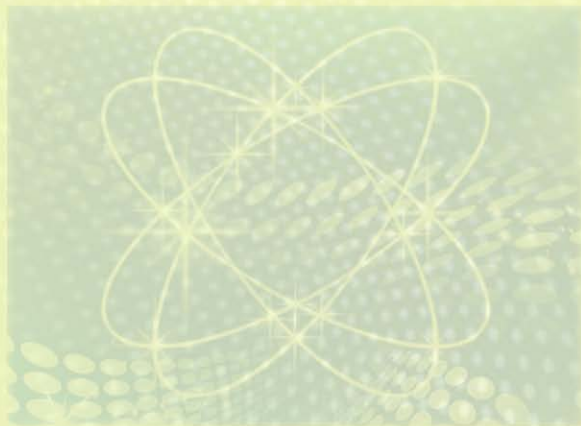


微生物对土壤中 污染物的降解作用

李依韦 著



内蒙古出版集团
内蒙古科学技术出版社

微生物对土壤中 污染物的降解作用

李依韦 著

内蒙古出版集团
内蒙古科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

微生物对土壤中污染物的降解作用 / 李依韦著. —
赤峰: 内蒙古科学技术出版社, 2013. 1

ISBN 978-7-5380-2251-3

I. ①微… II. ①李… III. ①土壤污染—污染物—
微生物降解 IV. ①X53

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 018587 号

出版发行: 内蒙古出版集团 内蒙古科学技术出版社

地 址: 赤峰市红山区哈达街南一段 4 号

网 址: www.nm-kj.com

邮 编: 024000

电 话: (0476) 8224848 8226867

责任编辑: 季文波

封面设计: 永 胜

印 刷: 赤峰富德印刷有限责任公司

字 数: 70 千

开 本: 880 × 1230 1/32

印 张: 2.75

版 次: 2013 年 1 月第 1 版

印 次: 2013 年 1 月第 1 次印刷

定 价: 45.00 元

前 言

环境污染已是全球关注的热点,世界各国正采取措施对环境污染物进行无害化处理,利用微生物对环境污染物进行降解是其中的方法之一,但目前在污染物降解这方面实践操作还较少,主要停留在实验室水平。

本书主要利用鞣醌丛毛单胞菌对甾类化合物及多环芳烃类化合物具有专一消化功能,对其降解体系进行研究,筛选出了鞣醌丛毛单胞菌对不同底物进行降解时的不同生长条件,并对鞣醌丛毛单胞菌的降解酶基因 3α -HSD/CR 进行改造,以提高降解效率。

本书主要分六部分:第 1 章介绍了土壤中主要污染物的来源及种类;第 2 章主要介绍了利用鞣醌丛毛单胞菌对土壤中激素类污染物的降解;第 3 章介绍了利用鞣醌丛毛单胞菌对土壤中含苯残留农药的降解;第 4 章介绍了利用鞣醌丛毛单胞菌对土壤中多环芳烃类污染物的降解;第 5 章介绍了利用鞣醌丛毛单胞菌对土壤中金属类污染物的降解;第 6 章介绍了研究成果及存在的问题。

本书的出版得到了各位老师和同事的帮助,在此表示诚挚的谢意。由于时间所限,书中难免会有不足之处,希望各位老师批评指正。

目 录

第 1 章	土壤中污染物的来源及种类	1
1	土壤中污染物的来源	1
2	土壤中污染物的种类	2
2.1	无机污染物	2
2.2	有机污染物	3
3	土壤中污染物对人类的危害	3
3.1	直接经济损失	3
3.2	生物品种的质量不断下降	4
3.3	土壤污染导致其他环境问题	4
3.4	危害人体的健康	4
4	微生物对环境污染物的降解作用	5
4.1	环境有益微生物菌剂的研发	5
4.2	微生物对含氯化合物的降解	6
4.3	对土壤中有机的降解	6
4.4	固体污染物的微生物降解	7
5	降解土壤中污染物的典型微生物——辜丸酮丛毛 单胞菌	8
第 2 章	对土壤中激素类污染物的降解	12
1	固醇类激素概述	12

1.1	固醇类激素对人体的危害	12
1.2	固醇类激素在细胞内的作用	13
1.3	固醇类激素含量的检测	13
2	固醇化合物的微生物降解	14
2.1	微生物对甾体转化的反应机理	14
2.2	微生物对甾体母核及侧链的降解	15
3	微生物(以睾酮丛毛单胞菌为例)	15
3.1	菌种材料	15
3.2	筛选方法	16
3.3	结果与讨论	16
3.4	结论	25
4	睾酮丛毛单胞菌降解土壤中三羟异黄酮雌 激素	25
4.1	三羟异黄酮雌激素在土壤中的存在 情况	25
4.2	菌种与材料	26
4.3	讨论	32
4.4	结论	34
5	微生物降解固醇类激素的分子生物学研究	34
5.1	原生质体融合技术	34
5.2	基因重组技术	35
5.3	对降解酶基因的改造	38
第3章	对土壤中残留农药的降解	41
1	土壤中残留农药概述	41

1.1	农药残留	41
1.2	农药对人体的危害	42
1.3	微生物降解农药的新技术新方法	43
2	残留农药的微生物降解	44
2.1	对化学农药烟嘧磺隆的微生物降解	44
第4章	对土壤中多环芳烃类的降解	53
1	土壤中多环芳烃类污染物概述	53
1.1	多环芳烃化合物(PAHs)的性质及 种类	53
1.2	土壤中多环芳烃的污染状况	54
1.3	多环芳烃对人类的危害	55
2	微生物对多环芳烃类污染物的降解	57
2.1	微生物对多环芳烃有机物的降解途径	57
2.2	能够降解多环芳烃有机物的微生物	58
2.3	微生物降解多环芳烃的机理	59
2.4	影响多环芳烃微生物降解的因素	61
3	微生物对多环芳烃类污染物的降解	61
3.1	采集菌种及扩大培养	61
3.2	细菌分离纯化和鉴定	62
3.3	单细菌进行降解试验	64
3.4	底物浓度分析方法	65
3.5	结果与分析	66
第5章	对土壤中金属类污染物的降解	68
1	土壤中金属类污染物概述	68

1.1	土壤中重金属污染物的来源与分布	68
1.2	土壤中重金属对植物及动物的危害	69
2	微生物对土壤中重金属污染的修复作用	71
3	微生物对土壤中金属污染物的降解	72
3.1	菌种的培养和分离	72
3.2	菌株的富集培养	73
3.3	不同菌株对重金属的吸附试验	73
3.4	吸附动力学试验	73
第6章	研究成果及存在的问题	75

第1章 土壤中污染物的来源及种类

1 土壤中污染物的来源

土壤中污染物的来源大致可分以下几方面:

第一,土壤中农业生产劳动的对象,人们为了提高生产量、生产质量从而获得最大的生产效益,在向土壤中施入化肥、农药及生长调节剂的同时也带入大量的污染物。例如,一些人工合成的农药,环境可溶性非常差,可在土壤中存在几十年甚至几百年。常见的人工合成的农药有杀虫剂类(有机磷类、有机氯类、氨基甲酸酯类、拟除虫菊酯类等)、杀菌剂类(二硫代氨基甲酸酯类、苯并咪唑类、苯基酰胺类、甾醇生物合成抑制剂等)、除草剂类(苯氧羧酸类、均三氮苯类、取代脲类、磺酰脲类、二硝基苯胺类等)等。人工合成农药种类繁多,结构复杂大多属于高分子化合物,含有苯环的芳香烃类,所以在土壤中能够稳定长期存在。

第二,大气和水体中的污染物进入土壤中从而使土壤受到污染,这属于二次污染。这类浸染是人为活动引起的,污染物主要来自于工业城市废水和固体废弃物,这些污水未经处理或处理不符合标准用来灌溉农田,这是工业

污水污染土壤的主要途径。随着工业的不断发展,人类生活水平的不断提高越来越多的工业废水、废弃物和生活垃圾排入或倾倒入土壤中,使土壤中的污染成分越来越多。另外吸烟、汽车尾气、工业废气等等这些含有害成分非常多的气体通过沉降给土壤带来了沉重的负担。如工业排放的 SO_2 、 NO 等有害气体在大气中发生反应形成酸雨以自然降水形式进入土壤引起土壤酸化;如冶金工业烟囱排放的金属氧化物粉尘,在重力作用下以沉降形式进入到土壤,从而造成土壤的重金属污染;汽油中添加的防爆剂四乙基铅随着汽车尾气的排放而进入到大气中通过沉降进入土壤,所以,公路周边地区的土壤污染程度最为严重。

第三,自然污染。在自然界中某些矿物质的富集中心的附近,土壤中这些物质的含量超过土壤正常的含量范围所以造成土壤污染。

2 土壤中污染物的种类

土壤中污染物的种类非常复杂,类型也非常多,有化学污染、物理污染、生物污染和放射性污染等多种类型。其中以土壤的化学污染最为普遍、复杂严重。土壤的化学污染物质主要有无机污染物和有机污染物两大类,下面简单作一介绍。

2.1 无机污染物

土壤中的无机污染物包括对生物有危害作用的元素

及化合物,主要有重金属、放射性物质和其他的一些营养类无机元素等。重金属有汞、镉、铬、铅、砷、铜、锌、镍等;放射性物质指铀、钍、镭等;营养类无机化学元素包括氮、磷、钾、硫、硼等。

2.2 有机污染物

土壤中的有机污染物主要是化学农药,化学农药种类繁多,目前土壤中大量使用的化学农药有 50 多种,主要是有机氯类、有机磷类、苯酰胺类、苯氧羧酸类、多氯联苯类、多环芳烃类、酚类等等。此外未经处理的人畜粪便中的微生物,如肠道菌类、霍乱弧菌类、伤寒杆菌类、蠕虫类、线虫类、寄生虫、病毒等通过施肥方式进入土壤而大量繁殖,死亡的虫体作为有机物质在土壤中存在。

3 土壤中污染物对人类的危害

当土壤中有害物质过多,超过土壤的自净能力就会引起土壤组成、结构和功能上的变化;微生物活动受到抑制;有害物质或其分解产物在土壤中逐渐积累通过“土壤-植物-人体”或通过“土壤-水-人体”间接被人体吸收而危害人体健康。归纳起来土壤污染而带给我们的危害主要有以下几个方面:

3.1 直接经济损失

土壤污染导致农作物污染,严重减产。对于各种土壤

污染造成的经济损失目前还缺少系统的调查资料。我们仅以土壤重金属污染为例,全国每年减产粮食 1000 多万吨,每年被重金属污染的粮食也高达 1200 多万吨,合计经济损失高达 200 亿元人民币。

3.2 生物品种的质量不断下降

在我国大多数城市近郊土壤都受到不同程度的污染,许多粮食、蔬菜、水果等食物中铅、镉、铬、砷等重金属超标或接近临界值。土壤污染除了影响农作物的卫生品质外,还影响其他品质,如蔬菜、水果味道变差,容易腐烂;玉米、高粱、大豆等农作物品质变差不能满足深加工的需要。

3.3 土壤污染导致其他环境问题

例如,土壤受到污染后,含重金属污染较多的表层土壤在风力、水力的作用下分别进入大气和水体导致大气污染、地下水污染、生态系统退化等次生态系统环境问题。

3.4 危害人体的健康

土壤污染会使污染物在作物体内积累,并通过食物链富集到人体内从而影响人体健康,引发癌症或其他疾病。如环境激素可通过食物链或直接接触等方式进入人体内,干扰机体内分泌系统的功能,影响体内激素的合成、释放、转运、代谢及合成等过程,干扰血浆中正常激素水平的维持,从而对机体的生殖、发育、肿瘤发生、神经系统、免疫系

统等产生多方面的影响。土壤中环境激素的污染使生物与人类的持续生存和繁衍受到威胁。近年来许多国家的政府部门、研究机构都在积极采取行动,如美国要求筛选具有雌激素活性或能阻碍雌激素活性的化学物质,英国环境总署也对环境激素类物质的生产和排放加以控制,且确认此类研究为优先领域。1991年以来,英、美、日等国家均召开了有关环境激素的科学研讨会,1998年欧洲环境毒理和化学学会年会,将环境激素作为大会的重要主题,环境激素污染迅速成为国际研究的新热点。

4 微生物对环境污染物的降解作用

微生物是地球生态系统中最重要分解者,在环境污染物的降解转化、资源的再生利用、环境保护等方面发挥着非常重要的作用。利用微生物的代谢作用提高污染物的降解速度,使污染物的浓度降低或完全无害化,是治理环境污染的最重要的一种方法。微生物对污染物降解最成功的例子是清除 Alaska Exxon Valdel 的海岸石油污染。经过微生物降解近百里海岸的环境质量获得了非常大的改进。发达国家自 20 世纪 80 年代以来对环境有益微生物的开发、应用研究领域也取得了举世瞩目的成果。

4.1 环境有益微生物菌剂的研发

开发利用高效的微生物菌剂在河流治理、农药化工等

有毒有害污水的处理,高浓度有机废水的处理,以及资源化利用方面发挥着极其重要的作用。我国环境有益微生物研发中虽然已经筛选出了不少菌种,但是无论从数量上还是从质量方面,以及高效菌种的应用技术方面与国外相比都存在很大的差距。目前国外已有不少微生物菌剂进入国内在应用技术方面显示出了极大的优势,我国也应该充分发挥自己的研究技术,利用富集、筛选、纯化、诱变、基因重组、细胞融合等多种手段,研究开发出适合我国国情的微生物菌剂。

4.2 微生物对含氯化合物的降解

含氯有机化合物在环境中可长期存在,不容易被降解。这类化合物毒性较大,美国环境保护局公布的129种优先控制污染物名单中含卤有机化合物(以含氯有机化合物为主)占一半以上。目前在自然界中直接以含氯的有机化合物作为碳源和能源的微生物很少,但是含氯有机化合物脱氯以后的代谢产物可以被很多微生物利用和降解。基于这一特点,研究者们选择和驯化具有多功能、高降解性的微生物群体,使含氯有机化合物首先脱去氯原子,然后再被微生物高效降解。

4.3 对土壤中有机的降解

广泛使用的除草剂氯乙异丙嗪(Atrazine),是最常在土壤和地下污水中被检测出来的污染物之一,微生物对它

的降解十分缓慢。有研究者从长期施用这种农药的土壤分离出一个混合微生物菌种,在液体培养中7天就可以将0.56mmol/L的氯乙异丙嗪矿化96%,在土壤中25天可以将含有该除草剂0.14mmol/L的土壤完全净化。

经常被用来作为木材防腐剂的五氯酚(PCP)是一种难降解的芳香烃,Colores和Gregory M分离到了一种细菌,在液体培养中能够降解浓度为300mg/L的PCP。研究者还确定了该菌在土壤中的降解能力:在土壤中该菌能完全矿化从300~1200 μ g/g的PCP。另外还有研究者报道了用遗传工程菌来降解土壤中的多氯联苯,将多氯联苯降解基因转入假单胞菌中,使该菌成为以多氯联苯作为碳源的菌株。试验表明这种工程菌在土壤中生存良好并能长期存在于土壤中。

4.4 固体污染物的微生物降解

20世纪中叶以后,随着人口剧增,工业化、城市化的发展,所产生的大量固体污染物对环境带来的污染及对人体健康的影响问题越来越为世人所关注。固体污染物种类繁多,按成分可分为有机废物和无机废物,按形状可分为固体废物和泥状废物,按其危害状况可分为有毒废物、有害废物和一般废物,按其来源可分为工业废物、城市废物和农业垃圾等。对这些固体污染物和微生物处理常用的是堆肥法,是在有控制的条件下,利用微生物分解垃圾中易降解有机成分的生物化学过程。在实现垃圾无害化的

同时,堆肥过程也具有减量化和资源化的作用。通过堆肥可减量约 30%,减重约 20%。而且堆肥还是良好的有机肥和土壤改良剂。但堆肥的资源化作用有限,只利用了垃圾中的微生物容易降解的有机成分,使之变成了腐殖质。近年来,国内外在禽畜粪便的堆肥中应用非常广泛,如利用分解性强、除臭效果好的微生物菌剂发酵禽畜粪便,从而获得质量好的有机肥料。

微生物的广泛适应性和代谢多样性为降解环境中的有毒物质提供了保障,当今人类面临的环境浸染、资源短缺、生态破坏等许多重大问题都有可能从微生物的资源开发利用中得到解决,微生物对人类的可持续发展将产生重大的影响。

5 降解土壤中污染物的典型微生物——睾丸酮丛毛单胞菌

睾丸酮丛毛单胞菌(*Comamonas testosterone*, *C. test*) 是革兰氏阴性杆菌,有极端丛生鞭毛,属于丛毛单胞菌(*Comamonas*) 属的一个种,在自然界中分布非常广泛,已报道在土壤、江河、湖泊、人的血液、尿液、牛奶、医院周围的环境中都能够分离到这种菌。该菌是严格好气性的化能有机营养型的细菌,不能利用糖类但在有机酸和氨基酸上能够生长良好。该菌能够利用睾丸酮、孕酮、胆汁酸为唯一碳源和能源,通过分泌的各种酶的代谢活动完全消化这类底物。此外睾丸酮丛毛单胞菌还能降解非类固醇类的药物、杀虫剂、致癌物等,如甲吡酮、对硝基苯甲醛。研究结

果表明: 在类固醇诱导物存在的情况下, 睾酮丛毛单胞菌降解杀虫剂、致癌物的能力大大提高。同时该菌也能够使一些致癌的化合物失活。因此, 我们利用睾酮丛毛单胞菌的降解功能除去环境中的多环芳烃类、固醇类激素等一些非常稳定的环境污染物的前景是可观的。表 1.1 列出了睾酮丛毛单胞菌对环境中的某些污染物的降解作用。

表 1.1 睾酮丛毛单胞菌对污染的降解及应用酶

Table 1.1 The degradations and enzymes in *C. test*

菌株	基因或酶	降解物质
<i>C. testosteroni</i> ATCC11996	3 α -HSD/CR	类固醇、塑料、杀虫剂
<i>C. testosteroni</i> TA441	间位开裂酶基因 tesB	类固醇、多氯联苯
<i>C. testosteroni</i> B-356	联苯加双氧酶	联苯类化合物
<i>C. testosteroni</i> BR60	cbaABC	3-氯化安香息酸盐
<i>C. testosteroni</i> JH5	儿茶酚 2,3-加双氧酶	4-氯酚
<i>C. testosteroni</i> GZ39、GZ42	nah	菲、萘、蒽
<i>C. testosteroni</i> T-2	TsaMB、TsaC、TsaD	对甲苯磺酸盐
<i>C. testosteroni</i> P15、E23	TsaMB、TsaC、TsaD	苯酚
<i>C. testosteroni</i> I2	TsaMB、TsaC、TsaD	3-氯苯胺
<i>C. testosteroni</i> Q10	TsaMB、TsaC、TsaD	喹啉、3-甲基喹啉

3 α -HSD/CR 基因有 774bp, 编码 258 个氨基酸残基, 分子量大约为 26.4kDa, 启动子区位于 3 α -HSD/CR 基因上游 93bp 处, 转录起始位点在翻译起始位点上游的 28bp 处, 3 α -HSD/CR 基因位于 *C. testosteroni* ATCC11996 基因组的 5.257bp 的 EcoR I 的片段上。在 3 α -HSD/CR 基因的下游, 发现另一个类固醇代谢酶 Δ^5 -3-酮类固醇异构酶的基因 (Δ^5 -3-ketosteroid isomerase, EC5.3.3.1), Δ^5 -3-酮