达 10~50 g/L,远远高于曝气池中的活性污泥浓度(2~4 g/L)。因此,单位容积的处理能力相对较高。

(二) 生物膜净化污水的原理

如图 11-3 所示,生物膜表面吸持着一层薄薄的污水,称为附着水层或结合水层,其外是自由流动的污水,称为运动水层。

当“附着水”中的有机物被生物膜中的微生物吸附、吸收、氧化分解时,附着水层中的有机物质浓度随之降低。由于运动水层中有机物浓度高,便向附着水层转移,并不断被微生物分解。微生物所需的氧气也沿空气→运动水层→附着水层途径进入生物膜。生物膜内微生物分解有机物的产物则沿相反方向移出膜外。

随着有机污染物的降解,生物膜也得到发展。初期形成的生物膜是好氧性的。膜厚度增加后,氧气向膜内扩散受到限制。生物膜出现分化,形成外部的好氧层、内部的厌氧层以及两者之间的兼性层。生物膜的分化有利于多种生物的共存。

生物膜不断增厚,附着于载体一面的厌氧区逐渐扩大,微生物获得营养物质也越加困难,最后导致生物膜老化、剥落,开始新的生物膜形成过程。

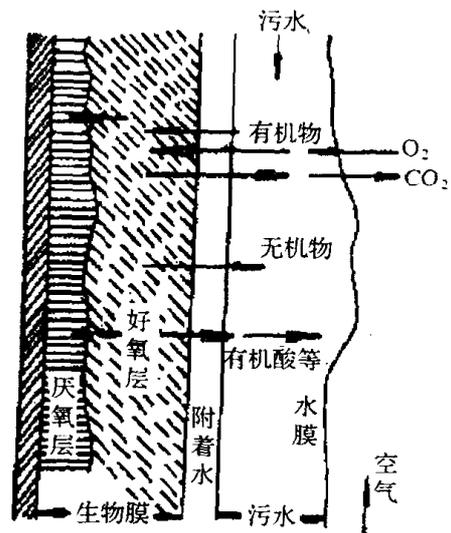


图 11-3 生物膜净化原理示意图

(三) 生物膜的微生物组成

根据功能不同,生物膜中的微生物类群可分为:生物膜生物、生物膜面生物及滤池扫除生物。生物膜生物以菌胶团细菌为主,辅以浮游球衣菌、藻类等,具有净化废水的功能。生物膜面生物主要由固着型纤毛虫(如钟虫)及游泳型纤毛虫(如斜管虫)组成,具有促进净化速度,提高处理效率的功能。滤池扫除生物主要由轮虫、纤毛虫、寡毛虫等组成,具有去除滤池污泥、防止污泥集聚和堵塞的功能。

1. 细菌和真菌 由于在生物膜中存在好氧、兼性厌氧和厌氧的小环境,适宜于多种微生物的生长。据观察,在生物膜的好氧层中常以专性好氧的芽孢杆菌属占优势;在厌氧层则能见到专性厌氧的反硫化弧菌属(*Desulfovibrio*)。生物膜中数量最多的是兼性厌氧细菌,主要有假单胞菌、产碱杆菌(*Alcaligenes*)、黄杆菌(*Flavobacterium*)、无色杆菌(*Achromobacter*)、微球菌(*Micrococcus*)、动胶杆菌(*Zoogloea*)。另外,还有大肠杆菌和产气杆菌等肠道杆菌。

生物膜上常见的丝状微生物有球衣细菌、贝氏硫细菌和发硫细菌等。后两种菌多存在于生物膜的厌氧区域。在好氧区域则可见丝状真菌,它们只存在于有溶解氧的层次内。在正常情况下,真菌常受细菌竞争抑制,只有在 pH 较低或在特殊的工业废水中,真菌的数量才可能超过细菌。

在生物膜处理系统中,不存在丝状菌污泥膨胀,因此存在丝状细菌对废水处理是有利的。

2. 原生动物 在洒滴池和生物转盘的生物膜中,出现频度较高的原生动物是纤毛虫和肉足虫,其中纤毛虫占多数。当基质和环境条件发生变化时,原生动物的优势种群也会改变。

3. 微型后生动物 生物膜上出现的后生动物有轮虫类、线虫类、昆虫类、腹足类、寡毛类等。轮虫类的种类与活性污泥大体相同,但个体数大得多。线虫类也明显较多。

(四) 好氧生物膜的培养

好氧生物膜的培养可分为:自然挂膜法、活性污泥挂膜法和优势菌种挂膜法。

1. 自然挂膜法 用泵缓慢地将带有自然菌种的工业废水泵入生物滤池,保持循环 3~7 d。接着,开始慢速连续进水,废水中的微生物附着于滤料上,以废水中的有机物为养料而生长繁殖。滤料上的微生物数量由少变多,逐渐形成微生物薄膜,即生物膜。此后,滤池自上而下形成分层的微生物相。当进水流量或水力表面负荷达到设计值,滤池出水指标接近排放要求时,完成生物膜的培养,进入正式运行。

2. 活性污泥挂膜法 以活性污泥作为接种物,与本厂废水组成混合液,用泵慢速泵入滤池,循环 3~7 d。接着,开始慢速连续进水。接种污泥中的微生物附着在滤料上,以废水中的有机物为养料而生长繁殖,逐渐形成生物膜。当各项指标达到设计要求时,结束生物膜培养工作,投入正式运行。

3. 优势菌种挂膜法 优势菌种是指从自然环境或废水处理中筛选、分离获得的,或通过遗传育种甚至通过基因工程获得的,对某种工业废水有强降解能力的菌株。将优势菌种与废水充分混合,用泵慢速将菌液泵入滤池,循环 3~7 d,使优势菌种粘附于滤料上。然后,开始慢速连续进水。当滤池内自上而下形成分层的微生物相,各项指标达到设计要求时,结束生物膜培养工作,投入正式运行。

第三节 废水厌氧生物处理的微生物学原理

废水厌氧处理法是利用厌氧微生物降解废水中的有机物的方法,也称厌氧消化或厌氧发

醇法。

一、厌氧生物处理的工艺条件

厌氧生物处理的微生物学过程见图 8-3,主要有三个阶段:水解发酵阶段,产氢产乙酸阶段和产甲烷阶段。由于厌氧生物处理是由多种菌群参加的序列生物反应,各种群对环境条件的要求各不相同,只有严格控制条件,才能发挥各种群的作用。需要控制的主要工艺条件是:

1. 温度 温度对有机物厌氧生物降解的速度有显著影响。中温性厌氧消化微生物的最适生长温度约为 35℃,高温性厌氧消化微生物的最适生长温度约为 53℃。在中温或高温厌氧处理中,应将温度分别控制在最适生长范围。

2. pH 值 在厌氧消化微生物中,产甲烷菌对 pH 值最为敏感。如果 pH 值低于 6.4 或高于 7.8,产甲烷菌的生长就会受到抑制。一般应将 pH 值控制在 6.8~7.8 范围。

3. 养料 厌氧消化微生物对碳、氮等营养物质的要求略低于好氧微生物。BOD₅:N:P 可控制在 200:5:1。但是,许多厌氧消化细菌含有独特的酶和其他成分,对一些微量元素有特殊的要求,应补充镍、钴、钼等营养元素。

4. 有毒物质 许多有毒物质会抑制厌氧微生物的生长和代谢,使厌氧消化过程遭到损害。有毒物质可以是无机物(如硫化物、氨、重金属),也可以是有机物(如苯、酚、氯仿),也可以是某些人工合成的有机物(如农药、抗生素、染料)。

5. 厌氧环境 厌氧消化微生物对氧敏感,反应器内应保持厌氧环境。厌氧生物处理设备必须密封,防止空气进入,这是因为在密封装置内,进水时带入的兼性厌氧菌会消耗氧,有助于造成厌氧环境。通常,高温发酵的氧化还原电势为-560~-600 mV,中温发酵为-300~-350 mV。

二、厌氧生物处理的特点

与好氧生物处理相比,厌氧生物处理具有如下显著的优点:① 无需供氧,可以节省供氧所需的设备和动力消耗;② 产生沼气,可以回收有机污染物中贮存的能量。若不考虑细胞合成,厌氧生物处理的甲烷回收率可达 90%以上;③ 厌氧污泥产量较少,可降低污泥处置费用;④ 在细胞合成量较低的情况下,营养物的需要量也相对较少,可降低运行费用;⑤ 厌氧微生物对某些难降解物质和有毒有机物具有独特的转化降解能力,如氯代芳烃、氯仿、三氯乙烯及硝基苯类等。

但厌氧生物处理也有一些不足,如反应器启动时间较长,对废水负荷、毒物及温度的冲击较敏感,对高浓度有机废水处理不能达标,需作补充处理。

三、厌氧生物处理的发展

早在 1881 年,Mouras 就发明了处理生活污水的自动净化器。1896 年英国出现了第一座用于处理生活污水的厌氧消化池,所产生的沼气用于街道照明。至 1914 年,美国有 14 座城市建立了厌氧消化池。二战结束后,厌氧处理技术的发展掀起了高潮。20 世纪 40 年代在澳大利亚出现了连续搅拌的厌氧消化池,改善了厌氧污泥与废水的混合状况,提高了处理效率。但由于微生物(即厌氧活性污泥)与废水(或废料)完全混合,反应器的污泥停留时间(SRT)与废水停留时间(HRT)相同,难以取得高浓度的活性污泥,处理效果差。此时的厌氧处理技术主要用于污泥与粪肥的消化,尚不能经济地用于工业废水的处理。

20世纪50年代中期, Schroepter 根据活性污泥法的原理提出了厌氧接触工艺。在连续流搅拌池反应器后, 增设了出水沉淀池和污泥回流装置, 使部分厌氧污泥能重新返回反应器中, 从而提高了反应器中污泥的浓度, 使厌氧污泥停留时间得到延长。与此相应, 处理效率与负荷也大幅度提高。这是厌氧生物处理技术发展中的一个里程碑。

随着生物发酵中固定化技术的发展, 人们认识到提高反应器中污泥浓度的重要性。于是, 基于微生物固定化原理的高速厌氧反应器应运而生。第一个技术性突破出现于20世纪60年代末, Young 和 McCarty 发明了厌氧滤器(Anaerobic Filter); 70年代初又出现了第二个技术性突破, Lettinga 等发明了上流式厌氧污泥床(Up-flow Anaerobic Sludge Bed, UASB)反应器。厌氧滤器和上流式厌氧污泥床的发明, 促进了高效厌氧生物反应器的研究。新型高效厌氧反应器(例如, 厌氧流化床、膨胀颗粒污泥床及厌氧内循环反应器)不断涌现。

高效厌氧反应器的发展大大提高了厌氧生物处理的负荷和效率, 使废水停留时间缩短至几小时, 成了高浓度工业有机废水处理的首选技术。

四、UASB 反应器

UASB 反应器由 Lettinga 等人于 1972—1978 年研制开发, 经历了 360 L、6 m³、30 m³ 和 200 m³ 等逐次放大试验。20 世纪 80 年代初开始在高浓度工业有机废水的处理中广泛应用。据不完全统计, 目前全球至少有 128 座生产性 UASB 反应器。其中, 规模最大的 UASB 反应器达 5 500 m³ (1982 年建成), 应用于土豆淀粉加工废水的处理, 其有机负荷高达 17~20 kgCOD/(m³·d), 每天产生沼气 2 000 多立方米, COD 去除率 80%~85%。

UASB 反应器具有结构紧凑、处理能力大、无机械搅拌、处理效果好以及投资费用省等优点。其应用正在迅速扩大。

(一) UASB 反应器的基本构造

UASB 反应器系统如图 11-4 所示。它的基本构造包括: ①污泥床; ②悬浮污泥层; ③沉淀区; ④三相分离器。

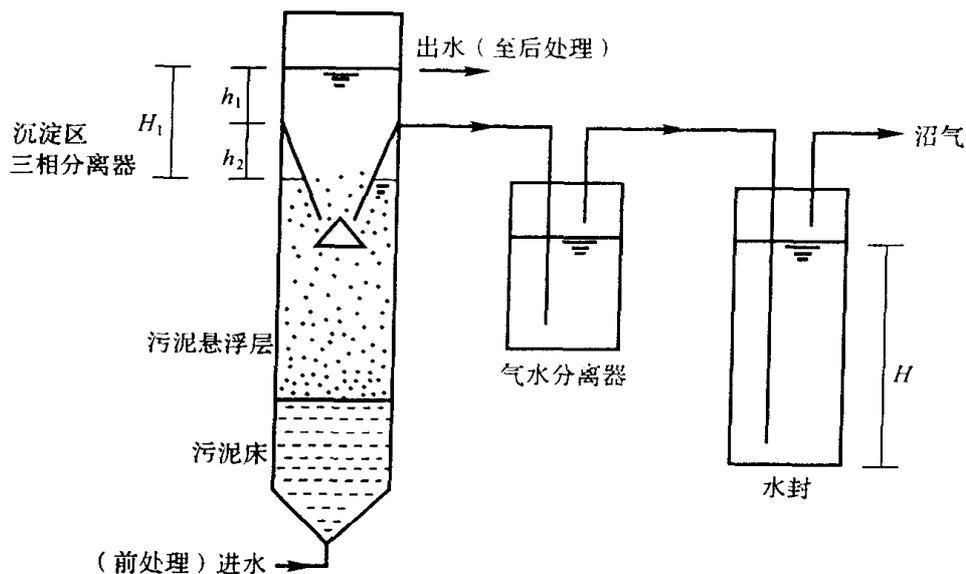


图 11-4 UASB 反应器系统

UASB 反应器各组成部分的功能、特点及工艺要求分述如下:

1. 污泥床 污泥床位于 UASB 反应器的底部(如图 11-3 所示),具有很高的污泥生物量,污泥浓度(MLSS)一般为 10~80 g/L,可高达 100~150 g/L。污泥以颗粒污泥的形态存在,活性生物量(或细菌)占 70%~80%以上,生物相组成比较复杂,主要是杆菌、球菌和丝状菌等。污泥粒径在 0.5~5 mm,具有优良的沉降性能,沉降速度为 1.2~1.4 cm/s,其典型的污泥容积指数(SVI)为 10~20 mL/g。

污泥床的容积一般占整个 UASB 反应器的 30%,但它对有机物的降解量一般可占整个反应器的 70%~90%。污泥床对有机物的有效降解,可产生大量沼气,沼气泡经过积累和合并逐渐形成较大的气泡,气泡上逸使整个污泥床得到良好混合。

2. 污泥悬浮层 悬浮污泥层位于污泥床的上部,约占整个 UASB 反应器的 70%,污泥浓度低于污泥床,通常为 15~30 g/L,由高度絮凝的污泥组成,一般为非颗粒污泥,其沉速小于颗粒污泥,污泥容积指数一般在 30~40 mL/g 之间,来自污泥床的上升气泡可使悬浮污泥层得到良好混合。悬浮污泥层中絮凝污泥的浓度自下而上逐渐减小。它对有机物的降解量占整个 UASB 反应器的 10%~30%。

3. 沉淀区 沉淀区位于 UASB 反应器的顶部,其作用是使水流夹带的固体颗粒(主要是悬浮污泥层的絮凝污泥)沉淀下来,并沿沉淀区底部的斜壁重新回到反应区(包括污泥床和污泥悬浮层),以保证反应器中污泥不致流失。通过调整沉淀区的水位,可调整反应器集气室的有效空间。

4. 三相分离器 三相分离器一般设在沉淀区的下部,有时也设在反应器的顶部,具体视反应器的型式而定。三相分离器由气体收集器和折流挡板组成。它的主要作用是分离气体(沼气)、固体(污泥)和液体(废水),将沼气导入集气室,将处理出水引入出水区,将固体颗粒返回反应区。三相分离器是 UASB 反应器的主要特点之一。它相当于传统污水处理工艺中的二沉池,并具有污泥回流的功能。三相分离器的合理设计是保证其正常运行的重要条件。

(二) UASB 反应器的工作原理

UASB 反应器的主体是一个无填料的设备,它的构造和运行具有以下几个突出的特点:① 高浓度高活性的颗粒污泥。这种污泥是在一定条件下,通过控制反应器的水力性状和有机污染物负荷培养而成的。颗粒污泥的好坏直接影响 UASB 反应器的运行性能。② 具有集泥、水和气分离于一体的三相分离器。三相分离器可以自动分离泥、水、气,起到澄清出水、滞留污泥、回收沼气的作用。③ 自动搅拌。通过产气和气泡上逸,混合液自动搅拌,操作管理简便。

在 UASB 反应器的运行中,废水以一定的流速自底部进入反应器,反应器内的上升流速一般为 0.5~1.5 m/h,宜控制在 0.6~0.9 m/h 之间。水流依次流经污泥床、悬浮污泥层、三相分离器和沉淀区。进水有机物与污泥床和悬浮污泥层中的微生物充分接触并被厌氧分解。产生的沼气上逸,将颗粒污泥托起。由于产生大量气泡,即使在较低的有机和水力负荷下也能看到污泥床明显的膨胀。随着产气量的增加,气泡上升所致的搅拌作用(在上升过程中,微小的沼气泡可相互结合而变成较大的气泡,将颗粒污泥携带至反应器的上部。气泡破裂后,绝大部分颗粒污泥返回到反应区)渐趋剧烈,使污泥床呈沸腾和流化状态。在气体搅拌下,沉淀性能较差的絮体污泥被浮选至反应器上部,形成悬浮污泥层;沉淀性能良好的颗粒污泥则淀积于反应器下部,形成高浓度的污泥床。随着水流的上升流动,气、水、泥三相混合液(消化液)上升至三相分离器中,气体遇到反射板或挡板后折向集气室而被有效分离;污泥和水进入上部的静止沉淀区,在重力作用下发生泥水分离。由于三相分离器的作用,UASB 反应器中的污泥存在一个沉淀、分离和再絮凝的良好环境,有利于污泥沉降性能的改善。

(三) 颗粒污泥的培育

UASB 反应器是各种厌氧反应器中处理负荷最高的装置。之所以有如此高的处理能力,是因为在反应器内以产甲烷细菌为主体的厌氧微生物形成了粒径为 1~5mm 的颗粒污泥。培育具有良好沉降性能的颗粒污泥,是成功运行 UASB 反应器的关键。

1. 颗粒污泥的培育过程

研究表明,UASB 反应器中颗粒污泥的形成过程可分为三个阶段:

第一阶段为启动与污泥活性提高阶段。在此阶段,反应器的有机负荷一般控制在 2.0 kgCOD/(m³·d)以下,运行时间约需 1~1.5 个月。值得注意的是:① 最初污泥负荷应低于 0.1~0.2 kgCOD/(kgTS·d);② 在废水中的各种挥发性脂肪酸没有充分分解之前,不要增加反应器的负荷;③ 应将反应器内的环境条件控制在有利于厌氧微生物(主要是产甲烷细菌)繁殖的范围;④ 投产时,使反应器有效截留重质污泥并允许多余(稳定性差的)污泥流出反应器。

第二阶段为颗粒污泥形成阶段。在此阶段,有机负荷一般控制在 2.0~5.0 kgCOD/(m³·d)。由于有机负荷的逐渐提高,粒径较小和沉降性较差的污泥随出水流出反应器,重质污泥则留在反应器内。由于产气及其搅拌作用,反应器内的污泥在重质污泥颗粒的表面富集、絮凝并生长繁殖,最终形成粒径为 1~5 mm 的颗粒污泥。此阶段也需 1~1.5 个月。

第三阶段为污泥床形成阶段。在此阶段,反应器的有机负荷大于 5 kgCOD/(m³·d)。随着有机负荷的不断增加,反应器内的污泥浓度逐步增大,颗粒污泥床的高度也相应增高。

正常运行时,有机负荷可逐渐增至 30~50 kgCOD/(m³·d)或更高。若接种污泥充足,操作控制得当,颗粒污泥床的形成约需 3~4 个月。

2. 颗粒污泥的类型

UASB 反应器中的污泥有三种不同的存在形态,即絮凝污泥、无载体颗粒污泥和以载体为核心的颗粒污泥。絮凝污泥是在反应器运行中从污泥床洗脱出来的轻质污泥;无载体颗粒污泥是比重较大的固体颗粒通过自身絮凝而逐渐形成的颗粒污泥;有载体颗粒污泥是通过污泥颗粒与废水中的悬浮粒子或人工投加的无机物质(如 Ca²⁺、Mg²⁺和 Ba²⁺)接触并附着生长而成的颗粒污泥。颗粒污泥分为三种类型:① 球形颗粒污泥。主要由杆菌和丝菌组成,也称为“杆菌颗粒污泥”,粒径约 1~3 mm。② 松散球形颗粒污泥。主要由松散互卷的丝菌组成,丝菌附着在惰性粒子表面,也称为“丝菌颗粒污泥”,粒径约 1~5 mm;③ 紧密球状颗粒污泥。主要由甲烷八叠球菌组成,粒径较小,一般为 0.1~0.5 mm。

3. 颗粒污泥的性质 颗粒污泥一般呈球形或椭球形,其颜色呈灰黑或褐黑色,肉眼可观察到颗粒的表面包裹着灰白色的生物膜。颗粒污泥的密度一般为 1.01~1.05 g/cm³,粒径为 0.5~3 mm(最大可达 5 mm),污泥指数(SVI)为 10~20 mL/gSS(与颗粒的大小有关),沉降速度多在 5~10 mm/s。成熟颗粒污泥的 VSS/SS 值为 70%~80%。颗粒污泥含有碳酸钙等无机盐晶体以及纤维、砂粒等,还含有多种金属离子。颗粒污泥中的碳、氢、氮的含量分别为 40%~50%、7%和 10%左右。

第四节 废水生物脱氮的微生物学原理

废水中的氮一般以有机氮、氨氮、亚硝酸盐氮和硝酸盐氮等四种形态存在。生活污水中的氮则主要以有机氮和氨氮的形态存在,其中有机氮 40%~60%,氨氮占 50%~60%,亚硝酸盐

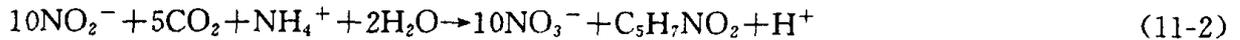
氮和硝酸盐氮占 0~5%。

废水生物脱氮涉及三种微生物反应：有机氮的氨化作用、氨氮的硝化作用和硝氮的反硝化作用。其中，主要反应是硝化作用和反硝化作用。

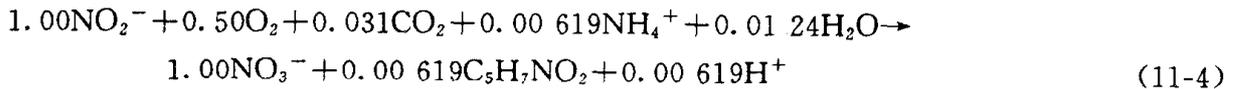
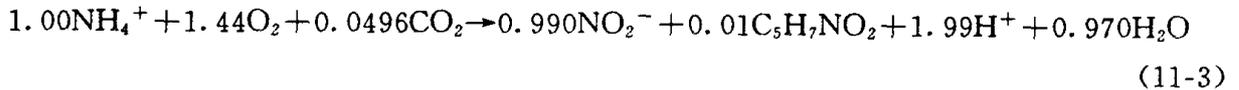
一、硝化作用

硝化作用的整个过程为： $\text{NH}_3 \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow (\text{NO}) \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ 。具体分两步进行(式8-1和式8-2)。由反应式 8-1 和 8-2 可知，亚硝化单胞菌可比硝化杆菌获得更多的能量。假如细胞产率与产生的能量成正比，那么前者的细胞产率也高于后者。

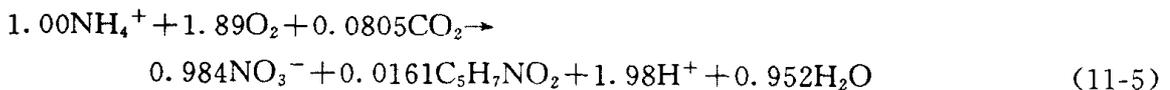
如果亚硝化单胞菌和硝化杆菌的细胞采用经验式 $\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2$ 表示，则其生物合成反应为：



细胞生长是产能反应(8-1 和 8-2)与合成反应(11-1 和 11-2)的耦合，其效率可用细胞产率(g VSS/g NH_4^+-N 或 NO_2^--N)表示。根据实验测定，亚硝化单胞菌和硝化杆菌的细胞产率可分别取 0.08 g VSS/g NH_4^+-N 和 0.05 g VSS/g NO_2^--N ，则其合成反应为：



整个硝化反应为：



由反应式 11-5 可知，硝化作用的耗氧量、耗碱量和细胞产率分别为：4.32 g $\text{O}_2/\text{g NH}_4^+-\text{N}$ ；7.07 g $\text{CaCO}_3/\text{g NH}_4^+-\text{N}$ 和 0.13 g VSS/g NH_4^+-N 。

二、反硝化作用

反硝化作用的整个过程可表示为： $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ 。各酶促反应间的相互关系如图 11-5 所示。反硝化作用实质上是以硝酸盐为电子受体的氧化还原反应。对于氧化还

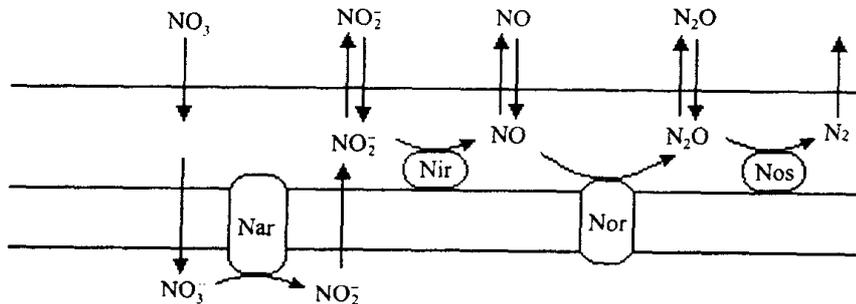


图 11-5 细菌的反硝化作用

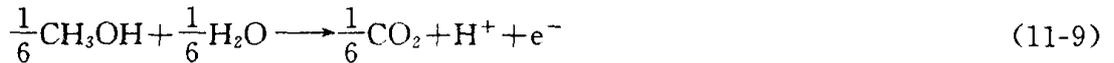
Nar: 硝酸还原酶 Nir: 亚硝酸还原酶 Nor: NO 还原酶 Nos: N_2O 还原酶

原反应，一般采用半反应来建立化学计量关系。在生物脱氮系统中，除了硝酸(盐)，还常存在氧和亚硝酸(盐)。以氧、硝酸(盐)和亚硝酸(盐)作电子受体的半反应分别为：

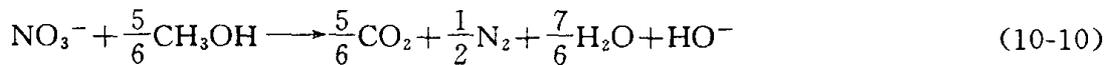


比较反应式 11-6 和 11-7 可知,作为电子受体,1 g NO_3^- -N 相当于 2.86 g O_2 。按照这一当量关系,如果将硝化产生的硝酸(盐)用于反硝化反应,并用污水自身的有机物作电子供体,则可大幅度降低氧的消耗。

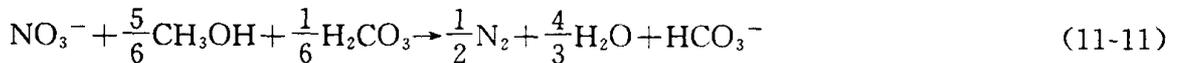
在生物脱氮中,常用甲醇作电子供体。以甲醇作电子供体的半反应为



结合半反应 11-7 和 11-9,可得

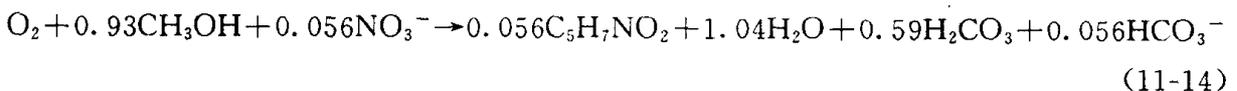
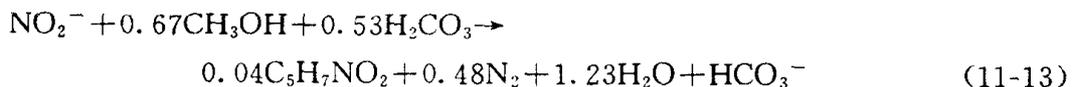
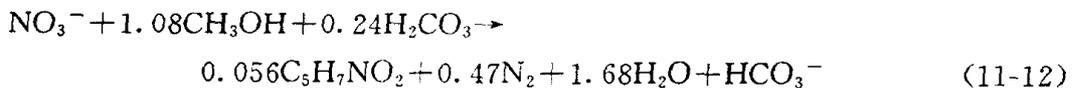


反硝化过程产生的 HO^- 通常与碳酸反应生成 HCO_3^- , 因而式 11-10 可改写为



根据反应式 11-11,理论上还原 1 g NO_3^- -N 所需的甲醇数量为 1.9 g。但以有机物为基质时,反硝化细菌不仅将它用作电子供体进行产能(反硝化)反应,而且还将它用作碳源合成细胞物质。因此,还原 1 g NO_3^- -N 所需的甲醇数量要比理论值(按式 11-11 计算)多。用于反硝化反应和用于合成细胞物质的有机物的比例,与基质种类、微生物类群及其所处的环境条件有关,需通过试验测定。

以甲醇为基质时,McCarty 等人实验测得的计量关系为



根据反应式 11-12,如果考虑细胞合成,还原 1 g NO_3^- -N 需要 2.47 g 甲醇(实测值为 2.5~3.0 g 甲醇/g NO_3^- -N)。此外,甲醇还用于还原废水处理系统中存在的亚硝酸(盐)和氧。总甲醇需要量为:

$$M = 2.47(\text{NO}_3^- - \text{N}) + 1.53(\text{NO}_2^- - \text{N}) + 0.87\text{DO} \quad (11-15)$$

式中, M —甲醇需要量, mg/L;

$\text{NO}_3^- - \text{N}$ — $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 去除量, mg/L;

$\text{NO}_2^- - \text{N}$ — $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 去除量, mg/L;

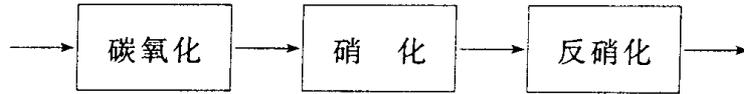
DO — DO 去除量, mg/L。

三、废水生物脱氮工艺

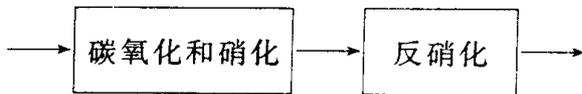
根据生物脱氮原理,环境工作者先后研究和开发了多种废水生物脱氮工艺,并在实际工程中应用。按照碳源,这些工艺可分为外碳源工艺和内碳源工艺;按照工艺流程,可分为传统工艺

和前置反硝化工艺；按照微生物的存在状态，可分为悬浮生长型和附着生长型工艺。目前常见的三种生物脱氮工艺流程为：

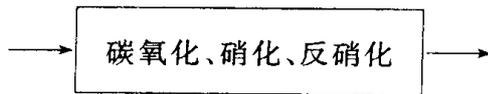
① 分级碳氧化、硝化、反硝化工艺



② 结合碳氧化和硝化；分级反硝化工艺



③ 结合碳氧化、硝化、反硝化工艺



上述各种流程可选用活性污泥法或生物膜法来实施，对于多级生物脱氮系统，还可采用不同的反应器组合。

四、A/O 生物脱氮工艺

A/O (Anoxic/Oxic) 生物脱氮工艺是一种前置反硝化工艺，其流程如图 11-6 所示。它是目前研究和实际应用较多的生物脱氮工艺。该工艺具有流程简短、工程造价低的优点。

与传统的生物脱氮工艺相比，A/O 生物脱氮工艺可充分利用原污水中的有机物作碳源进行反硝化，无需外加碳源，并能同时降低 BOD_5 和硝氮；A/O 生物脱氮工艺将反硝化段设在硝化段之前，当原水中碱度不足时，可利用反硝化过程中产生的碱度来补偿硝化过程消耗的碱度。此外，A/O 工艺只有一个污泥回流，混合菌群交替处于缺氧和好氧以及有机物浓度高和低的状况，有利于改善污泥的沉降性能，控制污泥膨胀。

在该工艺中，对硝化池混合液回流的控制十分重要。回流比过低，会导致脱氮池中 BOD_5/NO_3^- 过高，反硝化细菌会因缺少硝氮而降低反硝化速率；回流比过高，则会导致 BOD_5/NO_3^- 过低，反硝化细菌又会因缺少碳源而降低反硝化速率。

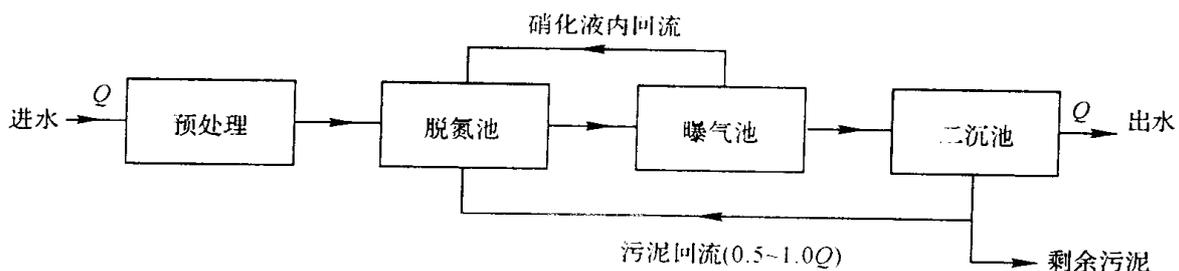


图 11-6 A/O 生物脱氮工艺

第五节 废水生物除磷的微生物学原理

一、聚磷细菌及其过度摄磷作用

聚磷细菌含有异染粒(图 11-7)，大小约 $0.5 \sim 1 \mu m$ ，是无机磷酸盐的聚合物，磷酸盐的个

数(n 值)在 $2\sim 10^6$ 之间。其功能是贮藏磷和能量,并降低渗透压。聚磷细菌也往往含有聚- β -羟基丁酸(PHB,图 11-8),由多个(n 值一般大于 10^6)羟基丁酸聚合而成,不溶于水,具有贮藏能量、碳源并降低渗透压的作用。当巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)在含乙酸或丁酸的培养基中生长时,细胞内贮藏的 PHB 可达干重的 60%。近年来发现,许多细菌能合成 PHB 类化合物,结构稍有不同,这类化合物统称为聚羟链烷酸(polyhydroxyalkanoate, PHA)。聚磷细菌主要有不动杆菌、假单胞菌、气单胞菌、黄杆菌等 60 多种。

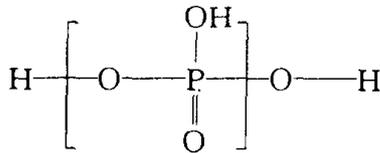


图 11-7 磷酸盐聚合物(异染粒)

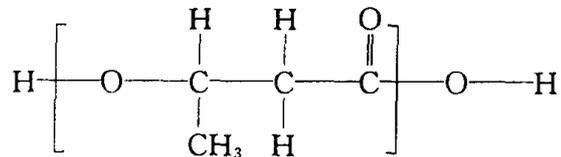


图 11-8 聚- β -羟基丁酸

在厌氧条件下,聚磷细菌水解异染粒产生 ATP,同时释放出磷酸盐[(聚磷) $_n + \text{ADP} \rightarrow (\text{聚磷})_{n-1} + \text{ATP}$],即厌氧释磷。利用 ATP 以主动运输方式将细胞外的有机物(低分子有机酸)摄入细胞内,形成乙酰 CoA,然后从 NADH_2 接受电子,合成 PHB 等有机颗粒,并贮存在细胞内。在好氧条件下,聚磷细菌分解 PHB,合成大量 ATP;这些 ATP 小部分直接用于生命活动,大部分用于吸收胞外磷酸盐并合成异染粒,即好氧摄磷。过度摄磷(luxury phosphorus uptake)就是指聚磷细菌所摄取的磷酸盐超过其生长所需的现象。

从能量的角度看,过度摄磷是一个能量增值的过程。虽然在吸收胞外基质和合成 PHB 的过程中,聚磷细菌通过水解异染粒和利用 NADH_2 消耗了部分能量,但它却以 PHB 的形式贮存了更多能量。在随后的 PHB 好氧分解中,释放的能量用于摄取胞外磷酸盐并合成聚磷,能量增量由潜在的 PHB 形态转化为直观的聚磷形态。换言之,经过厌氧释磷与好氧摄磷的一次循环,细胞内聚磷的数量增加了。在厌氧条件下,聚磷消失得越彻底,吸收的胞外基质越多,合成的 PHB 量越大;在好氧条件下,PHB 氧化分解得越完全,释放的能量越大,合成的聚磷越多,摄取的胞外磷酸盐也越多。

二、废水生物除磷工艺

(一) 生物除磷工艺机理

在常规的好氧生物处理中,只有少量磷用于微生物的生长,大部分磷以磷酸盐的形式随二级处理出水排入受纳水体,磷占活性污泥干重的 1.5%~2.0%。但是,在厌氧-好氧交替运行时,聚磷细菌积累磷的水平可比普通活性污泥高 3~7 倍。

利用聚磷细菌的过度摄磷作用(干细胞含磷量可达 6%~8%,甚至 10%),并通过排放剩余污泥即可实现生物除磷。

(二) A/O 生物除磷工艺

A/O 生物除磷工艺的流程与 A/O 生物脱氮工艺(图 11-6)类似。在该工艺中,聚磷细菌在厌氧条件下将细胞中的磷释放,然后进入好氧状态,并在好氧条件下摄取更多的磷,将含磷高的污泥以剩余污泥的方式排出处理系统,从而降低处理出水的磷含量。对于 P/BOD_5 之比很低的废水,可取得很好的除磷效果。对于 P/BOD_5 之比较高的废水,由于 BOD_5 负荷低,剩余污泥产量少,处理效果不尽人意。若对处理出水的磷含量要求严格(总磷 $< 1\sim 0.5 \text{ mg/L}$),则采用 A/O 工艺较难达标。

复习思考题

1. 废水处理可分几级？常用的方法有几种？
2. 废水生物处理有哪些类型？
3. 简述活性污泥法处理废水的机理。
4. 简述关于活性污泥丝状菌膨胀的比表面学说。
5. 工程上控制活性污泥丝状菌膨胀的措施有哪些？
6. 生物膜的微生物学特征有哪些？
7. 简述生物膜净化污水的原理。
8. 简述好氧生物膜的培养方法。
9. 简述厌氧生物处理的微生物学过程与工艺条件。
10. 厌氧生物处理的特点有哪些？
11. 简述 UASB 反应器的构造和工作原理。
12. 如何培育厌氧颗粒污泥？
13. 简述废水生物脱氮的微生物学原理。
14. 目前常见的三种生物脱氮工艺流程的特点是什么？
15. 简述废水生物除磷的微生物学原理。

第十二章 环境监测中的微生物学方法

环境监测是了解环境现状的重要手段,它包括化学分析、物理测定和生物监测三个部分。生物监测是利用生物对环境污染所发出的各种信息来判断环境污染状况的过程。生物长期生活于自然环境中,不仅能够对多种污染作出综合反映,也能对污染的历史状况做出反映。因此,生物监测取得的结果具有重要的参考价值。微生物监测是生物监测的重要组成部分,具有其独特的作用。

第一节 水质的细菌学检测

一、细菌总数

细菌总数是指将 1 mL 水样(原水样或经稀释的水样)放在营养琼脂培养基上,于 37℃ 培养 24h 后,所生长的细菌菌落总数。细菌总数指标具有相对的卫生学意义。菌数愈高,表示水体受有机物或粪便污染愈重,被病原菌污染的可能性亦愈大。

细菌总数的测定结果常用“cfu/mL”或“个/mL”表示。因为在测定操作中,以成双(双球菌等)、成链(链球菌、链状杆菌等)和成堆(葡萄球菌、四联球菌、八叠球菌等)状态存在的细菌不可能被完全打散成单个细胞;水样与营养琼脂混合时也不可能保证各个细胞彼此分离而单独长成菌落;因此培养基上出现的菌落可能来自一个细菌,也可能来自多个细菌。测定结果以“cfu/mL”表示更为确切。

细菌总数只是一个相对指标。每种细菌都有其独特的营养要求和生理特性,一种培养基和一种培养条件很难满足所有细菌的需要。而在实际工作中,细菌总数却是采用一种培养基和一种培养条件测定的。因此,这样测得的细菌总数并不是水样中的实际细菌总数。在测定条件下不能生长或生长缓慢的细菌均可能被遗漏。另外,人工培养基与培养条件不同于自然水体,即使水样中的所有细菌都能生长,测定值也与实际细菌总数有别。

根据水样中的细菌总数,可将天然水体划分为几类:细菌总数 $10^1 \sim 10^2$ cfu/mL,极清洁水体; $10^2 \sim 10^3$ cfu/mL,清洁水体; $10^3 \sim 10^4$ cfu/mL,不太清洁水体;细菌总数 $10^4 \sim 10^5$ cfu/mL,不清洁水体;大于 10^5 cfu/mL,极不清洁水体。我国生活饮用水的国家标准(GB5749-1985)规定,生活饮用水中的细菌总数不得超过 10^2 cfu/mL。

水体中测得的细菌总数较高或增大,说明该水体受有机物或粪便污染,但不能说明污染物的来源,也不能判断病原微生物的存在与否。

二、腐生细菌数

自然水体中腐生细菌的数量与有机物浓度成正比。因此,测得腐生细菌数或腐生细菌数与

细菌总数的比值,即可推断水体的有机污染状况。研究证明,这种推断与实测结果十分吻合。根据水体中腐生细菌的数量,可将水体划分为多污带、中污带和寡污带(表 12-1)。

按照腐生细菌数与细菌总数的比值,则可将水体分为 α -腐生带、 β -腐生带和多-腐生带(表 12-2)。

表 12-1 污水带的划分及其特征

污水带特征	多污带	甲型中污带	乙型中污带	寡污带
腐生细菌数(个/mL)	数十万至数百万	数十万	数万	数十至数万
有机物	含大量有机物,主要是蛋白质和碳水化合物	主要是氨和氨基酸	有机物含量少	有机物含量极微
溶解氧	极低或几乎没有,厌氧性	少量,半厌氧性	较多,需氧性	很多,需氧性
BOD ₅	非常高	较高	较低	很低

表 12-2 细菌数与腐生带的划分

样点号	细菌总数($\times 10^6$ 个/mL)		腐生细菌数($\times 10^3$ 个/mL)		腐生菌数/总菌数(%)	腐生带
	波动范围	平均	波动范围	平均		
1	1.7~3.3	2.5	0.2~1.9	1.1	0.04	β -腐生带
2	1.6~3.4	2.4	0.9~3.0	2.0	0.08	β -腐生带
3	1.9~3.0	2.5	0.2~6.0	2.9	0.11	β -腐生带
4	4.3~5.0	4.6	9.7~16.5	13.3	0.30	α -腐生带
5	1.8~3.6	2.6	1.4~6.2	3.0	0.11	β -腐生带
6	3.5~6.8	4.8	59.2~175.2	116.0	2.42	多-腐生带
7	3.1~4.4	3.7	19.2~20.5	20.0	0.54	α -腐生带
8	2.0~2.7	2.3	10.3~36.2	20.2	0.84	α -腐生带
9	2.3~6.9	4.0	10.8~147.6	64.9	1.62	多-腐生带

三、粪便污染的指示菌

人畜粪便中携带着多种微生物,其中有些是肠道内的正常菌群,对人体无害,有些则是病原微生物,对健康有害。如果带有致病菌的粪水排入天然水体,就会污染水源,引发多种肠道疾病,甚至使某些水介传染病暴发流行。因此,有必要对水体的粪便污染情况进行监测。

直接检测致病菌的操作十分烦琐。此外,由于水中的致病菌较少,直接检测也很困难,即使检测结果阴性,也不能保证水中不含致病菌。因此,在水质卫生学检查中,通常采用易检出的肠道细菌作为指示菌,取代对致病菌的直接检测。若水样中检出这类指示菌,即认为水体曾受粪便污染,有可能存在致病菌。检出的指示菌越多,污染越严重。只有在特殊情况下,才直接检验水中的致病菌。

(一)指示菌的理想条件

作为理想的粪便污染指示菌,应符合如下条件:① 该菌大量存在于人粪中,数量高于病原

菌；② 在受人粪污染的水体中该菌易于检出，而在未受人粪污染的水体中则无此菌；③ 在水体中该菌不会自行繁殖；④ 在水体中该菌的存活时间应长于致病菌，对氯与臭氧等消毒剂以及其他不良因素的抵抗力强于致病菌；⑤ 该菌检测方法简捷；⑥ 该菌适用于淡水、海水等各种水体。

由于没有一种细菌全部满足上述条件，因此无法找到理想的指示菌。在实际工作中，通常选用相对合适的菌株作为粪污指示菌。

(二)较适宜的指示菌

在卫生细菌学检验中，大肠菌群(coliform group, 简称 coliform)、粪链球菌(*Streptococcus faecalis*)、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)常用作粪污指标菌。其中，大肠菌群在粪便中的数量较多，随粪便排出体外后，存活时间与肠道病原菌大致相同，检验方法简单易行，因此是较为适宜的粪污指标菌。

(三)大肠菌群

1. 大肠菌群的特征 大肠菌群是指一群需氧及兼性厌氧的革蓝氏阴性无芽孢杆菌。在 37℃ 培养 24h，能使乳糖发酵产酸产气。大肠菌群以埃希氏菌属为主，另有柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)等。

在粪便中，大肠菌群的数量极大，成人每日随粪便排出的菌数高达 $5 \times 10^{10} \sim 100 \times 10^{10}$ 个。在外界环境中，大肠菌群的存在与人类活动有关。在人迹罕至的高山土中，几乎不存在大肠菌群。越靠近人类居住和生产的地区，大肠菌群的数量也越多。在经常施用粪肥的菜园土中，大肠菌群非常丰富。

在某些情况下，需对大肠菌群作进一步的分类鉴定。常用鉴定试验有：吲哚试验、甲基红试验、V. P. 试验(Voges-Proskauer test, 简称 V. P. 试验)及柠檬酸钠利用试验(表 12-3)。

若检出大肠埃希氏菌，则说明水体新近受到粪便污染。

表 12-3 大肠菌群的鉴别

菌名	吲哚试验	甲基红试验	V. P. 试验	柠檬酸钠利用试验	氧化酶试验	运动性
大肠埃希氏菌	+	+	-	-	-	±
弗氏柠檬酸杆菌	-	+	-	+	-	+
产气肠杆菌	-	-	+	+	-	+
克雷伯氏菌属	±	-	+	+	-	-

为了排除土壤等自然环境中原有的大肠菌群的干扰，可在检测中将培养温度提高至 44℃。能在 44℃ 生长并发酵乳糖产酸产气的大肠菌群主要来自粪便，被称为“粪大肠菌群”(fecal coliform)。能在 37℃ 生长并发酵乳糖产酸产气的大肠菌群，被称为总大肠菌群(total coliform)。据调查，人粪中粪大肠菌群占总大肠菌群数的 96.4%。

2. 大肠菌群的检测 常用的大肠菌群的检测方法有发酵法与滤膜法。

① 发酵法。亦称多管发酵法或三管发酵法。以不同稀释度的样品分别接种乳糖胆盐发酵培养基(或其他乳糖发酵培养基)各数管。培养 24 h 后，观察培养结果。若观察到乳糖发酵产酸产气现象，称为阳性反应。记下阳性反应的试管数，查专用统计表求出大肠菌群的最可能数

(MPN)。

② 滤膜法。选用孔径为 0.45~0.65 μm 的微孔滤膜,抽滤一定数量的水样,使水样中的细菌截留在滤膜上。然后,将滤膜贴在选择性培养基上,培养后直接计数滤膜上的大肠菌群菌落,算出每 100 mL 水样中含有的总大肠菌群数。

3. 大肠菌群指标

在水质卫生学检查中,常用“大肠菌群指数”和“大肠菌群值”作指标。大肠菌群指数是指每 100 mL 水中所含的大肠菌群细菌的个数。大肠菌群值则是指检出一个大肠菌群细菌的最少水样量(毫升数)。两者间的关系可表示为:

$$\text{大肠菌群值} = \frac{100}{\text{大肠菌群指数}}$$

1984 年世界卫生组织在《饮用水质量准则》中推荐,进入供水管网的水质应达到粪大肠菌群 0 个/100 mL;总大肠菌群 0 个/100 mL。如果测得总大肠菌群数为 3 个/100 mL,则只允许偶尔出现,不能连续出现。经过处理和加氯消毒后作为生活饮用水的水源,大肠杆菌不应超过 2×10^3 个/100 mL。只经加氯消毒即作为生活饮用水的水源,大肠杆菌不应超过 20 个/100 mL。

我国的生活饮用水卫生标准(GB5749-1985)规定:总大肠菌群 0 个/100 mL,粪大肠菌群 0 个/100 mL。经净化和消毒处理后作为生活饮用水的水源,总大肠菌群(在总大肠菌群中,大肠杆菌约占 95%)不超过 2×10^3 个/100 mL。只经加氯消毒即供作生活饮用水的水源,总大肠菌群不超过 200 个/100 mL。

第二节 空气的细菌学检测

空气中的微生物主要来自人类的生活和生产活动。它们附着于固体尘埃或液体水滴上,随载体悬浮于空气中。在湿度大、灰尘多、通风不良、日光不足的情况下,空气中的微生物不仅数量较多,而且存活时间也较长。微生物污染空气,可使空气成为传播呼吸道传染病的媒介,造成某些传染病的流行。直接检测空气中的病原菌,目前尚有困难,在空气环境质量评价上常以细菌总数作为指标。

一、空气中细菌的检测方法

空气中的细菌总数常用撞击法和皿皿沉降法检测。

1. 撞击法 亦称裂隙式撞击法。利用抽气泵的吸引,使一定量空气强迫通过一狭缝或喷嘴,在出口处形成高速喷射气流,空气中携带微生物的悬浮颗粒依靠惯性撞击并粘附于转动的营养琼脂培养基皿皿上,37°C 培养 24 h,计算菌落数,结果以“cfu/ m^3 ”单位表示。

在撞击法采集的空气中,含有许多携带微生物的悬浮尘粒;这些悬浮尘粒可随人体呼吸进入呼吸道,危害人类健康。因此,该法检测结果具有重要的卫生学意义。另外,这种采样法不受气流影响,采样量准确,已成为世界各国首选的空气细菌采样方法。

2. 皿皿沉降法 靠地心引力将空气中携带微生物的悬浮颗粒沉降到营养琼脂培养基皿皿中,37°C 培养 24 h,计算菌落数,结果以“cfu/皿(皿面积为 9 cm^2)”表示。

皿皿沉降法已有 100 多年的历史,由于该方法简单易行,曾在国际上广泛应用,我国至今还普遍采用。皿皿沉降法因误差较大已逐渐被淘汰。

需指出的是,上述两种细菌检测方法所得的结果不同,数据不能换算。

二、空气中细菌的总数指标

调查结果显示,若人群在室内聚集 80 min,室内空气中的细菌总数可达 4300 cfu/m³(撞击法)和 44 cfu/皿(沉降法)。若存在复合污染,人群在室内聚集 20 min,室内空气中细菌总数即可高达 4×10³ cfu/m³ 和 33 cfu/皿,二氧化碳浓度达 0.08%。此时,24.1%的人会产生异臭感和不舒适感。当细菌总数达 6×10³ cfu/m³ 或 75 cfu/皿,二氧化碳浓度达 1.5%时,55%的人群会产生异臭感和不舒适感。

前苏联提出的室内空气的细菌总数指标为:清洁空气的细菌总数,冬季小于 4.5×10³ cfu/m³,夏季小于 1.5×10³ cfu/m³;污染空气的细菌总数,冬季大于 7×10³ cfu/m³,夏季小于 2.5×10³ cfu/m³。日本的细菌总数指标为:清洁空气的细菌总数小于 30 cfu/皿;普通空气的细菌总数小于 75 cfu/皿。

我国室内空气中细菌总数的卫生标准(GB/T17093-1997)为:细菌总数≤4×10³ cfu/m³(撞击法)或≤45 cfu/皿(沉降法)。

第三节 污染物毒性的细菌学检测

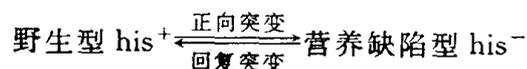
一、污染物毒性检测(发光细菌检测法)

发光细菌的发光强度是菌体健康状况的一种反映。在正常情况下,这类细菌在对数生长期的发光能力很强。然而,在环境不良或存在有毒物质时,其发光能力减弱,衰减程度与毒物的毒性和浓度成一定的比例关系。通过灵敏的光电测定装置,检查发光细菌受毒物作用时的发光强度变化,可以评价待测物的毒性大小。这种采用发光细菌检测污染物毒性的方法,称为发光细菌检测法。目前研究和应用最多的发光细菌是磷发光杆菌(*Photobacterium phosphoreum*)。美国贝克曼(Beckman)公司制造的微量毒性分析仪就是一种发光细菌检测仪。该仪器操作极为方便,测定一个样品不到半小时,所得结果与鱼类毒性试验一致。

二、污染物致突变性检测(Ames 试验法)

关于人类癌症的起因众说纷纭。一般认为化学物质是主要诱导因素。目前,世界上已有 7 万多种化学物质,而且还在迅速增加。对数量如此之巨的化学物质逐一进行致癌性检测,采用传统的动物实验法极难做到。为此,一些快速准确的微生物检测法应运而生。沙门氏菌/Ames 试验法就是其中应用最广的一种。

1. Ames 试验法的原理 沙门氏菌/Ames 试验法是由美国 Ames 教授等创立的一种致突变测定法。在该测定方法的设计中,利用了组氨酸营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)可发生回复突变的性能。常用的有 5 个菌株。在没有受到致突变物作用时,它们不能在无组氨酸的培养基上生长。受到致突变物作用后,由于细菌 DNA 被损伤,它们可通过基因突变而回复为野生型菌株,从而在不含组氨酸的培养基上正常生长。野生型与组氨酸营养缺陷型沙门氏菌间的关系如下:



2. Ames 试验法的优点

① Ames 试验法的准确性很高。有人曾将烷化剂、亚硝胺类、多环芳烃、芳香胺、硝基呋喃类、联苯胺、黄曲霉毒素、氯乙烯、4-氨基联苯、抗癌药物等 175 种已知致癌物,进行 Ames 试验,结果发现其中 157 种呈阳性反应,吻合率达 90%。将 108 种已知非致癌物进行测定,结果其中 94 种呈阴性反应,吻合率为 87%。Bartsch 等将 180 种物质(其中有 26 种是已知的致癌物质)进行 Ames 试验,结果测出 25 种为阳性反应,吻合率高达 95%。

② Ames 试验法的被检样品量很少,能检出微克至毫微克水平的污染物的致突变性。

③ Ames 试验法除能检出单一纯物质(包括天然及人工合成物质)的致突变性外,还能检出多种复杂混合物(如合成原油、污水、大气烟尘、汽车废气、香烟浓缩物、染发剂、植物汁液、食品提出液、人畜粪尿以及胃液、血液、乳汁等)的致突变性,较好地反映多种环境污染物的联合效应。

3. Ames 试验法的应用实例

在污染物致突变性检测中,Ames 试验法的重要作用日趋明显。例如,1964 年日本开始使用呋喃基糠酰胺(AF-2)作为食品添加剂。为了评价它的安全性,曾分别用大鼠、小鼠做过数次诱癌试验,结果都是阴性。1974 年进行 Ames 试验,只用一小片曾添加呋喃基糠酰胺的鱼腊肠即检出呋喃基糠酰胺具有强烈的致突变反应。应用大规模的动物实验证实,呋喃基糠酰胺确属致癌物。此后,日本政府宣布禁用此种添加剂。又如,烟草的烟凝聚物中约含 1200 多种化学物质。动物性诱癌试验所需的样品量很大,既费时,也费工和费钱。进行 Ames 试验,仅用 0.1 g 香烟抽提物便可检出烟草烟的致突变作用,并证实它是强致突变物。

第四节 应用 PCR 技术检测环境微生物

PCR(Polymerase Chain Reaction)技术是 1983 年美国 Multis 等人发明的一种特定 DNA 片段的快速扩增技术。1989 年被美国 *Science* 杂志列为十大科学发明之首。该技术问世后,发展十分迅速,现已成为分子生物学研究的重要手段,并迅速进入生物学、医学、法医学、环境学等众多领域。在环境微生物的检测上,它也将发挥越来越大的作用。

一、PCR 技术

(一)基本原理

PCR 的基本原理如图 12-1 所示。反应体系包含如下成分:模板 DNA、引物(上游和下游引物)、 Mg^{2+} 、4 种 dNTP 和 Taq DNA 聚合酶。操作时,先升温至 94℃使双链的模板 DNA“变性”,解链为两条单链;再降温至 37~55℃“退火”,使引物与单链模板 DNA 的 3' 端形成双链 DNA;然后在 60~72℃下进行“聚合反应”,通过 Taq DNA 聚合酶的催化作用,4 种 dNTP 掺入引物 DNA,使引物从 5' 端向 3' 端延伸。经过变性、退火和聚合反应,完成第一轮循环。接着,进行第二轮“变性、退火和聚合反应”循环。由于上一轮循环扩增反应的产物可作为下一轮循环扩增反应的模板,因此理论上每轮循环后 DNA 数量增加一倍。在前几轮循环中,反应液中含有长短不一的产物。经过几轮循环后,由于两种引物所限定的 DNA 序列呈指数扩增,而其他长度的 DNA 只能呈线性扩增,故最终产物以两种引物所限定的 DNA 片段为主。

(二)反应体系

1. 引物 引物(primer)是指 DNA 聚合酶启动 DNA 合成时所必需的寡核苷酸片段。

PCR 引物至少应有 16 个核苷酸,最好为 20~24 个核苷酸;此外,引物中的碱基应随机分布,避免出现单一碱基的重复序列或产生二级结构的区域,引物中(G+C)碱基含量约为 45%~55%。引物 3'端对 Taq DNA 聚合酶的延伸效率影响很大,一般在引物 3'端最好选 T。设计简并性引物时,3'端的简并性应尽量小。上游引物和下游引物的 3'端之间应避免出现互补序列,以免在扩增产物中出现引物二聚体。如无法避免这种互补序列,应通过预备实验适当调节 Mg^{2+} 浓度,以获得较多的目的产物。使用引物进行扩增反应时,一般引物浓度为 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 。

这种浓度足以进行 30 轮以上的扩增反应。引物浓度过高会在异位引导合成,从而扩增那些不需要的序列。相反,引物浓度不足,则聚合反应的效率较低。根据实际需要,添加的上游引物与下游引物的摩尔浓度可以相等,也可以不等。

2. Taq DNA 聚合酶 Taq DNA 聚合酶的功能是催化 DNA 的合成。各厂家生产的 Taq DNA 聚合酶活性有所不同,应参照厂家的推荐意见确定使用剂量。一般在 $100 \mu\text{l}$ 反应体系中加入 $1.5\sim 2.5$ 单位 Taq DNA 聚合酶,足以进行 30 轮扩增反应。酶剂量过大会增加非特异性产物,酶剂量过小则会降低目的产物产量。

Taq DNA 聚合酶的一个致命弱点是它的出错率较高,约为 $2\sim 10^{-4}$ 核苷酸/每轮循环。Taq DNA 聚合酶往往会在 DNA 链的 3'末端加上非模板互补核苷酸,从而产生不易克隆的 PCR 产物。用其他 DNA 聚合酶(如 T₄DNA 聚合酶)处理扩增产物,补平或去除突出末端可解决这一问题。

Taq DNA 聚合酶的半衰期为: $92.5^{\circ}\text{C}, 130 \text{ min}; 95^{\circ}\text{C}, 40 \text{ min}; 97^{\circ}\text{C}, 5 \text{ min}$ 。

3. 反应缓冲液 PCR 反应通常放在缓冲液中进行。缓冲液的组成为: $10\sim 50 \text{ mmol/L Tris} \cdot \text{HCl}$ (室温下 pH 8.0), 50 mmol/L KCl 和 $1.5 \text{ mmol/L MgCl}_2$ 。在聚合反应温度(72°C)下,该缓冲液 pH 为 7.2。KCl 浓度过高会抑制 Taq DNA 聚合酶的活性。适当的 Mg^{2+} 浓度也很重要,它可影响引物退火的程度、模板 DNA 链与产物 DNA 链的解离温度、产物的特异性、引物二聚体的形成以及聚合酶的活性和精确性等等。由于 EDTA 或磷酸盐影响 Mg^{2+} 浓度,因此应注意模板 DNA 溶液中的 EDTA 浓度和 PCR 反应中所加的 dNTP 浓度。

4. 模板 DNA PCR 反应体系中的模板 DNA,既可以是单链 DNA 也可以是双链 DNA;既可以是线性 DNA 也可以是环状 DNA。通常线性 DNA 略优于环状 DNA。模板 DNA 的数量过多会降低扩增效率,增加非特异性产物。模板 DNA 的纯度(目的序列所占的比例)越高,非特异性产物越少。DNA 制品中的杂质(如尿素、SDS、甲酰胺、乙酸钠,以及从琼脂糖凝胶中带来的杂质)也会影响 PCR 的效率。

5. 其他成分 在 PCR 反应体系中还应加入矿物油,以防反应过程中受热蒸发而产生问

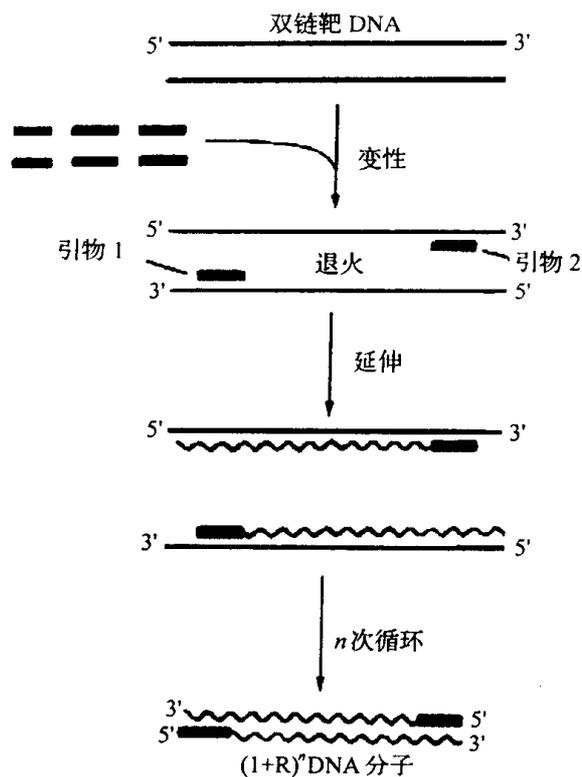


图 12-1 PCR 扩增靶 DNA 的原理

题。

(三) 反应参数

1. 变性 在第一轮扩增前, DNA 的完全变性非常重要。一般先在 94℃ 变性 5 min, 再加入 Taq DNA 聚合酶进行扩增。变性不完全可能导致 PCR 失败, 因为未完全变性的双链 DNA 很快复性。变性温度过高或变性时间过长都会造成酶活性的损失。一般分别控制为 94℃, 1 min; 或 97℃, 15 s。

2. 退火 引物退火的温度和时间取决于引物的碱基组成、引物长度、引物与模板的匹配程度以及引物浓度。退火温度应比引物的 T_m 值 (DNA 中一半碱基对发生变性的温度) 低 5℃。引物 G+C 含量高、长度大并与模板完全匹配时, 则应增加退火温度, 以提高产物的特异性。有些扩增体系甚至将退火和延伸反应合并, 整个循环只用两种温度 (如 60℃ 和 94℃)。这样既可节省操作时间, 又可提高产物的特异性。退火的温度和时间宜分别控制为 50℃ 和 2 min。

3. 延伸 延伸反应 (即聚合反应) 通常在 72℃ 下进行, 接近 Taq DNA 聚合酶的最适温度 (75℃)。Taq DNA 聚合酶的作用温度为 20~85℃。事实上在退火时引物的延伸反应即已开始。

延伸反应所需的时间取决于目的序列的长度和浓度。每分钟 Taq DNA 聚合酶大约合成 2 kb DNA。对于长序列, 延伸时间可达 15 min, 但时间进一步延长无助于扩增产物。在保证 DNA 合成的前提下, 应尽量缩短延伸反应的时间, 以减少 Taq DNA 聚合酶活性的损失。延伸反应的温度和时间宜分别控制为 72℃ 和 1~3 min。在扩增反应完成后, 一般都需要一步长时间 (10~30 min) 的延伸反应, 以获得尽可能完整的产物。

4. 循环次数 其他参数确定后, 循环次数主要取决于模板 DNA 的浓度。一般而言, 25~30 轮循环已能满足需要。循环次数过多会增大 PCR 产物出错的比例。经过 25~30 轮循环, DNA 聚合酶将近耗尽, 不再进行扩增作用。如果此时需要进一步扩增, 可将扩增的 DNA 产物稀释 $10^3 \sim 10^5$ 倍作为模板, 重新加入酶和各种底物。经过 60 轮循环, 扩增水平可达 $10^9 \sim 10^{10}$, 此时非特异性产物也相应增加。

二、应用 PCR 技术检测致病菌

在土壤、水体和大气环境中都存在致病菌和病毒, 它们与许多传染性疾病的传播和流行密切相关。因此, 定期检测各环境中致病菌的动态 (种类、数量、变化趋势等) 并采取预防措施, 对于保护人体健康具有实际意义。采用常规的分离培养法检测致病菌, 不仅费时 (一般需几天到数周) 费工, 而且无法检测一些生长缓慢或难以人工培养的病原菌。应用 PCR 技术可有效地克服上述常规检测法的缺陷, 并使检测时间缩短至 2~4 h。

单核细胞增生利斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*) 是一种引起人类脑膜炎的致病菌, 广泛存在于乳制品、肉类、家禽和蔬菜上。该病菌特别容易感染孕妇、新生儿和免疫损伤的病人, 对人类健康的威胁很大。1992 年, Niederhauser 等人通过对这个病菌中 *hlyA* 和 *iap* 基因的扩增, 检测时间只需几个小时。他们用这种方法检测了 100 个样品, 结果证明, 阳性检出率与经典培养法相同或更高。

三、应用 PCR 技术检测基因工程菌

通过遗传工程, 科技工作者改造或构建了许多基因工程菌。无论是考察基因工程菌的效能, 还是考察基因工程菌对人类和生态的安全性, 均需检测基因工程菌的动态。应用 PCR 技术

检测已知基因组结构和功能的基因工程菌,简便而快捷。

1989年,Chaudry等人将一个工程菌株接种于经过过滤灭菌的湖水及污水中,定期取样,提取样品DNA并进行PCR扩增,特异性地扩增了用作该工程菌株标记的0.3 kb DNA片段。跟踪结果表明,接种10~14 d后仍能用PCR方法检测出该工程菌株。

复习思考题

1. 为什么说水质细菌总数的测定结果以“cfu/mL”表示更确切?
2. 根据细菌总数指标,水体可划分为哪几类?
3. 根据腐生细菌的数量及腐生细菌数与细菌总数的比值,水体可划分为哪几类?
4. 作为粪便污染指示菌的理想条件有哪些?
5. 总大肠菌群与粪大肠菌群有何差异?
6. 对于总大肠菌群,我国生活饮用水的卫生标准是什么?
7. 简述空气中细菌的检测方法与我国的空气细菌总数指标。
8. 简述发光细菌检测法和Ames试验法的原理。
9. 简述PCR技术的原理与工作条件。

参 考 文 献

- [1] 周群英,高廷耀编著. 环境工程微生物学(第二版). 北京:高等教育出版社,2000
- [2] 闵 航主编. 微生物学. 杭州:浙江大学出版社,1999
- [3] Maier R M, Pepper I L, Gerba C P. Environmental Microbiology. San Diego, California, USA: Academic Press, 2000
- [4] Madigan M T, Martinko J M, Parker J. Brock Biology of Microorganisms. New Jersey, USA: Prentice-hall Inc, 1997
- [5] Atlas M, Bartha R. Microbial Ecology (third edition). California, USA: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc, 1993
- [6] 郑 平,冯孝善主编. 废物生物处理理论与技术. 杭州:浙江教育出版社,1997
- [7] 邢来君,李明春编著. 普通真菌学. 北京:高等教育出版社,1999
- [8] 陈 峰,姜 悦主编. 微藻生物技术. 北京:中国轻工业出版社,1999
- [9] 池振明编著. 微生物生态学. 济南:山东大学出版社,1999
- [10] 岑沛霖,蔡 谨编著. 工业微生物学. 北京:化学工业出版社,2000
- [11] 沈韞芬主编. 原生动物学. 北京:科学出版社,1999
- [12] 裘维蕃主编. 菌物学大全. 北京:科学出版社,1998
- [13] 国家环境保护总局监督管理司编. 中国环境影响评价. 北京:化学工业出版社,2000
- [14] 马庆生主编. 生物学大辞典. 南宁:广西科学技术出版社,1999
- [15] 王家玲主编. 环境微生物学. 北京:高等教育出版社,1988
- [16] 史家樑,徐亚同,张圣章编著. 环境微生物学. 上海:华东师范大学出版社,1993
- [17] 尹先仁,秦钰慧主编. 环境卫生国家标准应用手册. 北京:中国标准出版社,2000
- [18] 何晓青主编. 卫生防疫细菌检验. 北京:新华出版社,1989
- [19] 翁稣颖等编著. 环境微生物学. 北京:科学出版社,1985
- [20] 殷蔚申主编. 食品微生物学. 北京:中国财经经济出版社,1991
- [21] 高天祥,田竟生主编. 医学分子生物学. 北京:科学出版社,1999

[G e n e r a l I n f o r m a t i o n]

书名 = 环境微生物学

作者 = 郑平

页数 = 182

SS号 = 11110179

出版日期 = 2002年