

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第35卷 第4期

Vol.35 No.4

2014

中国科学院生态环境研究中心 主办
科学出版社 出版



目次

2008 ~2012 年上海黑碳浓度变化特征分析	王洪强,贺千山,陈勇航,亢燕铭 (1215)
乌鲁木齐市东南郊一次降雪过程的化学组成及其悬浮态颗粒形态特征	陆辉,魏文寿,崔彩霞,何清,王瑶 (1223)
典型地区大气中多溴联苯醚和新型溴代阻燃剂的水平及组成分布	吴辉,金军,王英,李明圆,何松洁,徐萌,孙一鸣 (1230)
某焦化厂周边大气 PM ₁₀ 重金属来源及健康风险评价	董婷,李天昕,赵秀阁,曹素珍,王贝贝,马瑾,段小丽 (1238)
基于车流和大气污染物浓度同步增量的机动车平均排放因子估算方法	李润奎,赵彤,李志鹏,丁文军,崔骁勇,许群,宋现锋 (1245)
珠江三角洲地区硫和氮沉降临界负荷研究	孙成玲,谢绍东 (1250)
低温等离子体-生物法处理硫化氢气体研究	李华琴,何觉聪,陈洲洋,黎宝仁,黄倩茹,张再利,魏在山 (1256)
太子河流域莠去津的空间分布及风险评价	郑磊,张依章,张远,朱鲁生,王志强 (1263)
一种大批量测定沉积物微量间隙水样品中溶解态磷和铁含量的方法	王燕,朱春刚,许笛,丁士明 (1271)
外源营养盐输入后水体中营养盐浓度的时空变化	傅玲,赵凯,王国祥,欧媛,范嫻,毛丽娜,张佳,韩睿明 (1278)
基于物理过程的矿区地下水污染风险评价	孙法圣,程品,张博 (1285)
重庆典型岩溶地下水系统水文地球化学特征研究	杨平恒,卢丙清,贺秋芳,陈雪彬 (1290)
重庆老龙洞地下河流域氮、磷及微生物污染调查研究	蓝家程,杨平恒,任坤,陈雪彬,徐昕,胡宁 (1297)
苦草 (<i>Vallisneria natans</i>) 根系对沉积物中各形态磷的影响	李振国,王国祥,张佳,马久远,魏宏农,俞振飞 (1304)
循环廊道湿地中氮归趋过程模拟研究	彭剑峰,宋永会,袁鹏,张雪妍,胡小明 (1311)
不同环境因素下太湖中四环素的自然消减	段伦超,王凤贺,纪莹雪,张帆,赵斌,王国祥 (1318)
再生水中 5 种抗生素抗性菌的紫外线灭活及复活特性研究	黄晶晶,汤芳,席劲璇,庞宇辰,胡洪营 (1326)
二级处理出水的 UV-TiO ₂ 消毒及大肠杆菌和粪肠球菌光复活试验	王西峰,龚昕,胡晓莲,任伯帜 (1332)
水中 C ₆₀ 纳米颗粒的稳定性研究	方华,沈冰冰,荆洁,陆继来,王媛 (1337)
XDLVO 理论解析不同离子条件下海藻酸钠微滤膜污染	赵应许,纵瑞强,高欣玉,谢慧君,殷永泉,梁爽 (1343)
纳米零价铁催化过氧化氢强化修复 4-氯硝基苯污染地下水的研究	付融冰 (1351)
共存氯苯类同系物对六氯苯厌氧降解活性的影响	王琪,刘辉,姜林,唐军 (1358)
硫酸盐还原生物滤池对含镉废水去除效果试验研究	吴宣,谭科艳,胡希佳,顾远,杨宏 (1366)
基于氮平衡原理对南方污水处理厂中试脱氮工艺调控策略研究	姜应和,刘佩炬,王磊,田中凯,刘小英 (1372)
模拟电镀污泥阴离子浸出液对氧化亚铁硫杆菌活性的影响	陈燕,黄芳,谢鑫源 (1377)
电活性生物膜介导 Cu ²⁺ 生物还原的试验研究	刘毅,周顺桂,袁勇,刘志 (1384)
模拟废旧线路板生物浸出液中铜的回收	程丹,朱能武,吴平霄,邹定辉,邢翊佳 (1391)
填埋垃圾浸提液与地下水污染物组成差异及成因	何小松,余红,席北斗,崔东宇,潘红卫,李丹 (1399)
化学合成施氏矿物与 H ₂ O ₂ 共存体系下光化学处理垃圾渗滤液的研究	王鹤茹,宋永伟,徐峙辉,崔春红,周立祥 (1407)
处理 BPA 模拟废水的 SBR 工况参数对污泥有机毒性的影响研究	杨娜,陈秀荣,林逢凯,黄华,章斐,赵骏,丁毅 (1414)
剩余污泥厌氧消化甲烷生成势与产甲烷菌多样性的比较研究	董慧岭,季民 (1421)
锰氧化菌 <i>Aminobacter</i> sp. H1 的分离鉴定及其锰氧化机制研究	晏平,姜理英,陈建孟,何智敏,肖少丹,蒋铁锋 (1428)
1 株铁基质自养反硝化菌的脱氮特性	王弘宇,杨开,张倩,季斌,陈丹,孙宇翀,田俊 (1437)
碘普罗胺降解菌 <i>Pseudomonas</i> sp. I-24 共代谢降解性能研究	徐冰洁,高品,薛翌,何梦琦,吴凡 (1443)
利用流式细胞术研究鞘氨醇单胞菌 GY2B 降解非过程中细菌表面特性的变化	张梦露,党志,伍凤姬,梁旭军,郭楚玲,卢桂宁,杨琛 (1449)
毒性有机物 BPA 与普通小球藻的相互影响特性研究	陈善佳,陈秀荣,闫龙,赵建国,章斐,江子建 (1457)
缺镁胁迫对普通小球藻光合生理及油脂积累的影响	王珊,赵树欣,魏长龙,于水燕,史吉平,张保国 (1462)
微囊藻毒素对水稻根系生长和抗氧化系统的影响	王妮敏,邓琦,邹华,梁婢娟 (1468)
东北春大豆品种东生 1 号对臭氧胁迫的响应	张巍巍,王光华,王美玉,刘晓冰,冯兆忠 (1473)
生物结皮的发育演替与微生物生物量变化	吴丽,张高科,陈晓国,兰书斌,张德禄,胡春香 (1479)
老化土壤中铅对赤子爱胜蚓生长及繁殖的影响	陈丽红,刘征涛,方征,王晓南,王婉华 (1486)
土壤重金属镉标准值差异比较研究与建议	赵晓军,陆泗进,许人骥,李伯苓,吴国平,魏复盛 (1491)
藏北可可西里地区土壤元素背景值研究	柏建坤,王建力,李潮流,康世昌,陈鹏飞 (1498)
三峡库区香溪河消落带及库岸土壤重金属迁移特征及来源分析	胥焘,王飞,郭强,聂小倩,黄应平,陈俊 (1502)
浙江海宁电镀工业园区周边土壤重金属污染特征及生态风险分析	厉炯慧,翁珊,方婧,黄佳蕾,陆芳华,卢宇浩,张洪铭 (1509)
西湖景区土壤典型重金属污染物的来源及空间分布特征	张海珍,唐宇力,陆骏,周虹,徐芸茜,陈川,赵赞,王美娥 (1516)
生活垃圾焚烧厂周边土壤汞污染特征及评价	解惠婷,张承中,徐峰,李海凤,田振宇,唐琛,刘文彬 (1523)
上海滴水湖周边土壤和沉积物对磷的吸附特征	诸葛祥真,毕春娟,陈振楼,张焕焕,倪玮怡 (1531)
SDBS/Na ⁺ 对红壤胶体悬液稳定性的影响	唐颖,李航,朱华玲,田锐,高晓丹 (1540)
稳定化处理对矿渣中重金属迁移转化的影响研究	赵述华,陈志良,张太平,潘伟斌,彭晓春,车融,欧英娟,雷国建,周鼎 (1548)
藻类水体 Cd ²⁺ 毒性快速监测新方法研究	段静波,刘文清,张玉钧,赵南京,殷高方,肖雪,余晓娅,方丽 (1555)
用于 1,3-二硝基苯快速检测的免疫传感器研究	龙峰,施汉昌,王洪臣,盛建武 (1561)
Mg/Al 水滑石微波共沉淀法合成及其对 BrO ₃ ⁻ 吸附性能的研究	钟琼,李欢 (1566)
污染场地修复决策支持系统的几个关键问题探讨	廖晓勇,陶欢,阎秀兰,赵丹,林龙勇,李尤 (1576)
城市区域土壤铅含量空间变异的多尺度研究进展	杨孟,李凤英,刁一伟,吴丹 (1586)
水中细菌内毒素污染特性及检测方法研究进展	张灿,刘文君,张明露,田芳,杨毅,安代志 (1597)
六价铬细菌还原的分子机制研究进展	李斗,赵由才,宋立岩,尹雅洁,王洋清,徐中慧 (1602)
农副食品加工业高浓度废水的厌氧膜生物反应器技术	魏源送,郁达伟,曹磊 (1613)
《环境科学》征稿简则 (1427) 《环境科学》征订启事 (1497) 信息 (1383, 1390, 1398, 1560)	

水中细菌内毒素污染特性及检测方法研究进展

张灿¹, 刘文君^{2*}, 张明露³, 田芳^{2,5}, 杨毅⁴, 安代志¹

(1. 军事医学科学院疾病预防控制中心, 北京 100071; 2. 清华大学环境学院, 北京 100084; 3. 北京工商大学食品学院, 北京 100048; 4. 解放军总参谋部卫生防疫队, 北京 100082; 5. 南京工程学院环境工程学院, 南京 211167)

摘要: 细菌内毒素是革兰氏阴性菌和某些蓝藻细胞壁的脂多糖复合物, 主要由菌体死亡解体后释放, 是常见的外源性致热原, 具有强免疫刺激能力, 与人类多种疾病密切相关。内毒素分子的耐受力好, 耐热性强, 不易被常规方法去除。饮用水和水环境中的内毒素可通过多种暴露途径导致机体潜在的健康风险, 成为近年来研究的热点。本文概述了细菌内毒素的理化特性和生物活性, 综述了细菌内毒素多种检测方法的研究进展, 并对细菌内毒素的法定检测方法——鲎试验用于检测水体环境样品的干扰问题和排除方法进行分析。

关键词: 饮用水; 水环境; 内毒素; 脂多糖; 鲎试验; 热原检测

中图分类号: X172; X835 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2014)04-1597-05 DOI: 10.13227/j.hjks.2014.04.056

Review on Characteristics and Detecting Assay of Bacterial Endotoxin Contamination in Water Environment

ZHANG Can¹, LIU Wen-jun², ZHANG Ming-lu³, TIAN Fang^{2,5}, YANG Yi⁴, AN Dai-zhi¹

(1. Institute of Disease Control and Prevention, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China; 2. School of Environment, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 3. School of Food and Chemical Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China; 4. Public Hygiene and Antiepidemic Section, General Staff Headquarters of PLA, Beijing 100082, China; 5. School of Environmental Engineering, Nanjing Institute of Technology, Nanjing 211167, China)

Abstract: Endotoxins, also known as lipopolysaccharide complexes, are anchored in the outer membrane cell wall of most Gram-negative bacteria and some cyanobacteria. They are continuously released to environment during cell decay. Being common pyrogens and highly immunogenic molecules, endotoxins are related to many human diseases. Due to the tolerances and thermo-stability of endotoxin molecules, they were hard to be removed by common methods. The health risk caused by the endotoxin contamination in drinking water and water environment by various exposure pathways have attracted more and more attention in recent years. In this paper, the physical and chemical properties, biological activities and detection assay of the endotoxin contamination were reviewed, and interfere factors of the main assay, the LAL/TAL (*Limulus* amebocyte lysate/*Tachypleus* amebocyte lysate) assay, for detecting endotoxin in water sample were investigated, and the development tendency of the endotoxin detection assay was analyzed.

Key words: drinking water; water environment; endotoxin; lipopolysaccharide; LAL/TAL assay; pyrogen detection

细菌内毒素, 又称热原, 是革兰氏阴性菌和部分蓝藻细胞壁的脂多糖复合物, 主要由菌体死亡解体释放。内毒素是常见的外源性致热原, 属于强免疫刺激因子, 进入机体后能导致严重的炎症级联反应, 引起一系列的病理生理反应。机体对内毒素反应极为敏感, Elin 等^[1]报道将 $0.1 \sim 0.5 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1}$ 内毒素进行体内注射即可引起人体发热。为了保障患者安全, 与血液接触的药品和医疗器械都需要严格控制内毒素水平, 与血液接触的水如透析用水、制药用水等的内毒素污染也受到关注和严格控制^[2]。

近年来, 饮用水和水环境的内毒素所致健康风险开始受到关注。当水体环境发生微生物增殖或者蓝藻暴发时, 菌体死亡释放的内毒素可通过血液、呼吸、胃肠等暴露途径引发潜在的健康风险。虽然目前国内外尚未将细菌内毒素列入饮用水和再生水

水质标准, 但是近年来国外有关地表水、地下水、饮用水、再生水和污水处理厂出水等内毒素污染的研究逐年增多。如日本淀川的内毒素活性为 $311 \sim 2430 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[3]; 加拿大蒙特利尔的13个地表水源的内毒素活性为 $32 \sim 1188 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[4]; 芬兰的水源在蓝藻暴发后内毒素活性达到 $20 \sim 38000 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[5]; 科威特的自来水(海水淡化)内毒素活性为 $2.4 \sim 33.8 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[6]。2013年, 笔者调查北京市城区12个管网末梢水的内毒素范围为 $0.1 \sim 9.2 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 市售的9种瓶装饮用水内毒素范围为 $<0.004 \sim 16.0 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$; 自来水厂混凝沉淀

收稿日期: 2013-08-26; 修订日期: 2013-10-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(51008303, 50978142)

作者简介: 张灿(1975~), 女, 博士, 主要研究方向为饮用水和医疗用水水质安全, E-mail: zhangcancu@163.com

* 通讯联系人, E-mail: wjlju@tsinghua.edu.cn

等传统工艺对内毒素去除率达 63%,而活性炭吸附池和氯消毒工艺都促进了内毒素的释放^[7,8]. 相比之下,饮用水和水环境中内毒素污染研究的国内报道较少,应该得到更多的关注.

1 细菌内毒素的特性

内毒素具有广泛生物活性,与人类多种疾病相关. 内毒素进入机体后,并非直接引起机体反应,而是与机体靶细胞作用诱导产生一系列炎症介质和细胞因子,如白细胞介素-1 (interleukin-1, IL-1)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、干扰素 (interferon, IFN) 等. 这些细胞因子相互诱导和调节,导致更多的炎症细胞因子释放,形成一种“瀑布效应”的恶性循环,迅速活化不同组织器官的细胞,从而引发机体严重的病理生理反应,导致机体代谢、激素水平和神经内分泌的改变,造成细胞功能异常,导致出现发热、低血压、心动过速、休克、多器官功能衰竭甚至死亡等. 此外,细菌内毒素具有极强的耐热性(100℃ 高温下加热 1 h 仍无法灭活),160℃ 条件下加热 2 ~ 4 h,或用强碱、强酸或强氧化剂加温煮沸 30 min 才能破坏它的生物活性,因此常规消

毒和处理措施不易将其去除.

细菌内毒素主要由 O—特异性链、核心多糖、类脂 A 三部分组成(见图 1). 类脂 A 由氨基葡萄糖、磷酸和脂肪酸组成,是脂多糖不可缺少的组成部分,几乎参与内毒素介导的所有生物活性. 类脂 A 的结构差异会导致内毒素生物活性的不同. 不同种属细菌的类脂 A 部分的脂肪酸排列不同,也会导致内毒素活性的差异;同一种属的不同菌株的细菌,其内毒素的类脂 A 所含脂肪酸数目及种类不同;处于不同生长期的细菌,其类脂 A 所含的脂肪酸种类及数目可能不同,这都会导致内毒素活性有所差异. 来源于革兰氏阴性菌的内毒素与蓝藻内毒素具有结构差异,其生物活性比蓝藻内毒素高 10 倍以上^[5,9,10]. 70 年代以前,国内外都采用质量单位纳克 (ng) 来计量内毒素,但是这种计量方法并不科学. 因为相同质量的内毒素,由于菌株来源不同,提取方法不同以及所加赋形剂不同,因此其生物活性相差很大. 80 年代以后内毒素计量单位改为活性单位 (endotoxin units, EU),目前国内外对 EU 与 ng 的转换系数并未统一,一般按 1 ng = 5 ~ 10 EU 换算.

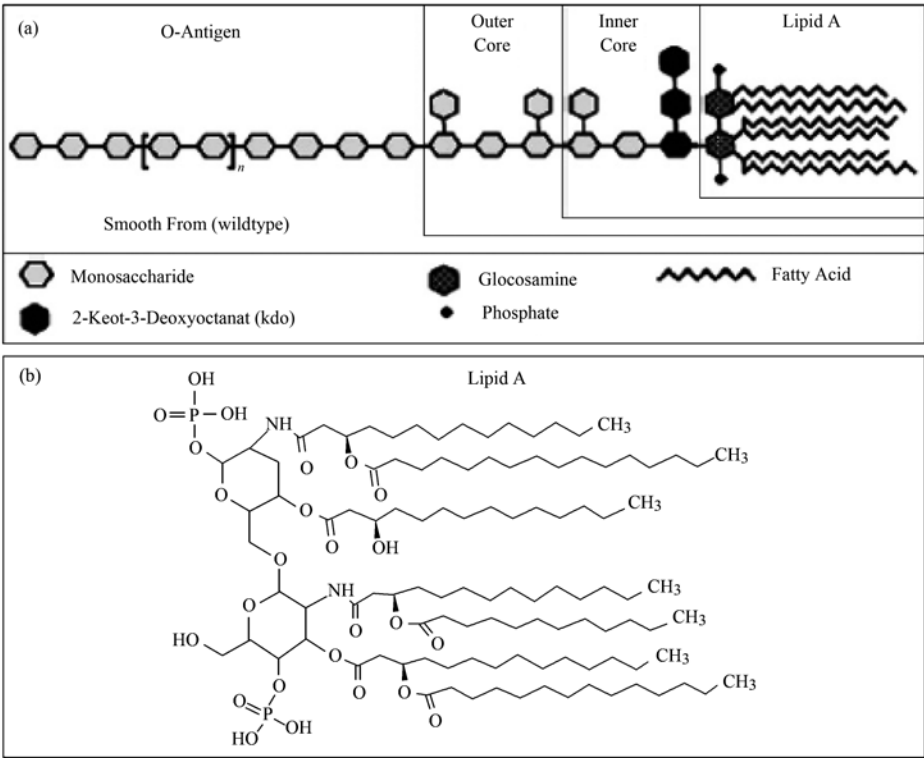


图 1 内毒素的典型结构示意图^[11]

Fig. 1 Schematic diagram of endotoxin structure

2 内毒素检测方法的研究进展

2.1 最早的内毒素检测方法——家兔法

家兔法是最原始的内毒素检测方法,1923年由Seibert首次提出,1942年美国药典首先将家兔法作为药品的热原检查方法,1953年中国药典开始收录该方法^[12].家兔法是将一定剂量的待测样品经静脉途径注入家兔体内,在规定的时间内观察家兔体温升高情况,以判定样品中所含内毒素的限量是否符合规定.家兔法能够反映出热原物质引起的哺乳动物升温过程,既能进行内毒素的检测,也能进行非内毒素致热原的检测.由于家兔的种属差异和个体差异大,家兔法检测结果重复性差,而且实验价格昂贵、时间长.目前鲎试验已经取代家兔法成为法定的内毒素检查方法,但是家兔法仍是药典认可的内毒素检测方法,对鲎试验不能检测的样品仍需要以家兔法检测.

2.2 现行的法定内毒素检测方法——鲎试验

鲎试验是目前药典规定的内毒素检测方法.鲎又称马蹄蟹,是栖生于海洋中的一种古老的节肢动物,已存在大约3.5亿年,有“活化石”之称.1963~1964年Levin等^[13]首次对细菌引起鲎血凝聚的机制进行报道,认为鲎血中阿米巴细胞与内毒素发生一系列酶促反应导致凝集反应.内毒素可以启动鲎试剂中的C因子使其成为活化C因子,活化C因子继而启动B因子使其成为活化B因子,活化的B因子再激活凝固酶原,使凝固酶原活化成凝固酶;凝固酶能切断凝固蛋白原中特定的精氨酸链,形成凝固蛋白产生凝胶(见图2).鲎试验中最重要的试剂是鲎试剂,是鲎血的阿米巴细胞(即变形细胞)溶解物的冷冻干燥品.目前常用的鲎试剂有美洲鲎试剂(*Limulus amoebocyte lysate*, LAL)和东方鲎试剂(*Tachypleus amoebocyte lysate*, TAL)等,我国多采用TAL试剂,其反应机制基本相同.目前鲎试验主要有3种方法:凝胶法、浊度法和显色法,其机制如图2所示.凝胶法是基于判断凝胶形成的检测方法,较快速,经济方便,但只能用于定性和半定量检测.浊度法是采用分光光度计检测凝胶形成过程中浊度的变化.显色法是利用凝固酶水解显色底物产生的显色基团,使吸光度发生变化.浊度法和显色法两种又统称光度法,根据检测过程的不同分为终点浊度法/动态浊度法和终点比色法/动态比色法.与凝胶法相比,浊度法和显色法所得数据更精确,可以用于定量检测,而且快速、简便、重复性好、灵敏度高、易推

广和标准化、能进行大量样品的分析.

鲎试验的灵敏度远远高于家兔法,操作简单、成本低廉、标准化程度高、重复性好.自从1980年《美国药典》第20版收录鲎试验以来,各国药典等相继收录该方法.1993年中国药典第二增补本开始收录鲎试验用于检测内毒素,2005年版中国药典正式将光度法(浊度法和显色法)收录作为内毒素的定量测试方法^[14].

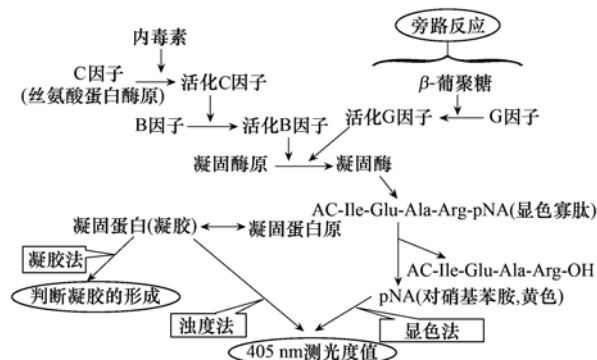


图2 鲎试剂与内毒素的反应机制

Fig. 2 Mechanism of reaction between endotoxin and LAL/TAL reagent

2.3 气相色谱-质谱检测内毒素分子的3-羟基脂肪酸 Binding等^[15]和Saraf等^[16]利用气相色谱-质谱(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)检测内毒素分子的3-羟基脂肪酸来表征内毒素含量,但是检测结果显示3-羟基脂肪酸的含量与内毒素的生物活性无均一的关联性.由于3-羟基脂肪酸是内毒素分子中类脂A的一个典型结构,并非活性基团,因此GC-MS检测内毒素分子的3-羟基脂肪酸不能反映内毒素生物学活性,因此限制了该方法的进一步应用.

2.4 凝胶过滤色谱-质谱检测内毒素分子的KDO成分

内毒素的核心多糖含有特殊的酮糖(3-脱氧-D-甘露糖-辛酮糖, KDO), KDO成分与类脂A的氨基葡萄糖连接. Rybka等^[17]利用凝胶过滤色谱-质谱(gel permeation chromatography-mass spectrometry, GLC-MS)检测内毒素的KDO成分,结果表明该方法适用于测定人体体液样品,但对于含有多种细菌的实际环境样品,该方法却不能准确检测内毒素水平. KDO成分是内毒素分子中核心多糖的一个典型结构,不是活性基团,因此GLC-MS检测内毒素的KDO成分也不能准确表征内毒素生物学活性.

2.5 重组C因子方法

在鲎试验中,内毒素激活C因子并启动整个鲎

血的血凝级联系统,其中 C 因子是对内毒素敏感的丝氨酸蛋白酶。目前有研究采用重组 C 因子方法进行内毒素检测^[18],重组 C 因子方法克服了鲎试剂的生产批次不同而导致的检测结果差异。重组 C 因子方法不涉及引起鲎试验中旁路反应的 G 因子,避免因葡聚糖产生假阳性结果。Alwis 等^[19]采用重组 C 因子方法对居室空气内毒素进行检测,与鲎试验的检测结果相比,两种方法的相关系数为 0.86。Gehr 等^[4]采用重组 C 因子和鲎试验两种方法检测相同水样,发现此两种检测方法虽然机制相似,但是检测结果差异较大,相关系数为 0.137~0.966。

2.6 酶联免疫测定法

目前报道的基于酶联免疫测定法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA 方法) 的内毒素检测方法,主要有以下两种方法:一种是基于 ELISA 方法与鲎试验的结合,用酶联免疫吸附的方法以抗凝固酶原的单克隆抗体,测定经鲎试验后样品中残存的凝固酶原量,得到内毒素与吸附呈反比的曲线,通过标准曲线检测样品内毒素^[20]。另一种是基于内毒素的致热原理,即外加内毒素刺激巨噬细胞后产生内热原物质,如肿瘤坏死因子 (TNF) 和白细胞介素 1 (IL-1) 等,采用 ELISA 方法对内毒素进行定量测定^[21]。从目前研究看,基于 ELISA 方法的内毒素检测还有待于进一步提高精确度和加强验证。

2.7 生物传感器

国内外有采用生物传感器用于内毒素检测的报道,较多见的是压电生物传感器。Muramatsu 等^[22]根据内毒素与鲎试剂发生凝集反应后溶液黏度的变化,建立一种基于镀钽 9MHz AT 切割石英晶体的压电传感器,最低检测限能达到 $1 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。熊兴良等^[23]研制了一种基于石英晶体的液体阻尼效应压电生物传感器,该传感器能灵敏地响应内毒素与 LAL 凝胶反应过程引起液体流变学性质 (黏度和密度) 变化,虽然检测限和检测时间有较大的提高,但样品的黏滞度、浑浊度和密度对结果仍有影响。

3 水体环境样品内毒素检测的干扰因素分析

目前,现有研究中水体环境样品的内毒素检测大多数都采用鲎试验。鲎试验属于生物毒性测试方法,不是精确的分析方法。一些非内毒素分子也能引起相似的凝集现象,如 β -葡聚糖及其类似物存在着 G 因子反应旁路 (如图 2),使鲎试剂发生凝集反应,引起假阳性结果。由于鲎试验的本质是一系列的酶促反应,影响酶促反应的因素如络合物、生化试剂、

抗生素、消毒剂、某些无机离子等均会干扰鲎试验中凝胶的形成。此外,鲎试剂属于生物试剂,样品中的化学物质、蛋白和其他试剂也容易引起鲎试剂的变性。能够引起内毒素分子吸附、屏蔽、聚集作用的因素会引起鲎试验的严重干扰,例如高浓度的阴阳离子、特异性离子、C 因子 (即丝氨酸蛋白) 的抑制剂等。在光度法鲎试验中,可能影响光密度值的因素,如某些溶液的色度或者浊度较高等,都会干扰检测结果。药典规定,只有收录的药品和医疗器械才可以采用鲎试验检测内毒素,如美国药典 24 版共收录 579 种药品适于细菌内毒素检查,中国药典 2005 版规定 168 个品种适合以鲎试验进行内毒素检测。

为了确定样品的干扰情况和保证数据可靠性,鲎试验之前必须先做样品的干扰试验,以加标回收率来分析样品对鲎试验的抑制/增强效果^[14]。中国药典 2005 版规定鲎试验的加标回收率控制在 50%~200% 之间^[14]。目前,最常用的去除干扰方法是对样品多倍稀释,但是对于干扰严重的样品,多倍稀释后内毒素活性可能会极低,甚至不能达到最低检测限,这样仍难以保证合适的加标回收率。由于内毒素分子的耐热性强、不易挥发,也可以采取氮吹或加热的方法对挥发性、不耐热的干扰成分进行排除。采用鲎试验检测组分复杂的水环境样品,会有更多的干扰因素。例如,水样的 pH 值严重干扰鲎试验,样品必须保证在 pH 6.0~8.0 范围内进行,采用 TAL 试剂时最好将样品调节 pH 6.5~7.5^[24]。对于过酸或者过碱的水样,需要采用多倍稀释或者无热原缓冲溶液调节 pH 值。水样中添加高浓度的盐类物质,也会干扰鲎试验的准确性,主要原因是蛋白质的盐析作用破坏了鲎试剂的酶活性,降低酶促反应速度;其次,盐类引起水样过酸过碱也会干扰鲎试验的检测。水中盐类浓度高时,必须多倍稀释后才能进行鲎试验,如果仍达不到合格的回收率,则不适于进行内毒素检测。此外,水样的添加剂或者使用的试验器材可能会影响鲎试验结果,例如水中的螯合剂 EDTA 可以干扰鲎试验的凝集反应;滤纸或者过滤材料中含有葡聚糖,会引起鲎试验的旁路反应,从而引起检测结果的假阳性。

4 结论

随着人们对内毒素所致健康风险的关注,内毒素的研究领域已由原来的生物医药领域逐渐向外扩展。近年来,饮用水和水环境领域的内毒素污染已经成为国外研究的热点。鲎试验是药典规定的内毒素

检测方法,被称为现行内毒素检测的“金标准”,但是鲎试验属于生物毒性测试方法,复杂样品尤其是环境样品中会存在多种干扰因素.此外,鲎试剂的制备需要捕杀大量鲎,随着人类对鲎的保护越来越重视,鲎资源的利用也逐渐受到限制.目前,随着现代分析测试技术发展和交融,出现了多种新型的内毒素检测方法,但是都没有得到认可,需要进一步改进和验证.因此,开发新型理化检测技术替代传统的鲎试验,并探索将之用于检测复杂组分的样品(如实际水体样品),是内毒素检测方法研究的重要任务,也是水环境微生物学安全研究的重要内容.

参考文献:

- [1] Elin R J, Wolff S M, McAdam K P W J, *et al.* Properties of reference *Escherichia coli* endotoxin and its phthalylated derivative in humans[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 1981, **144** (4): 329-336.
- [2] Hindman S H, Carson L A, Favero M S, *et al.* Pyrogenic reactions during haemodialysis caused by extramural endotoxin [J]. *The Lancet*, 1975, **306**(7938): 732-734.
- [3] Ohkouchi Y, Ishikawa S, Takahashi K, *et al.* Factors associated with endotoxin fluctuation in aquatic environment and characterization of endotoxin removal in water treatment process [J]. *Environmental Engineering Research*, 2007, **44**: 247-254.
- [4] Gehr R, Uribe S P, Baptista I F D, *et al.* Concentrations of endotoxins in waters around the island of Montreal, and treatment options[J]. *Water Quality Research Journal of Canada*, 2008, **43**(4): 291-303.
- [5] Rapala J, Lahti K, Räsänen L A, *et al.* Endotoxins associated with cyanobacteria and their removal during drinking water treatment[J]. *Water Research*, 2002, **36**(10): 2627-2635.
- [6] Abdulraheem A, Mustafa S, Al-Saffar N, *et al.* Detection of bacterial endotoxin in drinking tap and bottled water in Kuwait [J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2012, **184** (12): 7323-7328.
- [7] 张灿, 刘文君, 张明露, 等. 城市生活饮用水和瓶装饮用水的细菌内毒素活性调查[J]. *中国给水排水*, 2013, **29**(13): 47-52.
- [8] Zhang C, Liu W J, Sun W, *et al.* Endotoxin contamination and control in surface water sources and a drinking water treatment plant in Beijing, China[J]. *Water Research*, 2013, **47**(11): 3591-3599.
- [9] Anderson W B, Slawson R M, Mayfield C I. A review of drinking-water-associated endotoxin, including potential routes of human exposure[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2002, **48**(7): 567-587.
- [10] Keleti G, Sykora J L. Production and properties of cyanobacterial endotoxins[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, **43**(1): 104-109.
- [11] Parikh S J, Chorover J. Infrared spectroscopy studies of cation effects on lipopolysaccharides in aqueous solution[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2007, **55**(2): 241-250.
- [12] 杨忠思, 吴振军, 杜滨. 热原和细菌内毒素检查研究进展[J]. *医学综述*, 2005, **11**(2): 142-144.
- [13] Levin J, Bang F B. Clottable protein in *Limulus*; its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin[J]. *Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica*, 1968, **19**(1): 186-197.
- [14] 中国国家药典委员会, 中华人民共和国药典[S]. vol(II). 北京: 中国医药科技出版社, 2005.
- [15] Binding N, Jaschinski S, Werlich S, *et al.* Quantification of bacterial lipopolysaccharides (endotoxin) by GC-MS determination of 3-hydroxy fatty acids [J]. *Journal of Environmental Monitoring*, 2004, **6**(1): 65-70.
- [16] Saraf A, Larsson L, Burge H, *et al.* Quantification of ergosterol and 3-hydroxy fatty acids in settled house dust by gas chromatography-mass spectrometry: comparison with fungal culture and determination of endotoxin by a *Limulus* amoebocyte lysate assay [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **63**(7): 2554-2559.
- [17] Rybka J, Gamian A. Determination of endotoxin by the measurement of the acetylated methyl glycoside derivative of Kdo with gas - liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, **64**(2): 171-184.
- [18] Ding J L, Ho B. A new era in pyrogen testing[J]. *Trends in Biotechnology*, 2001, **19**(8): 277-281.
- [19] Alwis K U, Milton D K. Recombinant factor C assay for measuring endotoxin in house dust: Comparison with LAL, and (1 → 3)-β-D-glucans [J]. *American Journal of Industrial Medicine*, 2006, **49**(4): 296-300.
- [20] Zhang G H, Baek L, Koeh C. New microassay for quantitation of endotoxin using *Limulus* amoebocyte lysate combined with enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1988, **26**(8): 1464-1470.
- [21] 徐修礼, 薛采芳, 于文彬, 等. 双抗体夹心 ELISA 定量检测内毒素的方法学研究[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2002, **18**(2): 175-183.
- [22] Muramatsu H, Suda M, Ataka T. Piezoelectric resonator as a chemical and biochemical sensing device [J]. *Sensors and Actuators A: Physical*, 1990, **21**(1-3): 362-368.
- [23] 熊兴良, 王翔, 蔡绍哲. 一种检测低内毒素浓度的传感器[J]. *生物医学工程学杂志*, 2005, **22**(5): 1040-1044.
- [24] 高国政, 颜锦. pH 值影响细菌内毒素测定的实验室研究[J]. *中国药理学杂志*, 1998, **33**(3): 162-165.

CONTENTS

Analysis of Characteristics of Black Carbon Concentration in Shanghai from 2008 to 2012	WANG Hong-qiang, HE Qian-shan, CHEN Yong-hang, <i>et al.</i> (1215)
Chemical Characteristics and Insoluble Particulates' Surface Morphology of a Snowfall Process in the Southeastern Suburb of Urumqi	LU Hui, WEI Wen-shou, CUI Cai-xia, <i>et al.</i> (1223)
Comparative Study of the Level and Distribution of Polybrominated Diphenyl Ethers and New Brominated Flame Retardants in the Atmosphere of Typical Urban	WU Hui, JIN Jun, WANG Ying, <i>et al.</i> (1230)
Source and Health Risk Assessment of Heavy Metals in Ambient Air PM ₁₀ from One Coking Plant	DONG Ting, LI Tian-xin, ZHAO Xiu-ge, <i>et al.</i> (1238)
Estimation of Average Traffic Emission Factor Based on Synchronized Incremental Traffic Flow and Air Pollutant Concentration	LI Run-kui, ZHAO Tong, LI Zhi-peng, <i>et al.</i> (1245)
Study on Critical Loads of Sulfur and Nitrogen in the Pearl River Delta	SUN Cheng-ling, XIE Shao-dong (1250)
Hydrogen Sulfide Removal by the Combination of Non-Thermal Plasma and Biological Process	LI Hua-qin, HE Jue-cong, CHEN Zhou-yang, <i>et al.</i> (1256)
Spatial Distribution and Risk Assessment of Atrazine in Taizi River Basin, China	ZHENG Lei, ZHANG Yi-zhang, ZHANG Yuan, <i>et al.</i> (1263)
Development of a Method for Measuring Dissolved Reactive Phosphorus (DRP) and Dissolved Ferrous Iron in Large Batch in Pore Water Samples of Sediments with Micro-volumes	WANG Yan, ZHU Chun-gang, XU Di, <i>et al.</i> (1271)
Temporal and Spatial Variation of Water Nutrient Level After Exogenous Nutrient Input	FU Ling, ZHAO Kai, WANG Guo-xiang, <i>et al.</i> (1278)
Physical Process Based Risk Assessment of Groundwater Pollution in the Mining Area	SUN Fa-sheng, CHENG Pin, ZHANG Bo (1285)
Hydrogeochemical Characteristics of a Typical Karst Groundwater System in Chongqing	YANG Ping-heng, LU Bing-qing, HE Qiu-fang, <i>et al.</i> (1290)
Investigation of Nitrogen, Phosphorus and Microbial Contamination in Laolongdong Underground River System of Chongqing	LAN Jia-cheng, YANG Ping-heng, REN Kun, <i>et al.</i> (1297)
Effects on Phosphorus Fraction Distribution in Sediment by Roots of <i>Vallisneria natans</i>	LI Zhen-guo, WANG Guo-xiang, ZHANG Jia, <i>et al.</i> (1304)
Modeling Nitrogen Transformation in a Novel Circular-Flow Corridor Wetland	PENG Jian-feng, SONG Yong-hui, YUAN Peng, <i>et al.</i> (1311)
Natural Attenuation of Tetracycline in the Water of Taihu Lake Under Different Environmental Conditions	DUAN Lun-chao, WANG Feng-he, JI Ying-xue, <i>et al.</i> (1318)
Inactivation and Reactivation of Antibiotic-Resistant Bacteria During and After UV Disinfection in Reclaimed Water	HUANG Jing-jing, TANG Fang, XI Jin-ying, <i>et al.</i> (1326)
Photoreactivation of <i>Escherichia coli</i> and <i>Enterococcus faecalis</i> in the Secondary Effluent Disinfected by UV-TiO ₂	WANG Xi-feng, GONG Xin, HU Xiao-lian, <i>et al.</i> (1332)
Stability of C ₆₀ Nanoparticles in Aquatic Systems	FANG Hua, SHEN Bing-bing, JING Jie, <i>et al.</i> (1337)
Fouling Behavior of Sodium Alginate During Microfiltration at Various Ionic Compositions; XDLVO Approach	ZHAO Ying-xu, ZONG Rui-qiang, GAO Xin-yu, <i>et al.</i> (1343)
Enhanced Remediation of 4-Chloronitrobenzene Contaminated Groundwater with Nanoscale Zero-valence Iron (nZVI) Catalyzed Hydrogen Peroxide (H ₂ O ₂)	FU Rong-bing (1351)
Effect of the Coexistence of Chlorobenzene Homologue on Anaerobic Degradation of Hexachlorobenzene	WANG Qi, LIU Hui, JIANG Lin, <i>et al.</i> (1358)
Research on Removal Efficiency of Cd(II)-bearing Wastewater by Sulfate-reducing Biological Filter	WU Xuan, TAN Ke-yan, HU Xi-jia, <i>et al.</i> (1366)
Control Strategies of Nitrogen Removal Process in a Pilot Test of the Southern WWTP Based on the Nitrogen Balance	JIANG Ying-he, LIU Pei-ju, WANG Lei, <i>et al.</i> (1372)
Effect of Simulated Inorganic Anion Leaching Solution of Electroplating Sludge on the Bioactivity of <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	CHEN Yan, HUANG Fang, XIE Xin-yuan (1377)
Microbial Reduction of Cu ²⁺ Mediated by Electroactive Biofilms	LIU Yi, ZHOU Shun-gui, YUAN Yong, <i>et al.</i> (1384)
Copper Recovery from Artificial Bioleaching Lixivium of Waste Printed Circuit Boards	CHENG Dan, ZHU Neng-wu, WU Ping-xiao, <i>et al.</i> (1391)
Difference of Contaminant Composition Between Landfill Leachates and Groundwater and Its Reasons	HE Xiao-song, YU Hong, XI Bei-dou, <i>et al.</i> (1399)
Photochemical Degradation of Landfill Leachate Facilitated by Combined Schwertmannite and H ₂ O ₂	WANG He-ru, SONG Yong-wei, XU Zhi-hui, <i>et al.</i> (1407)
Effects of Operating Parameters on Organic Toxicity of Sludge Treating Synthetic Bisphenol A Wastewater	YANG Na, CHEN Xiu-rong, LIN Feng-kai, <i>et al.</i> (1414)
Comparative Study on Biological Methane Potential and Methanogen Biodiversity in the Anaerobic Digestion of Excess Sludge	DONG Hui-yu, JI Min (1421)
Isolation and Identification of Mn Oxidizing Bacterium <i>Aminobacter</i> sp. H1 and Its Oxidation Mechanism	YAN Ping, JIANG Li-ying, CHEN Jian-meng, <i>et al.</i> (1428)
Nitrate Removal by a Strain of Nitrate-Dependent Fe(II)-Oxidizing Bacteria	WANG Hong-yu, YANG Kai, ZHANG Qian, <i>et al.</i> (1437)
Study on the Iopromide-Degrading Characteristics of Strain <i>Pseudomonas</i> sp. I-24 via Co-Metabolism	XU Bing-jie, GAO Pin, XUE Gang, <i>et al.</i> (1443)
Using Flow Cytometry to Explore the Changes of <i>Sphingomonas</i> sp. GY2B Bacterial Surface Characteristics in the Process of Degrading Phenanthrene	ZHANG Meng-lu, DANG Zhi, WU Feng-ji, <i>et al.</i> (1449)
Research on Characteristic of Interrelationship Between Toxic Organic Compound BPA and <i>Chlorella vulgaris</i>	CHEN Shan-jia, CHEN Xiu-rong, YAN Long, <i>et al.</i> (1457)
Effect of Magnesium Deficiency on Photosynthetic Physiology and Triacylglyceride (TAG) Accumulation of <i>Chlorella vulgaris</i>	WANG Shan, ZHAO Shu-xin, WEI Chang-long, <i>et al.</i> (1462)
Effects of Microcystins on Growth and Antioxidant System of Rice Roots	WANG Wei-min, DENG Yu, ZOU Hua, <i>et al.</i> (1468)
Responses of Soybean Cultivar Dongsheng-1 to Different O ₃ Concentrations in Northeast China	ZHANG Wei-wei, WANG Guang-hua, WANG Mei-yu, <i>et al.</i> (1473)
Development and Succession of Biological Soil Crusts and the Changes of Microbial Biomasses	WU Li, ZHANG Gao-ke, CHEN Xiao-guo, <i>et al.</i> (1479)
Effects of Lead on the Growth and Reproduction of <i>Eisenia fetida</i> with Aged Soils	CHEN Li-hong, LIU Zheng-tao, FANG Zheng, <i>et al.</i> (1486)
Soil Heavy Metal Cadmium Standard Limit and Range of Background Value Research	ZHAO Xiao-jun, LI Si-jin, XU Ren-ji, <i>et al.</i> (1491)
Study on Soil Element Background Values of the Hoh Xil Area in North Tibet	BAI Jian-kun, WANG Jian-li, LI Chao-liu, <i>et al.</i> (1498)
Transfer Characteristic and Source Identification of Soil Heavy Metals from Water-Level-Fluctuating Zone Along Xiangxi River, Three-Gorges Reservoir Area	XU Tao, WANG Fei, GUO Qiang, <i>et al.</i> (1502)
Heavy Metal Pollution Characteristics and Ecological Risk Analysis for Soil Around Haining Electroplating Industrial Park	LI Jiong-hui, WENG Shan, FANG Jing, <i>et al.</i> (1509)
Sources and Spatial Distribution of Typical Heavy Metal Pollutants in Soils in Xihu Scenic Area	ZHANG Hai-zhen, TANG Yu-li, LU Jun, <i>et al.</i> (1516)
Distribution and Assessment of Mercury in the Ambient Soil of a Municipal Solid Waste Incinerator	XIE Hui-ting, ZHANG Cheng-zhong, XU Feng, <i>et al.</i> (1523)
Phosphorus Adsorption Characteristics of Soils and Sediments Surrounding Dishui Lake in Shanghai	ZHUGE Xiang-zhen, BI Chun-juan, CHEN Zhen-lou, <i>et al.</i> (1531)
Impact of SDBS/Na ⁺ on Red Soil Colloidal Stability	TANG Ying, LI Hang, ZHU Hua-ling, <i>et al.</i> (1540)
Effects of Stabilization Treatment on Migration and Transformation of Heavy Metals in Mineral Waste Residues	ZHAO Shu-hua, CHEN Zhi-liang, ZHANG Tai-ping, <i>et al.</i> (1548)
Study on a New Method of Fast Monitoring Toxicity of Cd ²⁺ by Algal in Water	DUAN Jing-bo, LIU Wen-qing, ZHANG Yu-jun, <i>et al.</i> (1555)
Immunosensor for Rapid Detection of 1,3-Dinitrobenzene	LONG Feng, SHI Han-chang, WANG Hong-chen, <i>et al.</i> (1561)
Mg/Al Layered Double Hydroxides Prepared by Microwave-Assisted Co-Precipitation Method for the Removal of Bromate	ZHONG Qiong, LI Huan (1566)
Discussion on Several Key Points of Decision Support System for Remediation of Contaminated Sites	LIAO Xiao-yong, TAO Huan, YAN Xiu-lan, <i>et al.</i> (1576)
A Review of Multi-Scale Studies on Spatial Variation of the Lead (Pb) Concentration in Urban Soils	YANG Meng, LI Feng-ying, DIAO Yi-wei, <i>et al.</i> (1586)
Review on Characteristics and Detecting Assay of Bacterial Endotoxin Contamination in Water Environment	ZHANG Can, LIU Wen-jun, ZHANG Ming-lu, <i>et al.</i> (1597)
Advances in Molecular Mechanism of Bacterial Reduction of Hexavalent Chromium	LI Dou, ZHAO You-cai, SONG Li-yan, <i>et al.</i> (1602)
Anaerobic Membrane Bioreactors for Treating Agricultural and Food Processing Wastewater at High Strength	WEI Yuan-song, YU Da-wei, CAO Lei (1613)

《环境科学》第6届编辑委员会

主 编: 欧阳自远

副主编: 赵景柱 郝吉明 田 刚

编 委: (按姓氏笔画排序)

万国江 王华聪 王凯军 王绪绪 田 刚 田 静 史培军
朱永官 刘志培 汤鸿霄 陈吉宁 孟 伟 周宗灿 林金明
欧阳自远 赵景柱 姜 林 郝郑平 郝吉明 聂永丰 黄 霞
黄 耀 鲍 强 潘 纲 潘 涛 魏复盛

环 境 科 学

(HUANJING KEXUE)

(月刊 1976年8月创刊)

2014年4月15日 35卷 第4期

ENVIRONMENTAL SCIENCE

(Monthly Started in 1976)

Vol. 35 No. 4 Apr. 15, 2014

主 管	中国科学院	Superintended	by	Chinese Academy of Sciences
主 办	中国科学院生态环境研究中心	Sponsored	by	Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences
协 办	(以参加先后为序) 北京市环境保护科学研究院 清华大学环境学院	Co-Sponsored	by	Beijing Municipal Research Institute of Environmental Protection School of Environment, Tsinghua University
主 编	欧阳自远	Editor-in -Chief		OUYANG Zi-yuan
编 辑	《环境科学》编辑委员会 北京市2871信箱(海淀区双清路 18号, 邮政编码:100085) 电话:010-62941102, 010-62849343 传真:010-62849343 E-mail: hjkx@ rcees. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn	Edited	by	The Editorial Board of Environmental Science (HUANJING KEXUE) P. O. Box 2871, Beijing 100085, China Tel:010-62941102, 010-62849343; Fax:010-62849343 E-mail: hjkx@ rcees. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn
出 版	科 学 出 版 社 北京东黄城根北街16号 邮政编码:100717	Published	by	Science Press 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
印 刷 装 订	北京北林印刷厂	Printed	by	Beijing Bei Lin Printing House
发 行	科 学 出 版 社 电话:010-64017032 E-mail: journal@ mail. sciencep. com	Distributed	by	Science Press Tel:010-64017032 E-mail: journal@ mail. sciencep. com
订 购 处	全国各地邮电局	Domestic		All Local Post Offices in China
国外总发行	中国国际图书贸易总公司 (北京399信箱)	Foreign		China International Book Trading Corporation (Guoji Shudian), P. O. Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号: ISSN 0250-3301
CN 11-1895/X

国内邮发代号: 2-821

国内定价: 90.00元

国外发行代号: M 205

国内外公开发行