

研究报告

大气 PM_{2.5} 中微生物活性的探测

任伟珊 杜睿* 杜鹏瑞 章苏剑

(中国科学院大学资源与环境学院 北京 101400)

摘要:【背景】细颗粒物(PM_{2.5})具有多种毒性效应,长期暴露对机体可造成严重危害。微生物作为 PM_{2.5} 的重要生物组成成分,目前尚无简单易行地测定 PM_{2.5} 中微生物活性的方法。【目的】利用小流量采样仪采集细颗粒物 PM_{2.5},通过大量的模拟和测试实验,初步建立了一套测定 PM_{2.5} 中微生物活性水平的荧光素二乙酸酯(FDA)水解法。【方法】使用 5 L/min 的小流量采样仪采集样品 40 min, FDA 的浓度为 200 μg/mL,经过 1.5 h 的暗反应,使用丙酮终止 15 min 后测定其荧光强度,并计算微生物活性。【结果】利用该方法测得 2017 年 7 月大气 PM_{2.5} 中微生物活性平均水平为 0.873 ng/m³ 荧光素钠;室内空气细颗粒物 PM_{2.5} 中微生物活性水平为 1.110 ng/m³ 荧光素钠。【结论】建立了一种有效准确地测定大气颗粒物 PM_{2.5} 中微生物活性的方法。

关键词: PM_{2.5}, 微生物活性, 荧光素二乙酸酯

Microbial activity in atmospheric PM_{2.5}

REN Wei-Shan DU Rui* DU Peng-Rui ZHANG Su-Jian

(College of Resources and Environment, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101400, China)

Abstract: [Background] PM_{2.5} has many toxic effects that seriously damage organisms with long-term exposure. However, few studies have found a simple method to measure its microbial activity, although microorganisms are the important biological components of PM_{2.5}. [Objective] Few developed a fluorescein diacetate hydrolysis method to test microbial activity in atmospheric PM_{2.5} through a large number of experiments and simulations. [Methods] We optimized and determined main testing parameters. Samples were collected by using an OMNI FTTM Ambient Air Sampler with a flow rate of 5 L/min for 40 min. The concentration of fluorescein diacetate was 200 μg/mL, and acetone was added to stop the reaction after 1.5 hours in dark environment. Microbial activity in atmospheric PM_{2.5} was measured after 15 min. [Results] Microbial activity in outdoor and indoor PM_{2.5} in July 2017 was with the average of 0.873 ng/m³ and 1.110 ng/m³ sodium fluorescein. [Conclusion] This paper established an effective and accurate method to measured microbial activity in atmospheric PM_{2.5}.

Keywords: PM_{2.5}, Microbial activity, Fluorescein diacetate (FDA)

Foundation item: Natural Science Foundation of Beijing City (8172045)

*Corresponding author: Tel: 86-10-69672840; E-mail: ruidu@ucas.ac.cn

Received: December 20, 2017; Accepted: March 16, 2018; Published online (www.cnki.net): March 19, 2018
基金项目: 北京市自然科学基金(8172045)

*通信作者: Tel: 86-10-69672840; E-mail: ruidu@ucas.ac.cn

收稿日期: 2017-12-20; 接受日期: 2018-03-16; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-03-19

当前以雾霾为首的大气污染问题已经形成了涉及范围广、持续时间长、强度大、呈区域性发展的特点,特别是雾霾形成时急剧增加的细颗粒物(PM_{2.5})严重影响人类健康和生存,因此受到了公众的广泛关注。由于PM_{2.5}粒径较小而比表面积较大,富集了大部分的有害物质^[1],如重金属、氟化物、硝酸盐及生物气溶胶等,而且能较长时间悬浮于大气中,并可以经呼吸系统进入到肺泡内^[2],不易被排除。已有研究^[3]显示:细颗粒物(PM_{2.5})具有呼吸系统毒性、心血管毒性、免疫毒性、神经毒性等多种毒性效应,可对机体造成极大危害。虽然细颗粒物(PM_{2.5})具有多种毒性效应,但其毒性成分和致毒机制至今尚不明确,因此对细颗粒物(PM_{2.5})的毒性研究仍有十分重要的意义。

Cao 等^[4]采用宏基因组分析测序的方法,针对近年频发的北京重大灰霾污染事件的观测研究显示:通过对2013年1月份连续7d的PM_{2.5}颗粒物样本进行分析,在种的水平上确定了致病菌的存在,并且发现一些致病菌的相对丰度会随着霾污染程度的增加而增加。目前大部分研究都是针对PM_{2.5}中微生物浓度及其群落结构组成方面的^[5-6];但是能准确和直接地表征大气微生物对于公共健康潜在危害的指标,还应是PM_{2.5}中微生物的活性。由于操作难度较大,对于大气生物气溶胶中微生物活性的研究却鲜有报道。

目前关于环境样品微生物活性的测定主要包括测定呼吸速率^[7]、同位素标记法^[8]、RNA 表征法^[9]和酶活性分析法^[10]。绝大部分研究用特定代谢过程的速率来反映微生物的特定活性,但是往往不能反映环境中微生物整体的代谢状态和综合生态系统功能。利用荧光素二乙酸酯(FDA)能在非专一性水解酶作用下发生催化水解,产生具有荧光的产物^[11],而且这些酶广泛存在于细菌及真菌中。

最早, Kramer 等^[12]利用FDA水解反应测定了脂肪酶的活性。到20世纪末, Swisher 等^[10]提出测定土壤FDA水解酶活性的基本方法, Schnürer 等^[13]利用此方法测定了土壤和秸秆中的总微生物活性,

随后此方法开始广泛应用在土壤酶学的研究中。Adam 等^[14]解决了背景值较高的问题;王佳佳等^[15]利用荧光分光光度法,将灵敏度提高了2-4个数量级,从而可以检测出微生物活性较低的样品。截至目前,有关FDA水解酶活性方面的报道,虽然在国内外已有大量的研究和应用^[13,15-16],但多数是有关土壤样品微生物的活性测定^[17],近年来也有逐渐应用于细胞活性等方面的研究^[18]。

Qi 等率先探索了测试大气颗粒物中微生物活性的技术方法^[19],但其所使用六级采集器粒径分布为1级:>7 μm;2级:4.7-7.0 μm;3级:3.3-4.7 μm;4级:2.1-3.3 μm;5级:1.1-2.1 μm;6级:0.65-1.1 μm;其采集样品粒径分布范围较广,缺乏针对PM_{2.5}颗粒物(≤2.5 μm)的。因此,如何有效测定可吸入人体内PM_{2.5}中的微生物活性仍然是摆在当前科学界的一道难题。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

荧光素二乙酸酯(Fluorescein diacetate, FDA)及荧光素试剂均由Sigma公司提供,纯度≥97%;其它试剂均为国产分析纯。使用Whatman公司生产的石英膜采集PM_{2.5}颗粒物。可培养菌株:分离自北京大气PM_{2.5}颗粒物中, GenBank 数据库登录号为MF806584。

马弗炉,上海一恒科技有限公司;OMNI FT™迷你型环境大气采样器,BGI公司,流量为5 L/min,具有契合人体呼吸通量的优点;多功能酶标仪, Molecular Devices 公司,其优点是测样所使用的试剂量少、样品检测线低、灵敏度高并且可以同时检测多个样品,大大提高工作效率和样品检测水平。

1.2 初始条件的选择

为确定大气微生物与荧光素二乙酸酯(FDA)反应的可行性,利用可培养大气菌株作为实验样品进行了预实验分析;并通过改变不同实验条件,初步确定大气PM_{2.5}微生物活性的测定方法的初始

条件。

1.2.1 菌悬液的制备

使用的菌株为北京大气 PM_{2.5} 颗粒物中分离纯化得到的可培养菌株, 颗粒物采集于 2015 年夏季, 经检测属薄层菌属(*Hymenobacter*), 提取该菌株 DNA 并进行序列测定, 将处理后的有效序列提交至 GenBank 数据库中, 获得的登录号为 MF806584。将分离纯化的单菌落加入到无菌生理盐水中制备菌悬液, 经细胞染色后, 通过显微镜计数, 得到菌悬液浓度约为 10⁶ cells/mL。利用新配制的菌悬液来确定 FDA 水解法对大气 PM_{2.5} 中微生物活性测定的初始参数。

1.2.2 底物(FDA)浓度的选择

设置 5 个不同浓度的 FDA 溶液, 分别为 50、100、150、200、250 μg/mL FDA 溶液。在装有 5 mL 菌悬液的 10 mL 离心管中, 各加入 50 μL 不同浓度的 FDA 溶液, 30 °C 生化培养箱中避光反应 120 min, 后加入 50% 丙酮终止 30 min, 测定上清液荧光强度。每个浓度设置 3 组平行, 其中空白对照组浓度为 0。初步得出合适的 FDA 浓度。

1.2.3 最佳反应时长的选择

在装有 5 mL 菌悬液的 10 mL 离心管中, 加入 50 μL 上述实验已确定浓度的 FDA 溶液, 于 30 °C 生化培养箱中避光反应, 在反应进行 0、30、60、90、120、150 和 180 min 时, 分别加入 50% 丙酮终止 30 min, 测定上清液荧光强度。反应在 0 min 时的荧光强度为空白组, 每个反应时长设置 3 组平行。得出一个最佳的反应时长。

1.2.4 终止剂及终止时长的选择

在上述两个选定条件下, 选择两种终止剂, 分别为 50% 的丙酮(丙酮/最终反应液, 体积比, 1:2)^[13,15,20]和氯仿/甲醇(体积比, 2:1)^[14,16-17]混合液。在已加入 5 mL 菌悬液的 10 mL 离心管中, 添加 50% 丙酮和氯仿/甲醇混合液的量分别为 5 mL 和 250 μL; 其相应的空白对照组是分别加入等量体积的生理盐水。设置终止反应时长范围为 0–45 min, 其间隔 5 min, 培养反应到所设置时间节点, 取其上清液进

行荧光强度的测定。设置 3 组平行。最终选择适宜的终止剂, 并确定最佳有效终止时长。

1.3 大气 PM_{2.5} 微生物活性的测定方法

1.3.1 采样点

农村和郊区是生物气溶胶的重要源地, 而我国的灰霾天气污染也早已区域化, 农村与郊区已非灰霾污染的世外桃源, 因而乡村, 尤其是大都市的郊区作为城市的重要组成部分, 其人口密度不亚于普通城市中心。由于郊区本身紧邻农村, 农业生产活动频繁, 大气颗粒物的来源又有别于大都市环境, 有机物质含量更高。但当前有关 PM_{2.5} 健康效应的研究都集中在城市的大气颗粒物暴露环境中, 而鲜有针对农村和郊区大气颗粒物污染暴露效应的研究^[21], 所以我们将采样点设在了北京郊区的怀柔进行观测研究。大气 PM_{2.5} 样品采集点位于北京市怀柔区中国科学院大学雁栖湖校区教学楼楼顶(40°24'28"N, 116°40'27"E, 距离地面高度约 10 m), 地处北京市中心东北方约 61 km, 属于温带季风气候, 年平均降水 600 mm。采样仪距楼顶地面约 1.6 m。采样时间为 2016 年 11 月份至 2017 年 7 月期间(本文中多数样品的采样时段)在采样日从早晨 8 点开始采集 PM_{2.5} 样品。

1.3.2 样品采集

有研究测得在静息状态下我国飞行员通气量平均值为(9.58±1.70) L/min^[22], 为解决大流量颗粒物采样仪在采集过程中对附着其上的生物气溶胶活性严重破坏的问题, 同时避免其过大偏离人体实际的呼吸通量, 本研究采用流量为 5 L/min 的 OMNI FTTM 迷你型环境大气采样器。样品采集使用的是 Whatman 公司生产的孔径 0.22 μm、直径 47 mm 的石英膜。在采集样品之前, 将每张石英膜包裹铝箔纸于马弗炉中, 500 °C 煅烧 5 h 进行消毒灭菌处理。文中讨论涉及的平行样品均采集于同一天。在采集 PM_{2.5} 样品之前, 用无菌去离子水对所有实验器材各个膜接触部位进行充分清洗, 然后用 75% 酒精擦拭消毒, 再用医用无纺布进行包裹, 使用前再打开, 组装好采样器进行样品采集。

1.3.3 样品的前处理

将采集的 PM_{2.5} 样品用原有铝箔纸包裹, 迅速运送至实验室并立即在超净台中取出样品剪碎于一次性培养皿中, 置于盛有 5 mL 无菌生理盐水 (0.85%–0.90% NaCl 溶液) 的离心管中, 30 °C、150 r/min 洗脱 30 min。

1.3.4 标准曲线的选择与绘制

利用活性微生物可与 FDA 发生水解反应产生终产物荧光素, 该荧光素与荧光素钠所释放出的荧光物质相同。荧光素钠的浓度与其荧光强度具有较好的相关性, 且低浓度的荧光素钠溶液也可以表现出较高的荧光强度。选择荧光素钠标准曲线对样品中微生物活性的测定结果进行标定, 得到单位体积溶液中 PM_{2.5} 颗粒物中微生物活性水平, 从而计算微生物活性。最终根据大气颗粒物 PM_{2.5} 样品相对荧光强度的大小选择适合浓度范围的荧光素钠溶液。

1.3.5 微生物活性的计算方法

每个样品在去除各自对照样品的荧光强度值后, 所得到的荧光强度值可根据荧光素钠标准曲线换算为单位体积测定溶液中荧光素钠浓度。

大气颗粒物 PM_{2.5} 中微生物活性水平的计算公式为:

$$M_{a(\text{空气})} = 1\,000 \times V \times M_{a(\text{溶液})} / Q \times t^{[23]}$$

式中, $M_{a(\text{空气})}$ 为单位体积空气中生物气溶胶微生物活性水平 (ng/m³); $M_{a(\text{溶液})}$ 为单位体积溶液中生物气溶胶微生物活性水平 (ng/mL); V 为样品溶液体积 (mL); Q 为采样流量 (L/min); t 为采样时间 (min)^[23]。

1.3.6 大气 PM_{2.5} 微生物活性的测定方法

根据预实验中菌悬液与 FDA 反应强度所确定的实验条件和测定方法, 结合实际大气颗粒物 PM_{2.5} 中微生物活性必定低于经分离纯培养制备的菌悬液中的微生物活性; 并且考虑到 PM_{2.5} 中具有活性的微生物浓度也不确定等因素, 所以需要根据实际采样样品继续优化实验条件, 最终确定大气颗粒物 PM_{2.5} 中微生物活性的测定方法。包括

标准曲线、采样仪器的选择、采样时间、底物 (FDA) 浓度、反应时长、终止剂和有效终止时长的优化选择。

2 结果与讨论

2.1 初始条件的选择

2.1.1 底物 (FDA) 浓度的选择

通过菌液模拟实验, 测定 5 种底物 (FDA) 浓度下相对荧光强度大小, 结果如图 1 所示。由图 1 可见, 底物浓度从 50 μg/mL 至 200 μg/mL, 相对荧光强度一直增加, 而浓度在 200 μg/mL 到 250 μg/mL 时, 菌悬液的相对荧光强度开始降低。所以, 通过本实验初步选择底物 (FDA) 浓度为 200 μg/mL。

2.1.2 最佳反应时长的选择

测定了在 7 个不同反应时长下菌液与底物 (FDA) 反应后的相对荧光强度, 实验结果如图 2 所示。结果显示在反应进行的前 120 min 内, 菌悬液的相对荧光强度基本呈上升趋势; 在反应进行到 120 min 后, 其强度有所下降或上升速率已不太明显。

土壤中 FDA 测试微生物活性的研究表明^[13-15,24], 在底物量充足的前提下, 反应时长与 FDA 水解生成的荧光素往往是正相关的。从结果中可以看出, 在反应从 30–120 min 时, 相对荧光强度一直在升高,

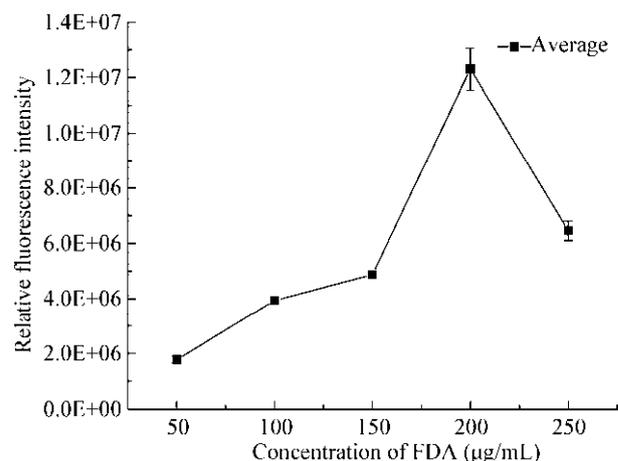
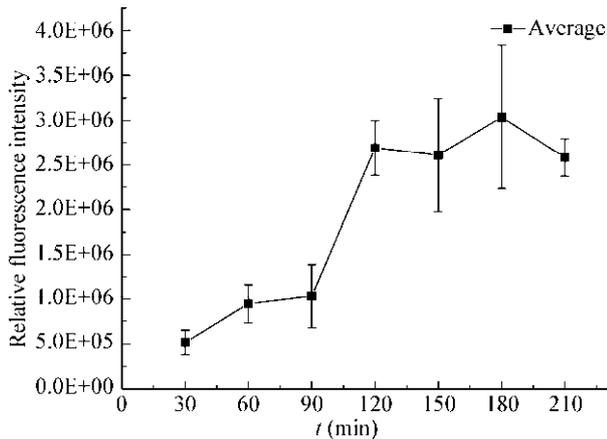


图 1 FDA 浓度对荧光强度的影响 ($n=9$)

Figure 1 Influence of concentration of FDA on the fluorescent intensity ($n=9$)

图 2 反应时长对荧光强度的影响($n=15$)Figure 2 Influence of reaction time on the fluorescence intensity ($n=15$)

并且在 90–120 min 时间段内, 反应速率最快, 说明在此阶段底物量充足, 底物还未成为限制因素; 而在 120–150 min 时, 相对荧光强度有所下降。为保障反应充分进行, 同时不受底物量的影响, 选择反应时长为 120 min。

2.1.3 终止剂及终止时长的选择

实验选用两种不同终止剂对反应进行抑制, 实验结果如表 1 和图 3 所示。在加入不同终止剂后测得的荧光强度值存在很大的差异, 造成这种情况的原因可能是终止剂本身的影响以及所加入剂量的差异(5 mL 50%的丙酮和 250 μ L 氯仿/甲醇混合液)所造成的不同稀释效应。Adam 等^[14]认为在加入等

量的丙酮和氯仿/甲醇混合液时, 丙酮作为终止剂会造成 37% 的吸光度的损失, 从而降低了测试的灵敏度。为此, 我们专门进行了两种终止剂本身对荧光强度影响的对比实验, 通过消除不同剂量的稀释效应, 矫正了丙酮的荧光强度值。氯仿/甲醇样品反应后的终体积是 5.25 mL, 丙酮样品反应后的终体积是 10 mL。由于终体积的不同, 为抵消由于终体积的不同而造成的对丙酮样品的稀释效应, 我们用 1.9 的转化系数来矫正终体积为 10 mL 丙酮样品的荧光强度, 结果如表 1 所示。

结果显示, 对比氯仿/甲醇混合液, 丙酮作为终止剂时, 其自身并没有造成荧光强度的损失。因 Adam 等^[14]使用分光光度计, 其检测线较低, 不能测定丙酮作为终止剂时样品的吸光度; 而本研究所用的多功能酶标仪测定荧光强度其灵敏度远远高于前者, 通过矫正发现本实验中氯仿/甲醇和丙酮这两种终止剂本身对荧光强度的影响差异并不显著。

从图 3 中可以看出, 在加入氯仿/甲醇(2:1, 体积比)后, 随着时间的增加, 相对荧光强度呈持续上升趋势, 表明氯仿/甲醇(2:1, 体积比)未出现有效的终止水解反应; 而在加入 50% 的丙酮后, 经过一段时间的终止水解反应, 随着相对荧光强度增强, 在反应 25 min 后相对荧光强度开始趋于相对稳定的状态。这是由于在终止反应后没有新的荧光素产

表 1 对比加入不同终止剂的样品溶液荧光强度

Table 1 Contrast the fluorescent intensity of sample after added in different solution

Same sample	Chloroform/Methanol (2:1, V/V)	Acetone (50%, V/V)		Significance ^a
		Test value	After correction	
1	2 099 366	1 383 610	2 635 447	0.094
2	2 188 618	1 143 790	2 178 647	
3	2 315 898	1 608 894	3 064 560	
4	2 476 517	1 487 050	2 832 475	
Average	2 270 100	1 405 836	2 677 782	
CV (%)	7.2		14	
Final volume (mL)	5.25	10.00	5.25 ^b	

Note: ^a: Significance analysis between fluorescence intensity of adding Chloroform/Methanol and correcting fluorescence intensity with acetone, the significant level is 0.05; ^b: The conversion factor is 1.9.

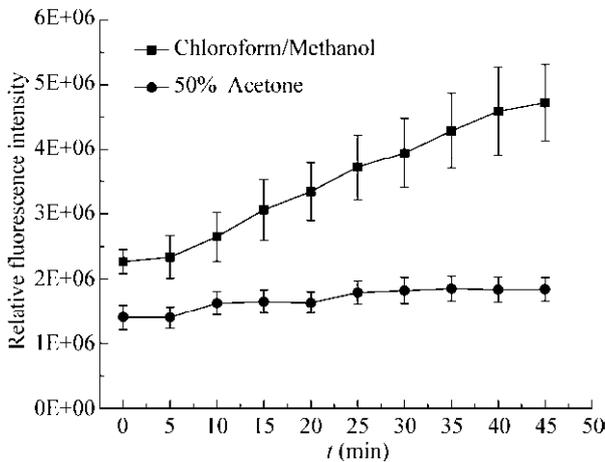


图3 终止剂对反应的终止效应($n=12$)

Figure 3 Effect of relative fluorescence intensity in terminating reaction after added in different terminator ($n=12$)

生, 而终止反应前产生的荧光素还具有一定荧光强度, 因此仍然能检测到荧光强度, 且能够保持相对稳定。所以, 我们选择 50% 的丙酮作为终止剂, 这与王佳佳等^[15]的研究结论一致。为保证反应充分进行, 选择有效终止时长为 30 min。

2.2 大气 PM_{2.5} 微生物活性的测定结果

2.2.1 标准曲线的绘制

为得到采集样品的单位体积溶液中 PM_{2.5} 颗粒物的微生物活性水平, 从而计算微生物活性, 实验选择了荧光素钠标准曲线对样品中微生物活性的测定结果进行标定, 制作标准曲线如下所述。

用无菌生理盐水溶液分别配制浓度为 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 ng/mL 的荧光素标准溶液, 设定激发光波长为 490 nm, 发射光波长为 530 nm, 根据各浓度的荧光强度值, 绘制出标准曲线如图 4 所示。在 0–10 ng/mL 浓度范围内, 荧光素钠的浓度(C)与相对荧光强度(F)呈良好的线性关系(图 4)。线性回归方程为: $F=7.617\ 2E6\times C-250.573\ 6$, $R^2=0.999\ 87$ 。

2.2.2 采样时间的选择

Qi 等在使用流量为 28.3 L/min 的六级 Andersen

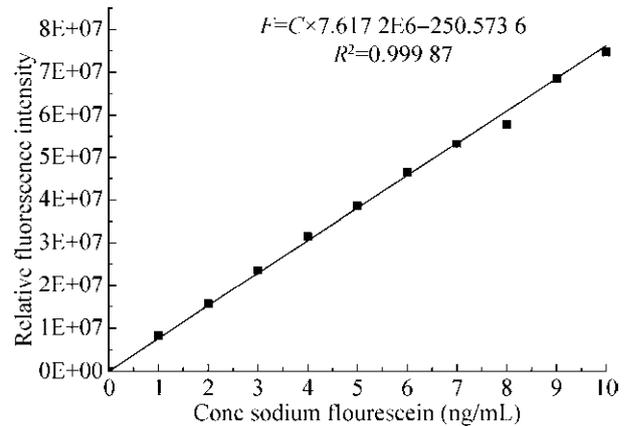


图4 荧光素钠标准曲线

Figure 4 The standard curve of sodium fluorescein

采样器采集大气气溶胶测定微生物活性时, 其最佳采样时间为 40 min^[19]。我们在前期预实验依据此采样体积设置不同采样时间, 结果表明, 采样时间低于 30 min 或超过 1 h 时, 都不能较好地测定大气 PM_{2.5} 颗粒物中微生物活性。

本实验设置 5 个不同的采样时长, 分别为 35、40、45、50、55 min, 在 4 月份连续多日进行样品采集测试, 选择其中 6 d 天气状况相似的样品, 将同一天不同采样时长的微生物活性测试结果进行对比研究, 结果如图 5 所示。结果表明采样时间在 35、40 和 45 min 时的微生物活性普遍高于 50 min 和 55 min。这可能是由于采样时间为 50 min 和 55 min 时, 采样时间过长并造成采样过程中碰撞压力、脱水现象增大, 使得微生物活性降低^[25-26]。在采样时间为 35、40 和 45 min 时, 微生物活性相对较高, 其均值差异不显著。可能是 PM_{2.5} 颗粒物中附着的微生物浓度本身较低, 但各个采样日不同采样时间, 由于边界层湍流活动的影响, 大气环境在不同的微气象条件不同的时段内都会产生变化, 因此空气中 PM_{2.5} 颗粒物不断变化, 其中微生物活性也随之变动。在考虑微生物活性大小的基础上, 尽可能多地采集 PM_{2.5} 颗粒物的原则下, 最终选取采样时间为 40 min。

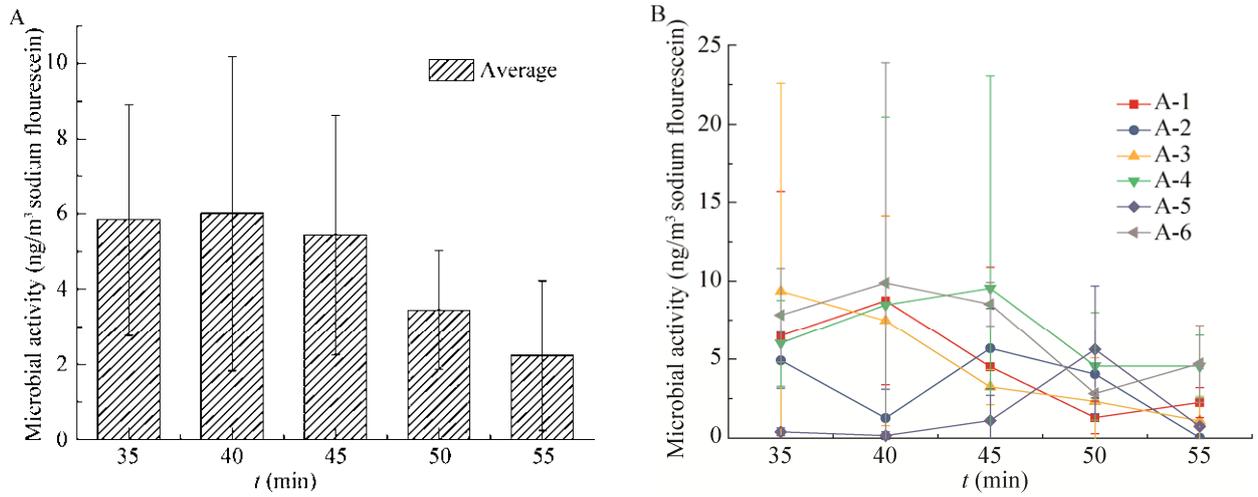


图 5 采样时间对微生物活性的影响

Figure 5 Influence of microbial activity with different sampling durations

注: A: 微生物活性均值; B: 各样品的微生物活性. A-1 为月份-不同采样日样品编号; A 为四月; 显著水平为 0.05.

Note: A: Average of microbial activity; B: Microbial activity of each sample. A-1 represents sample serial number; A mean April; The significant level is 0.05.

2.2.3 最佳反应时长的选择

在 2.1 实验方法探索阶段, 利用菌悬液选定最佳反应时长为 120 min。因此在实测空气 PM_{2.5} 颗粒物样品的反应时长范围设置为 1.0–3.0 h, 每间隔 0.5 h 检测一次微生物活性, 得到结果如图 6A 所示。结果显示微生物活性首次出现降低的时间段最晚

出现在 2.5–3.0 h 之间。因此再次选择 6 d 天气状况相似的 PM_{2.5} 颗粒物样品, 调整反应时长为 0–2.5 h, 每间隔 0.5 h 检测一次微生物活性, 得到结果如图 6B 所示。结果表明, 在 0–1.5 h 的反应时长内, 微生物活性均持续上升; 反应时长超过 1.5 h 时, 测得的部分样品微生物活性出现下降的情况; 且在反应

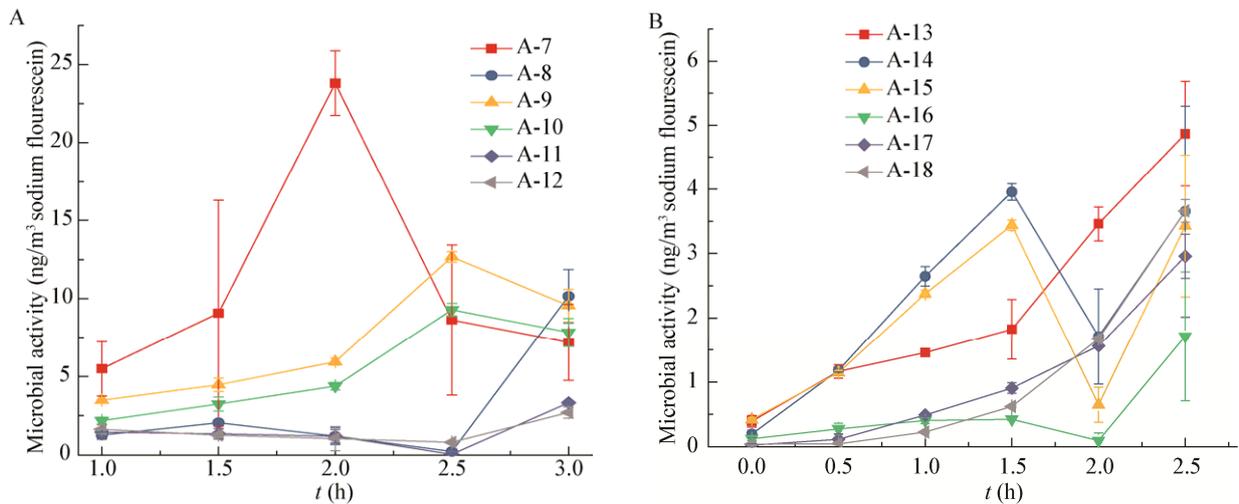


图 6 反应时长对微生物活性的影响

Figure 6 Influence of reaction time on the microbial activity

Note: A: 1.0–3.0 h; B: 0–2.5 h.

时长超过 1.5 h 后, 某些样品存在微生物活性降低后又突然升高的情况, 可能是由于反应时间过长, 实验中洗脱下的 $\text{PM}_{2.5}$ 颗粒物中的无机物等污染物分解, 改变了培养液的酸碱度, 对 FDA 水解产生了影响。综合考虑各样品的水解反应能够充分进行, 且不受其他因素影响的情况, 最终选取反应时长为 1.5 h。

2.2.4 底物(FDA)浓度的选择

在 2.1 实验阶段, 选定菌悬液最佳底物(FDA)浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。因本实验中每个样品可以测定 4 个不同的浓度, 所以设置底物(FDA)浓度为 0–600 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 浓度间隔为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 以 A 表示四月, M 表示五月, 数字表示该月份样品采集顺序, 结果如图 7A 所示。

在酶浓度不变的情况下, 底物浓度为 0–200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 微生物活性急剧增加; 底物浓度大于 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 微生物活性随浓度的增加趋于稳定, 或呈现下降的情况; 而在 400–600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度范围内, 部分样品的微生物活性呈现了增加的情况, 这可能是因为底物(FDA)浓度过高时, 发生了自发水解或是其他的一些原因, 有待进一步探

索。为进一步明确底物(FDA)浓度, 将浓度范围设置为 0–150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 50–200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 浓度间隔均为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 所得结果见图 7B。从图 7B 中可以看出, 随着底物(FDA)浓度的增大, 微生物活性整体呈现逐渐上升的趋势, 并在底物(FDA)浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 微生物活性最高。综合这两组实验结果, 最终选取 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 为最佳底物浓度。

2.2.5 终止时长的选择

在实验阶段, 已确定菌悬液有效终止时长为 30 min。研究表明因大气环境较为苛刻, 不利于大气颗粒物 $\text{PM}_{2.5}$ 中微生物繁殖生长, 且微生物多处于休眠状态^[27-28], 因此大气颗粒物 $\text{PM}_{2.5}$ 中微生物活性普遍低于纯化培养的菌种。在实测实验中设置终止时长为 5–30 min, 时间间隔为 5 min, 以 M 表示五月样品, J 表示六月样品, 所得结果如图 8 所示。在加入终止剂(丙酮)15 min 内, 各样品的微生物活性呈上升或趋于稳定的状态; 在加入终止剂 15 min 后, 样品的微生物活性出现降低的情况。为保证反应的充分进行且能保持微生物活性稳定的情况下, 最终选择 15 min 作为有效终止时长。

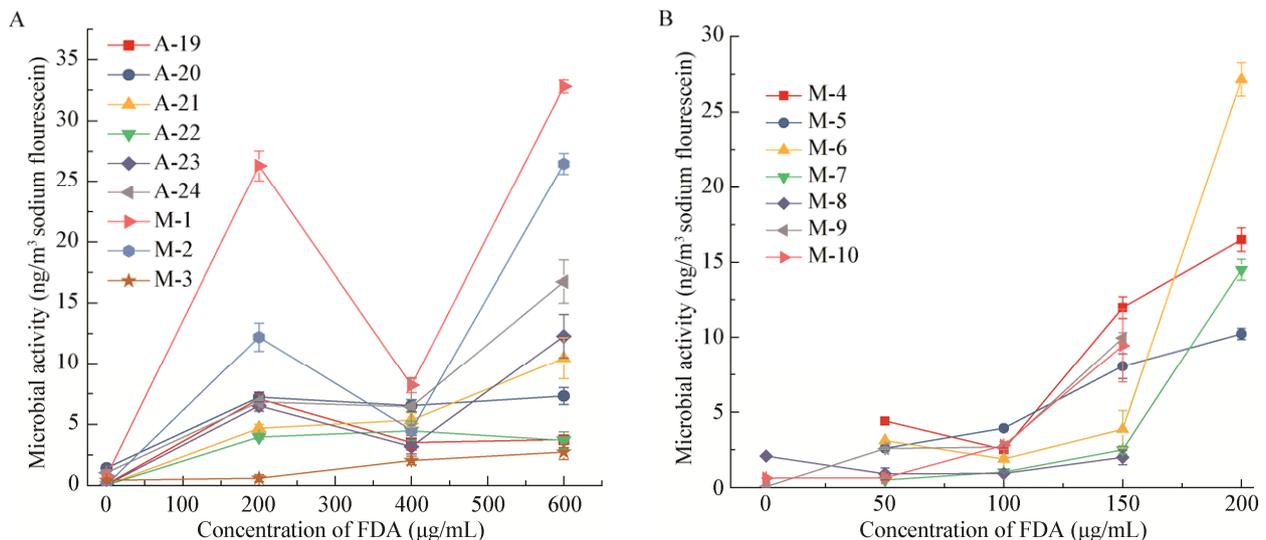


图 7 底物(FDA)浓度对微生物活性的影响

Figure 7 Influence of concentration of FDA on the microbial activity

Note: A: 0–600 $\mu\text{g}/\text{mL}$; B: 0–200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

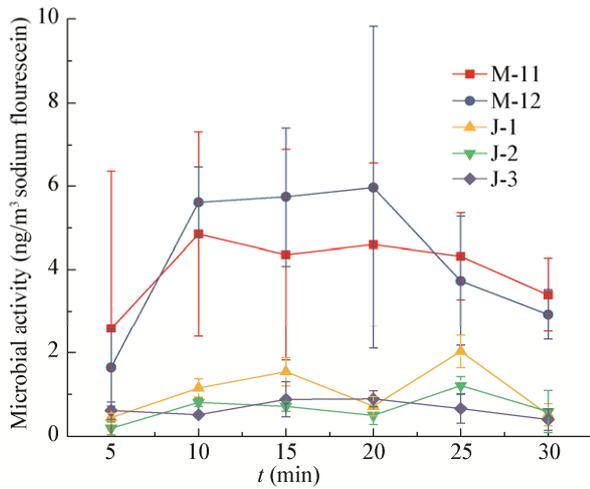


图8 终止剂对反应的终止效应

Figure 8 Effect of relative fluorescence intensity in termination reaction after added in different solution

2.3 大气 PM_{2.5} 微生物活性的测定方法

由上述各实验步骤, 确定了测定 PM_{2.5} 微生物活性水平的关键参数, 具体步骤如图 9 所示。

2.4 采样方法的应用

我们采集了 2017 年 7 月 9–14 日、16–20 日的 PM_{2.5} 样品, 并运用上述实验方法测定了室内外空气样品 PM_{2.5} 颗粒物中微生物的活性水平, 微生物活性变化如图 10 所示。

采样期间室外微生物活性水平范围为 0.10–2.16 ng/m³, 平均微生物活性为 0.87 ng/m³; 室内微生物活性水平范围为 0.15–2.93 ng/m³, 平均微生物活性为 1.11 ng/m³。与土壤样品相比, 土壤微生物浓度远远高于大气颗粒物 PM_{2.5} 中, 王佳佳等^[15]指出土壤样品平均微生物活性为 13.31 μg/g, 但是我们利用此方法仍测定了 PM_{2.5} 颗粒物中微生物的活性, 说明此方法经过优化后灵敏度得到了极大的提高。Qi 等^[19]测得海滨城市 5 月份大气环境中微生物平均活性水平在 44.3 ng/m³, 其较大粒径范围颗粒物的微生物活性约是 PM_{2.5} 的 50 倍, 此结果也从侧面反映出本文中确立的方法是切实可行的。

采样期间, 室外平均微生物活性为 0.87 ng/m³, 而室内为 1.11 ng/m³; 平均微生物活性室内略高于

室外。造成这一结果的原因可能是: (1) 室内环境相对封闭, 空气流动性较差, 受气象因素影响较小; (2) 室外采样点人员稀少, 而室内常有人员活动, 人员的活动会释放微生物, 可能增加室内微生物浓度, 进而对其活性的升高产生了一定的贡献; (3) 采

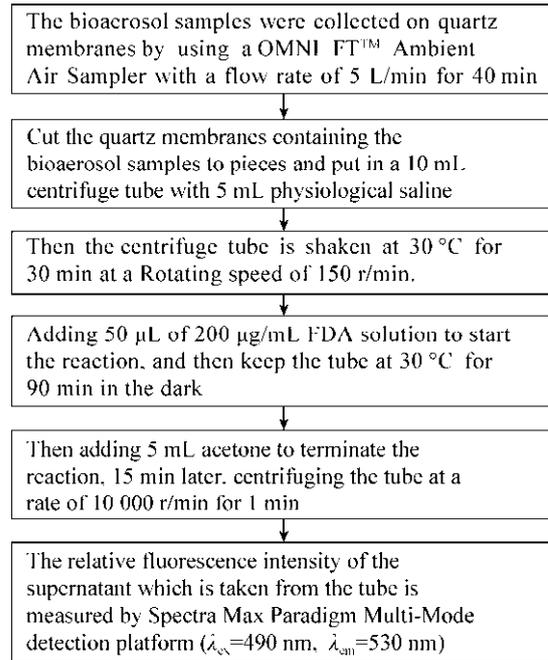
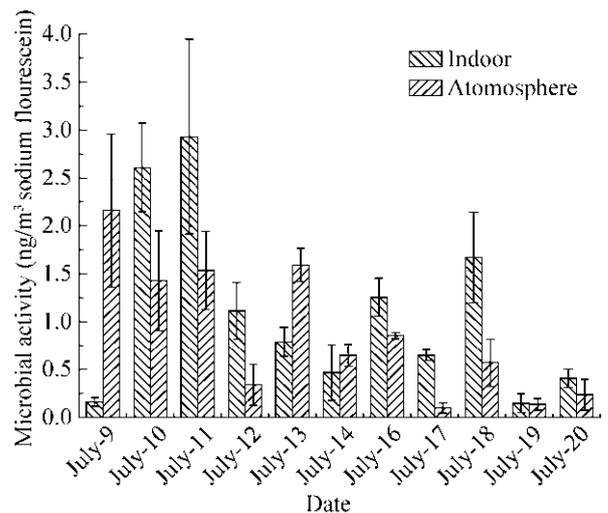
图9 大气 PM_{2.5} 微生物活性的测定过程Figure 9 Process of measured the microbiological activity of atmospheric PM_{2.5}图10 北京郊区大气 PM_{2.5} 微生物活性变化Figure 10 Variation of microbial activity of atmospheric PM_{2.5} in Beijing suburbs

表 2 微生物活性的显著性检验

Table 2 Significance testing of microbial activity

	Mean value (ng/m ³)	Std. dev.	The standard error of mean value	<i>t</i>	df	Significance ^a
Indoor	1.110	0.946	0.285	3.891	10	0.003*
Atmosphere	0.873	0.699	0.211	4.145	10	0.002*
Indoor-Atmosphere ^b	0.213	0.737	0.222	0.096	10	0.926

Note: ^a: The significant level is 0.05; ^b: Paired sample *t* test.

样点周围植被差异的影响, 室外采样点位于教学楼的楼顶, 地理位置较高且楼顶空旷, 附近并无植被, 而室内采样点位于办公室内, 室内绿植等盆栽较多, 对微生物浓度与活性都可能产生一定的贡献。

对 11 d 的微生物活性进行逐天对比分析, 并对微生物活性进行显著性分析, 如表 2 所示。结果发现: 在空气质量条件不同的情况下, 不同天的室内或室外微生物活性差异显著, 同一天的室内外微生物活性差异不显著, 说明室外空气质量可对室内环境造成同步的影响, 且不同天气情况对微生物活性影响存在较大差异; 在 AQI 指数大体相同的 13 日和 18 日, 室内外微生物活性相差较大, 可能是由于 18 日凌晨有降雨过程, 降雨量积累达到了 4.2 mm, 空气中的颗粒物被雨水冲刷, 大气 PM_{2.5} 浓度降低导致其活性降低, 孟祥斌等^[23]的研究也得出了较为一致的结论; 在轻中度污染天的 12、19 和 20 日, 微生物活性都相对较低, 可能是由于污染物浓度的增加。在空气质量较好的 10、11 日, 室内微生物活性较高, 可能与人员活动有关系, 还需进一步研究。

3 结论

本文建立了大气颗粒物 PM_{2.5} 中微生物活性测定的新方法。该法以生理盐水为洗脱液, 选取 50% 的丙酮作为终止剂, 采用荧光分光光度法并使用高灵敏度的多功能酶标仪测定样品荧光强度, 此方法具有操作简便, 灵敏度、精密度、准确度高, 样品测定用量少, 可同时测定多个样品等优点; 并且此方法可有效测定大气环境颗粒物 PM_{2.5} 样品中微生物活性水平, 还可测定室内和室外的微生物活性变化情况, 对进一步有效全面评价细颗粒物 PM_{2.5} 的生物毒性及其作用机制具有重要的科学意义。

REFERENCES

- [1] Qian XL, Kan HD, Song WM, et al. Meta-analysis of association between air fine particulate matter(PM_{2.5}) and daily mortality[A]//Section V National Environmental and Occupational Medicine Graduate Seminar[C]. Nanjing, 2006: 214-220 (in Chinese)
钱孝琳, 阚海东, 宋伟民, 等. 大气细颗粒物(PM_{2.5})污染与居民每日死亡关系的 meta 分析[A]//第五届全国环境与职业医学研究生学术研讨会[C]. 南京, 2006: 214-220
- [2] Duffin R, Mills NL, Donaldson K. Nanoparticles-A thoracic toxicology perspective[J]. *Yonsei Medical Journal*, 2007, 48(4): 561-572
- [3] Du PR, Du R, Ren WS. Research progress on toxicological characteristics and mechanisms of urban atmospheric particulate matters[J]. *China Environmental Science*, 2016, 36(9): 2815-2827 (in Chinese)
杜鹏瑞, 杜睿, 任伟珊. 城市大气颗粒物毒性效应及机制的研究进展[J]. *中国环境科学*, 2016, 36(9): 2815-2827
- [4] Cao C, Jiang WJ, Wang BY, et al. Inhalable microorganisms in Beijing's PM_{2.5} and PM₁₀ pollutants during a severe smog event[J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(3): 1499-1507
- [5] Du PR, Du R, Ren WS, et al. Seasonal variation characteristic of inhalable microbial communities in PM_{2.5} in Beijing city, China[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 610-611: 308-315
- [6] Gao M, Qiu TL, Qin YC, et al. Sources and pollution characteristics of antibiotic resistance genes and conditional pathogenic bacteria in concentrated poultry feeding operations[J]. *Environmental Science*, 2017, 38(2): 510-516 (in Chinese)
高敏, 仇天雷, 秦玉成, 等. 养鸡场空气中抗性基因和条件致病菌污染特征[J]. *环境科学*, 2017, 38(2): 510-516
- [7] Zhou XQ, Chen CR, Wang YF, et al. Soil extractable carbon and nitrogen, microbial biomass and microbial metabolic activity in response to warming and increased precipitation in a semiarid Inner Mongolian grassland[J]. *Geoderma*, 2013, 206: 24-31
- [8] Rousk J, Bååth E. Growth of saprotrophic fungi and bacteria in soil[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2011, 78(1): 17-30
- [9] Blazewicz SJ, Barnard RL, Daly RA, et al. Evaluating rRNA as an indicator of microbial activity in environmental communities: limitations and uses[J]. *The ISME Journal*, 2013, 7(11): 2061-2068
- [10] Swisher R, Carroll GC. Fluorescein diacetate hydrolysis as an estimator of microbial biomass on coniferous needle surfaces[J]. *Microbial Ecology*, 1980, 6(3): 217-226

- [11] Duchaufour P, Souchier B. pH and lime requirement[J]. Comptes Rendus Des Seances De L'Academie D'agriculture De France, 1980: 391-399
- [12] Kramer DN, Guilbault GG. A substrate for the fluorometric determination of lipase activity[J]. Analytical Chemistry, 1963, 35(4): 588-589
- [13] Schnürer J, Rosswall T. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1982, 43(6): 1256-1261
- [14] Adam G, Duncan H. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2001, 33(7/8): 943-951
- [15] Wang JJ, Zhou H, Zhang J, et al. Fluorescence determination of microbial activity in soil sample[J]. Environmental Chemistry, 2012, 31(10): 1637-1644 (in Chinese)
王佳佳, 周桦, 张进, 等. 土壤样品中微生物活性的荧光分析方法[J]. 环境化学, 2012, 31(10): 1637-1644
- [16] Muscolo A, Settineri G, Papalia T, et al. Anaerobic co-digestion of recalcitrant agricultural wastes: Characterizing of biochemical parameters of digestate and its impacts on soil ecosystem[J]. Science of the Total Environment, 2017, 586: 746-752
- [17] Li R, Tao R, Ling N, et al. Chemical, organic and bio-fertilizer management practices effect on soil physicochemical property and antagonistic bacteria abundance of a cotton field: Implications for soil biological quality[J]. Soil & Tillage Research, 2017, 167: 30-38
- [18] Ferrario M, Guerrero S. Impact of a combined processing technology involving ultrasound and pulsed light on structural and physiological changes of *Saccharomyces cerevisiae* KE 162 in apple juice[J]. Food Microbiology, 2017, 65: 83-94
- [19] Qi JH, Zhong X, Shao Q, et al. Microbial activity levels in atmospheric bioaerosols in Qingdao[J]. Aerobiologia, 2015, 31(3): 353-365
- [20] Green VS, Stott DE, Diack M. Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2006, 38(4): 693-701
- [21] Loftus C, Yost M, Sampson P, et al. Regional PM_{2.5} and asthma morbidity in an agricultural community: a panel study[J]. Environmental Research, 2015, 136: 505-512
- [22] Chen WY, Ji Y, Chen MY, et al. Ventilatory volumes and respiratory flow rate in healthy pilots[J]. Medical Journal of Chinese People's Liberation Army, 1983(6): 408-410 (in Chinese)
陈婉莹, 季扬, 陈孟英, 等. 健康飞行员肺通气量和呼吸流速峰值的测定[J]. 解放军医学杂志, 1983(6): 408-410
- [23] Meng XB, Li MZ, Li HT, et al. Microbial activity in bioaerosols in winter at the coastal region of Qingdao[J]. Environmental Science, 2016, 37(11): 4147-4155 (in Chinese)
孟祥斌, 李孟哲, 李鸿涛, 等. 青岛近海冬季大气生物气溶胶中微生物活性研究[J]. 环境科学, 2016, 37(11): 4147-4155
- [24] Zablotowicz RM, Locke MA, Smeda RL. Degradation of 2, 4-D and fluometuron in cover crop residues[J]. Chemosphere, 1998, 37(1): 87-101
- [25] Chen YJ. Sample and detect airborne microorganisms by composite membrane filtration method[J]. Environmental Monitoring in China, 2005, 21(4): 14-17
- [26] Xu ZQ, Yao MS. Effects of single-walled carbon nanotube filter on culturability and diversity of environmental bioaerosols[J]. Journal of Aerosol Science, 2011, 42(6): 387-396
- [27] Amato P, Parazols M, Sancelme M, et al. Microorganisms isolated from the water phase of tropospheric clouds at the Puy de Dôme: major groups and growth abilities at low temperatures[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2007, 59(2): 242-254
- [28] Hameed AAA, Khoder MI, Yuosra S, et al. Diurnal distribution of airborne bacteria and fungi in the atmosphere of Helwan area, Egypt[J]. Science of the Total Environment, 2009, 407(24): 6217-6222