

基因强化在难降解污染物生物处理和修复中的应用

刘 春^{1,2*} 黄 霞¹ 杨景亮²

(1. 清华大学环境科学与工程系环境模拟与污染控制国家联合重点实验室 北京 100084)

(2. 河北科技大学环境科学与工程学院 石家庄 050018)

摘 要: 基因强化通过强化降解基因在土著菌群中的水平迁移和传播, 促进土著降解菌群的进化, 改善基因工程菌生物强化作用的稳定性, 提高难降解污染物的生物去除效果。介绍了基因强化的原理-微生物群落内水平基因迁移, 讨论了基因载体、细胞接触条件和环境条件等影响基因强化的因素, 综述了目前基因强化在土壤生物修复和废水生物处理中的应用现状, 并提出了基因强化中存在的问题。

关键词: 基因强化, 基因工程菌, 生物强化处理, 难降解污染物

Application of Gene Bioaugmentation in Treatment of Recalcitrant Chemicals

LIU Chun^{1,2*} HUANG Xia¹ YANG Jing-Liang²

(1. ESPC State Key Joint Laboratory, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084)

(2. College of Environmental Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018)

Abstract: One of the new approaches for bioaugmentation treatment of recalcitrant chemicals is gene bioaugmentation, which is helpful to improve the bioaugmentation stability when genetically engineered microorganisms are used. The mechanism of gene bioaugmentation, viz. horizontal gene transfer within microbial community, is introduced. The influence factors of gene bioaugmentation: gene vector, cell touch conditions and environment conditions, are discussed. The applications in soil bioremediation and wastewater treatment of gene bioaugmentation are also summarized. The limitation of gene bioaugmentation is also mentioned.

Keywords: Gene bioaugmentation, Genetically engineered microorganisms, Bioaugmentation treatment, Recalcitrant chemicals

利用基因工程菌进行生物强化是实现难降解污染物高效生物处理的可行和有效途径, 而处理效果不稳定是影响基因工程菌生物强化应用的重要原

因。为了解决基因工程菌生物强化的稳定性问题, 研究者尝试了一些新技术和新方法^[1,2], 其中基因强化逐渐受到研究者的关注和重视。

* 通讯作者: Tel: 010-62772324; ✉: E-mail: liuchun02@mails.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2007-05-23; 接受日期: 2007-08-15

1 基因强化的机理

在自然条件下, 遗传物质, 特别是可移动的遗传因子在微生物群落菌株之间迁移、交换、传播是相当普遍的现象, 这种水平基因迁移(horizontal gene transfer, HGT)在微生物群落的进化和对环境的适应中发挥着重要作用, 具有重要的生态意义^[3-6]。同样, 难降解污染物的降解基因也会通过水平基因迁移在微生物群落中传播, 这种传播在种内、种间和属内都可以发生, 甚至有研究从不同地区、不同种属的降解菌株中分离到同一种污染物的降解基因, 并且具有很高的同源性, 说明降解基因迁移的普遍性^[7-9]。

一般认为, 基因水平迁移主要是通过 3 个过程实现的: 转化、接合和转导。转化是裸露 DNA 与受体细胞的相互作用, 而接合和转导需要供体细胞和受体细胞进行接触。此外, 在供体细胞和受体细胞之间, 基因(主要是质粒)的迁移还可能受到第三者细胞的诱动作用而实现。在复杂的环境体系中, 这些基因水平迁移过程都可能存在。

降解基因在微生物种群之间的迁移传播, 对微生物适应污染环境并获得污染物降解能力具有重要作用^[10], 研究者也开始逐渐认识降解基因水平迁移对野生降解菌群进化的关键作用^[11]。

自然条件下降解基因水平迁移频率较低, 过程缓慢, 如果能够强化降解基因在微生物种群间的水平迁移, 加速污染环境中或生物处理系统中土著降解菌群的进化和形成, 对于强化难降解污染物的生物修复和生物处理都是非常有利的。基于这种设想, 基因强化将降解基因置于质粒等水平迁移能力强的遗传因子上, 构建基因工程菌, 通过接种基因工程菌, 将降解基因引入污染环境或生物处理系统, 期望降解基因能够通过遗传因子的水平迁移进入土著微生物, 形成土著降解种群。这样, 即使基因工程菌的降解作用不稳定, 也可以实现对污染物稳定的处理效果。

事实上, 在基因工程菌生物强化过程中, 研究者很早就观察到降解基因向土著微生物的水平迁移。Meclure等^[12]在活性污泥反应器中投加降解 3-氯苯甲酸的工程菌之后, 工程菌中的重组质粒pD10可以迁移到活性污泥土著菌株中, 形成土著降解菌群, 其降解 3-氯苯甲酸的效率高于工程菌。考虑到重组质粒pD10是一个没有自迁移能力的质粒, 这个

结果表明降解基因水平迁移频率相当可观。Bathe等^[13]将含有苯胺降解质粒的*Pseudomonas putida* pNB2菌株接种到生物膜反应器中, 获得对氯苯胺的降解能力。检测表明, 工程菌密度下降, 而质粒在群落中的丰度却没有降低, 证实质粒水平迁移形成土著细菌结合子。这些研究结果表明, 强化降解基因水平迁移促进土著降解种群的进化和形成是可行的。

2 基因强化的影响因素

在实施基因强化的过程中, 降解基因向土著菌株的水平迁移是关键步骤。影响降解基因水平迁移的因素很多, 主要包括以下一些方面:

2.1 基因载体

基因载体的移动能力对水平迁移的频率影响很大, 具有结合迁移能力的质粒在实现降解基因水平迁移时更具有优势。Frank等^[14]研究了不同性质的三种质粒: pBR328 (tra⁻, mob⁻, oriT⁻, 没有迁移能力)、pCE325(tra⁻, mob⁻, oriT⁺, 不能自主迁移, 但可以通过辅助质粒诱动迁移)和广泛宿主结合性质粒R388, 向活性污泥土著微生物的迁移情况, 结果发现在固定床反应器和SBR中, 没有检测到pCE325的迁移, 而pBR328具有一定的迁移频率; 同时, 在宿主细胞相同的情况下, R388的迁移频率比pBR328高。

2.2 细胞接触条件

接合、转导或者诱动是降解基因水平迁移的主要方式, 因此迁移频率会受到供体细胞和受体细胞接触条件的影响。细胞接触频率越高, 基因水平迁移的频率也越高。细胞密度(特别是供体细胞密度)和接触方式是影响细胞接触频率的两个主要因素。

研究证实, 细胞密度大的地方往往是质粒迁移频率高的地方。Mancini等^[15]研究活性污泥中质粒的迁移过程, 发现在细胞密度最高的二沉池回流污泥和初沉池底部, 杂交接合子的数量最多。Ravatn等^[16]发现, 只有当工程菌密度达到一定水平时, 才能检测到基因传播。

接触方式也会影响接触频率, 比如实验室条件下, 工程菌与土著细菌之间的滤膜杂交, 基因迁移频率比自然条件下一般要高几个数量级^[16]。在生物膜中, 细胞接触频率比悬浮的污泥絮体高, 因此更有利于降解基因水平迁移。Angles等^[17]发现质粒在生物膜中的迁移频率远远高于在液相中的细胞。

Hausner等^[18]发现质粒在受体细菌形成的生物膜中的迁移频率甚至比传统平板杂交方法还要高 1000 倍。Ehlers等^[19]也发现质粒在生物膜反应器中有很高的迁移频率。

2.3 环境条件

影响基因水平迁移的环境条件很多,而且在不同研究中,由于研究条件的差异,环境条件的影响也有所不同。Ehlers等^[19]在生物膜反应器中发现,提高温度,可以大大促进质粒的迁移;如果生物膜表面水力剪切力较大,则不利于质粒迁移;营养物质的增加对质粒迁移频率影响不大。而De Liphay等^[20]则发现植物残体与土壤的界面是基因迁移频率很高的环境,原因是大麦秆的存在和营养物质的丰富。

污染物的存在会形成一定的环境选择压力,是影响降解基因水平迁移的重要环境因素,有利于提高迁移频率。Hohnstock等^[21]在研究萘降解质粒迁移时发现,增加萘浓度可以促进萘降解质粒的迁移,而且在环境原位条件下,只有增加萘浓度和供体细胞密度,才能够检测到质粒迁移。Smets等^[22]在研究重金属抗性质粒迁移时也发现,提高重金属的浓度有利于重金属抗性质粒的迁移。De Liphay等^[20]研究了降解基因在土壤微生物群落中的迁移,发现污染物选择压力的存在,会促进迁移结合子种群的出现。

3 基因强化的应用

研究者希望通过将降解基因引入到土著微生物群落,并且强化降解基因的水平迁移,促进土著降解菌群的出现,实现污染物的生物强化去除^[23]。很多研究证实,这种想法在土壤生物强化修复和废水生物强化处理中,都是可以实现的。

在土壤生物强化修复中,Henschke等^[24]将一个可在广泛宿主中保持和表达的质粒转入过渡菌株,基因可以高效迁移入其它革兰氏阴性菌,在未灭菌的土壤微系统中,可以原位观察到质粒向土著微生物的迁移。Top等^[25]利用 2,4-D 的两个降解质粒实施基因强化,结果发现含有污染物的土壤中,可以检测到比较高的两种质粒迁移结合子的密度,而且促进了污染物在土壤中的降解。

在废水生物强化处理中,也可以通过基因强化获得土著降解菌,改善和提高生物强化的效果。

Goris等^[26]研究了 3-氯苯胺降解质粒 pC1gfp 向不同菌株迁移的情况,发现形成迁移结合子的菌株很多,在活性污泥中迁移结合子主要是 *D. acidovorans*, 大多数的结合子具有脱氨基的作用,也有结合子具有对 3-氯苯胺完全降解能力。Dong等^[27]发现 Ni 抗性质粒可水平迁移入活性污泥土著菌株,使活性污泥获得对 Ni 的抗性,在 0.25 mM Ni 的冲击负荷下,保持了活性污泥系统的稳定。

clc 因子是最近发现的一种携带氯二酚降解基因的可移动遗传因子,大小为 105 kb,通过抗菌素 P4 亚族的整合酶切割,并最终整合入新的目标 DNA。含有 *clc* 因子的基因工程菌引入废水处理系统后, *clc* 因子会在种群细胞间传播。Springael等^[28]在一个处理 3-氯苯甲酸的生物膜反应器中,考察了 *clc* 因子水平迁移的情况。研究发现,接种的工程菌很快被降解 3-氯苯甲酸的土著微生物种群取代, DNA 分析表明,土著降解菌中,出现了一个或多个 *clc* 因子拷贝,证明 *clc* 因子的基因强化促进土著 3-氯苯甲酸降解种群形成。事实上,新的研究已经发现了一系列的类似 *clc* 因子的携带降解基因的具有整合性和结合性的遗传因子(integrative and conjugative elements, ICEs),这些遗传因子的存在和迁移,有利于更多的微生物获得降解能力^[29]。

基因强化还可以直接利用 DNA 的自然转化来实现降解基因向土著微生物的迁移。研究者在生物膜这样的适合自然转化的环境中,利用裸露 DNA 在自然条件下的转化来实现降解基因向土著微生物的迁移,研究表明,不管是纯培养还是混合菌群生物膜,都可以实现 *gfp* 基因(绿色荧光蛋白基因)或者降解基因(阿特拉津脱氯水解酶基因)的转化,转化后的生物膜可以获得稳定的污染物降解能力^[30]。

4 基因强化存在的问题

基因强化存在的问题主要包括两个方面,一个是实施基因强化要求较高,如前所述,降解基因的水平迁移受到很多因素的影响,因此,必须采用合适的基因载体、工程菌株、实施方式、环境条件等,才能保证降解基因比较高的迁移频率,实现基因强化;另一方面,基因强化促进降解基因在土著微生物系统中的传播,加剧了基因工程菌应用的生态风险,基因载体的一些不良基因,比如抗药性基因在微生物系统中的传播,可能会对生态系统和人体健

康带来不利影响, 因此需要对基因强化进行生态风险评估, 目前研究者还很少关注这个问题, 未见相关的研究报道。有研究者尝试采用新的生物处理工艺, 比如膜-生物反应器(membrane bioreactor, MBR)实施基因强化, 力图克服基因强化存在的问题。Ghyoot等^[31]研究发现, MBR中基因强化的效果优于传统活性污泥法, 而且MBR中膜组件孔径与细菌尺寸相当或小于细菌尺寸, 在工作状态下, 膜表面还会附着一层凝胶层, 使膜孔径尺寸大大减小, 在这种状态下, 膜组件对细菌的截留效率非常的高^[32, 33], 可以最大程度上保证基因工程菌和获得降解基因的土著微生物保持在反应器内, 而不流失到自然环境中, 从而将基因强化的生态风险降到 最低。

5 结论和展望

基因强化是利用现代生物技术手段提高难降解污染物生物降解效率的可行途径。从目前的研究现状来看, 基因强化的应用还存在诸如实施条件苛刻、存在潜在生态风险等问题。今后, 基因强化的研究主要应侧重于基因载体、受体菌株的改进和完善、基因强化效率的提高以及基因强化过程、机制、动力学和生态影响等基础问题的深入探讨。基因强化的应用主要应侧重于基因强化形式的丰富和应用工艺的创新。随着基因强化研究的不断深入, 基因强化在难降解污染物生物处理中的应用是能够实现的。

参 考 文 献

- [1] Gentry TJ, Rensing C, Pepper IL. New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2004, **34**: 447–494.
- [2] Thompson IP, Van der Gast CJ, Ciric L, *et al.* Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. *Environmental Microbiology*, 2005, **7** (7): 909–915.
- [3] Davison J. Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid*, 1999, **42**: 73–91.
- [4] Smalla K, Sobecky PA. The prevalence and diversity of mobile genetic elements in bacterial communities of different environmental habitats: insights gained from different methodological approaches. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, **42**: 165–175.
- [5] Van Elsas JD, Bailey MJ. The ecology of transfer of mobile genetic elements. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, **42**: 187–197.
- [6] Rensing C, Newby DT, Pepper IL. The role of selective pressure and selfish DNA in horizontal gene transfer and soil microbial community adaptation. *Soil Biology and Biochemistry*, 2002, **34**: 285–296.
- [7] De Souza ML, Seffernick J, Martinez B, *et al.* The atrazine catabolism genes *atzABC* are widespread and highly conserved. *Journal of Bacteriology*, 1998, **180**: 1951–1954.
- [8] Barberio C, Pagliai L, Cavalieri D, *et al.* Biodiversity and horizontal gene transfer in culturable bacteria isolated from activated sludge enriched in nonylphenol ethoxylates. *Res Microbiol*, 2001, **152**: 105–112.
- [9] Haagenen JAJ, Hansen SK, Johansen T, *et al.* In situ detection of horizontal transfer of mobile genetic elements. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, **42**: 261–268.
- [10] Hill KE, Weightman AJ. Horizontal transfer of dehalogenase genes on IncP1L plasmids during bacterial adaptation to degrade K-halocarboxylic acids. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, **45**: 273–282.
- [11] Top EM, Springael D. The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds. *Current opinion in Biotechnology*, 2003, **14**: 262–269.
- [12] McClure NC, Weightman AJ, Fry JC. Survival of *Pseudomonas putida* UWC1 containing cloned catabolic genes in a model activated sludge unit. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, **55**: 2627–2634.
- [13] Bathe S, Schwarzenbeck N, Hausner M. Plasmid-mediated bioaugmentation of activated sludge bacteria in a sequencing batch moving bed reactor using pNB2. *Letters in Applied Microbiology*, 2005, **41**: 242–247.
- [14] Frank N, SimaoBeaunoir AM, Dollard MA, *et al.* Recombinant plasmid DNA mobilization by activated sludge strains grown in fixed-bed or sequenced-batch reactors. *FEMS Microbiology Ecology*, 1996, **21**(2): 139–148.
- [15] Mancini P, Fertels S, Nave D, *et al.* Mobilization of Plasmid pHSV106 from *Escherichia coli* HB101 in a Laboratory-Scale Waste Treatment Facility. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987, **53** (4): 665–671.
- [16] Ravatn R, Zehnder AJB, Van der Meer JR. Low-frequency horizontal transfer of an element containing the chlorocatechol degradation genes from *Pseudomonas* sp. strain B13 to *Pseudomonas putida* F1 and to indigenous bacteria in laboratory-scale activated-sludge microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64** (6): 2162–

- 2132.
- [17] Angles ML, Marshall KC, Goodman AE. Plasmid transfer between marine bacteria in the aqueous phase and biofilm in reactor microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, **59**(3): 843–850.
- [18] Hausner M, Wuertz S. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, **65**(8): 3710–3713.
- [19] Ehlers LJ, Bouwer EJ. Rp4 plasmid transfer among species of *Pseudomonas* in a biofilm reactor. *Water Science and Technology*, 1999, **39**(7): 163–171.
- [20] De Liphthay JR, Barkay T, Sørensen SJ. Enhanced degradation of phenoxyacetic acid in soil by horizontal transfer of the *tfdA* gene encoding a 2, 4-dichloro- phenoxyacetic acid dioxygenase. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, **35**: 75–84.
- [21] Hohnstock AM, Stuart-Kell KG, Kull EE, *et al.* Naphthalene and donor cell density influence field conjugation of naphthalene catabolism plasmids. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**(7): 3088–3092.
- [22] Smets BF, Morrow JB, Pinedo CA. Plasmid introduction in metal-stressed, subsurface-derived microcosms: plasmid fate and community response. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**(7): 4087–4097.
- [23] Top EM, Springael D, Boon N. Catabolic mobile genetic elements and their potential use in bioaugmentation of polluted soil and waters. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, **42**: 199–208.
- [24] Henschke RB, Schmidt FRJ. Plasmid mobilization from genetically engineered bacteria to members of the indigenous soil microflora in situ. *Current Microbiology*, 1990, **20**(2): 105–110.
- [25] Top EM, Van Daele P, De Saeyer N, *et al.* Enhancement of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) degradation in soil by dissemination of catabolic plasmids. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1998, **73**: 87–94.
- [26] Goris J, Boon N, Lebbe L, *et al.* Diversity of activated sludge bacteria receiving the 3-chloroaniline-degradative plasmid pC1gfp. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, **46**: 221–230.
- [27] Dong QH, Springael D, Schoeters J, *et al.* Horizontal transfer of bacterial heavy metal resistance genes and its applications in activated sludge systems. *Water Science and Technology*, 1998, **37** (4-5): 465–468.
- [28] Springael D, Peys K, Ryngaert A. Community shifts in a seeded 3-chlorobenzoate degrading membrane biofilm reactor: indications for involvement of in situ horizontal transfer of the *clc*-element from inoculum to contaminant bacteria. *Environmental Microbiology*, 2002, **4** (2): 70–80.
- [29] Van der Meer JR, Sentchilo V. Genomic islands and the evolution of catabolic pathway in bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003, **14**: 248–254.
- [30] Perumbakkam S, Hess TF, Crawford RL. A bioremediation approach using natural transformation in pure-culture and mixed-population biofilms. *Biodegradation (in press)*, 2006.
- [31] Ghyoot W, Springael D, Dong Q. Bioaugmentation with the *clc*-element carrying *Pseudomonas putida* BN210 in a membrane separation bioreactor. *Water Science and Technology*, 2000, **41**: 279–286.
- [32] Bailey AD, Hansford BS, Dold PL. The use of cross-flow microfiltration to enhance the performance of an activated sludge reactor. *Water Research*, 1994, **28**(1): 297–301.
- [33] Côté P, Buisson H. Immersed membrane activated sludge for the reuse of municipal wastewater. *Desalination*, 1997, **113**(2-3): 189–196.