

耐辐射奇球菌在放射性环境中的生物修复作用*

周绪斌 邢瑞云 吕 星

(军事医学科学院放射医学研究所 北京 100850)

摘要:放射性废弃物污染治理是一项全球性课题,耐辐射奇球菌具有超强的辐射抗性,在放射性环境中,目前已经有一系列重金属抗性/还原以及有机物降解基因在耐辐射奇球菌中得到成功表达,显示出耐辐射奇球菌在放射性环境中行使生物修复功能的诱人前景,针对目前的进展及存在问题作一综述。

关键词:耐辐射奇球菌,放射性废弃物,生物修复

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 01-0118-05

放射性废弃物污染严重危害人类的健康,治理这些危险性污染已成为一项全球性课题。冷战时期的美国,46,000件核武器生产过程中产生的放射性废弃物被直接丢弃于环境中,这些有机和无机污染物包括放射性核素、重金属、酸/碱以及有机溶剂。美国掩埋的 $3 \times 10^6 \text{ m}^3$ 放射性废弃物估计造成 $7 \times 10^7 \text{ m}^3$ 地表和浅层土壤以及 $3 \times 10^{12} \text{ dm}^3$ 地下水污染^[1]。据1992年美国能源部对废弃物存放地点的调查,在91个调查点中的1/3具有放射性,有些高达10mCi/L,最为常见的污染物包括放射性核素 ^{235}U 、 ^{238}Pu 、 ^{99}Tc 、 ^{90}Sr 、 ^{137}Cs ,重金属铬、铅、汞以及大量毒性有机化合物(如甲苯、三氯乙烯)^[2]。这种高强度辐射性和化学危害在很相当长的时间内对生物具有毒害作用。美国能源部公布的这些废弃物通过土壤深埋以及焚烧等常规处理方法,估计花费要1890~2650亿美元。冷战时期前苏联的放射性污染情况估计更加严重,因研制、生产试验核武器,已导致前苏联“丧失”了15%的领地,成为无法居住的区域。据国际原子能机构(IAEA)2001年5月3日发布的数据,到2000年12月31日,世界上运行的核电机组有438套,还有29座在建^[3]。随着国民经济的快速发展,我国也在加紧核能的开发,我国有5套核电机组正在运行,另有6套在建。核能在国防、工业、农业、医疗和科研中的广泛应用同时也伴随大量放射性废弃物的产生。我国放射性废弃物的年产量约为全国工业固体废弃物总产量的0.5%左右,以1996年为例,全国工业固体废弃物产量6.34亿吨,放射性废弃物为227万吨^[4]。治理这些危险性废弃物同样耗资巨大。

1 微生物生物修复作用

放射性废弃物的治理,除了采取目前的常规手段外,开发经济有效的微生物生物修复技术来治理这些放射性污染是一个极其有效的选择。有一些特殊微生物具备在极端条件下对金属及有机污染物的解毒功能。利用微生物治理放射性污染必需要有两个条件,首先具备生物修复功能的微生物具备在放射性环境中的生存能力。第二,通过工程手段改造的微生物不应造成危害公众健康以及环境的副效应。

* 国家自然科学基金资助项目 (No 30070201)

Project Granted by Chinese National Science Fund (No 30070201)

收稿日期: 2003-04-28, 修回日期: 2003-06-20

已经报道有很多野生型细菌天然或经基因工程改建后具备转化、解毒或固化多种金属以及有机污染物的功能。比如铜绿假单胞菌和希瓦氏菌对金属 Cr^{6+} 具有还原作用^[5], 恶臭假单胞菌具有降解甲苯功能, 真养产碱菌 *czc* 基因座对重金属具有抗性和解毒功能, 表达拟南芥植物络合素合成酶 (PCS) 的大肠杆菌具有重金属富集功能^[6]。但这些菌存在的一个明显缺陷是对辐射敏感, 只能在辐射水平较低的环境中发挥生物修复功能。理论上, 可以在自然环境中分离或者通过遗传工程改造两条途径获取耐辐射菌, 目前还没有直接从放射性废弃物中分离耐辐射微生物的报道。但是, 在 6,000rad/h 慢性照射条件下, 利用合成的营养丰富培养基从非极端环境中分离耐辐射菌也是一种非常有效的方法, 表 1 中所列出的耐辐射菌大部分都是通过该方法分离。但是, 通过这种方法分离的很多细菌有一些形成芽胞, 一旦处于生长状态则对辐射敏感^[7]。其它的缺陷还包括没有合适的遗传操作系统以及具有致病性等, 不适合开发用于放射性废弃物的生物修复。但是, 奇球菌科 (Deinococcaceae) 的成员则具备独特的性质。

2 耐辐射奇球菌的特性

奇球菌科的成员是迄今为止所发现细菌中辐射耐受性最强的一类细菌, 并且有生长力, 具备易培养, 无致病性等优点。虽然分布广泛, 起源古老, 但目前仅发现了 7 个种, 各个菌种的来源、分离地区和时间见表 1。值得注意的是, 我们最近也在国内首次分离到一株杆状耐辐射菌, 通过初步的鉴定证实其归于 Deinococcaceae 科^[8]。

Deinococcus radiodurans (*D. radiodurans*, 耐辐射奇球菌) R1 是 *Deinococcus* 属的模式菌株, 1956 年首先从经 X 光照射后仍然腐烂的罐头中分离出来^[9]。分离菌在培养基上形成红色菌落、不形成芽胞、革兰氏染色阳性, 严格好氧、菌体形态较大、形成四聚体。耐辐射奇球菌不但可以在超过 1,500krad 急性电

表 1 奇球菌科的成员及分离情况

种 名	来 源	地 区	分离时间
<i>D. radiodurans</i> R1	罐头	英国	1956
<i>D. radiodurans</i> SARK	医院污染物	加拿大	1958
<i>D. radiopugnans</i>	鳕鱼	美国	1963
<i>D. radiophilus</i>	鸭	印度	1971
<i>D. proteolyticus</i>	粪便	法国	1973
<i>D. grandis</i>	粪便	日本	1987
<i>D. geothermalis</i>	温泉	葡萄牙	1997
<i>D. murrayi</i>	温泉	意大利	1997

离辐射条件下存活并且不发生变异。该剂量的辐射可以造成 *D. radiodurans* 每条染色体产生大约 130 个双链断裂位点 (DSB), 而对于大多数细菌, 每条染色体产生 2~3 个 DSB 将不能存活, 此外, 6,000rad/h 慢性照射对其生长以及外源基因的表达也无任何影响, 这也是该菌可以在放射性污染环境中发挥生物修复功能的基础。同时, 该菌还可以抵抗紫外辐射和氧化物等 DNA 损伤因素, 并具有很强的抗干燥能力。生长期菌耐受电离辐射的能力是大肠杆菌的 50~100 倍。这使得该菌成为研究耐辐射机理的一个极佳选择对象。1999 年, *D. radiodurans* R1 基因组全序列测定完毕^[10], 这也是 *Thermus/Deinococcus* 类群中全序列已知的一个代表菌。整个 *D. radiodurans* R1 基因组包括两条染色体 (DR_Main (2.65 Mbp) 和 DR412 (412 kbp)), 一个大质粒 (DR177 (177 kbp)) 以及另一个质粒 (46kbp), 预期编码约 3,195 个基因。*D. radiodurans* 超强的辐射耐受性依赖于其强大的 DNA 修复能力, 最近认为, 其独特的基因组结构是其超强耐辐射能力的一个重要因素^[11]。通过扫描电镜观察发现, 在静止期及 90% 以上的活性生长期 *D. radiodurans* 细胞内存在两条垂直的界线, 使得每个细胞形成四分结构, 每个部分包含等量

的DNA,同时透射电镜观察也显示膜状结构将每个细胞分成4个腔状结构,但在静止期及生长期细胞发现膜状结构上存在通道,染色质在每个腔内形成独特的环形结构。这种DNA的腔室化分布以及核状体的环形结构在其它细菌中极为罕见,这种结构可能与*D. radiodurans*超强辐射抗性有关,它使得DNA形成坚固的基质。

3 应用耐辐射奇球菌进行生物修复

*D. radiodurans*基因组全序列的测定和遗传工程技术的建立,使得对其遗传背景有更深入的了解。通过功能基因组学和基因工程操作技术,耐辐射奇球菌将对放射性环境中金属以及有机物生物发挥解毒功能。自1997年始,人们开始探索在辐射条件下*D. radiodurans*用于生物修复的可行性。因为所有奇球菌科的成员都可以在6,000rad/h慢性辐射条件下存活,在该剂量慢性辐射条件下,已经有一系列外源基因成功地表达于*D. radiodurans*,说明该菌在DNA损伤条件下可照常进行复制及同源重组。值得注意的是,奇球菌科不同的成员具备独特的生理生化性质,比如*D. geothermalis*最适生长温度是50℃,并且*D. radiodurans*的表达系统同样适用于*D. geothermalis*。因此,*D. radiodurans*的一系列遗传操作技术可以移用于后者,这使得耐辐射菌同样可以在地下泄漏池等温度较高的辐射环境发挥生物修复功能^[12]。另一方面,奇球菌科不同成员的营养需求可能存在差异,如本文最后讨论部分所述,*D. radiodurans*存在生理限制,“现场”菌可以因其独特的生理生化特性,从而在不同的放射性环境中发挥金属和有机化合物生物修复功能。目前为止,奇球菌科中仅在*D. radiodurans* R1和*D. geothermalis*两个菌株中建立了遗传操作系统,但遗传操作相对于大肠杆菌来说要复杂得多,一般采取基因组重组方法,因此探索更便利的基因工程操作技术也是一项紧迫的任务。

4 耐辐射奇球菌的重金属修复作用

微生物能够抵抗重金属的毒性作用往往是由于它们能够将其转化为毒性较低的形式。比如将毒性的 Hg^{2+} 还原为低毒性的Hg。目前已经有一系列金属抗性或者还原基因在该菌中表达。通常金属在低氧化态下的可溶性较差。因此,具有催化还原功能的酶在金属修复中可以发挥重要作用。比如辐射敏感菌*oneidensis*希瓦氏菌(分离自oneida湖,前称腐败希瓦氏菌*Shewanella putrefaciens*)MR-1,可以有效将可溶性 U^{6+} 、 Cr^{6+} 、 Tc^{7+} 还原为不溶性 U^{5+} 、 Cr^{3+} 和 Tc^{4+} ,2002年,*oneidensis*希瓦氏菌基因组全序列测定完毕为在*D. radiodurans*表达*oneidensis*希瓦氏菌金属还原酶基因进一步创造了条件。此外,*D. radiodurans*在某些条件下具有天然的重金属修复功能,比如在腐殖酸存在时厌氧培养可以还原 U^{6+} 和 Tc^{7+} ,而无需腐殖酸就可以还原 Cr^{6+} ^[13]。

汞、铬和铅是放射性废弃物中最常见的污染重金属,一系列可以抵抗这些重金属的基因也已经在*D. radiodurans*中成功表达^[13,14]。研究背景比较清楚的大肠杆菌BL308 *merA*基因座已经克隆于*D. radiodurans*,*merA*基因编码汞离子还原酶,可以将毒性极大的 Hg^{2+} 还原为低毒的元素Hg,研究还发现,通过改变目标基因的拷贝数可以定量控制*merA*基因的表达,当*merA*基因拷贝数为1~150时,基因的拷贝数与对 Hg^{2+} 的抗性与还原功能存在较好的相关性,并且在基因工程操作技术上,采取将外源基因串联重复插入*D. radiodurans*基因组表达的策略比采用载体扩增外源基因效果更好。在6,000rad/h电离辐射条件下,表达*merA*基因的工程化*D. radiodurans*可以抵抗有害剂量的 Hg^{2+}

(30-50 μ M), 并且可以有效将 Hg^{2+} 还原为 Hg 。当 *merA* 基因达到 150 拷贝数时, 插入的基因长度达到 3,000,000bp, 这种表明 *D. radiodurans* 基因组可以维持、复制和表达非常大的外源 DNA 片断, 因而可以容许和功能性表达高度扩增的编码生物修复功能的外源基因, 这就意味着可以在同一个工程菌中同时表达多个生物修复基因, 研究发现, 共表达 *merA* 和 *tod* 的工程菌能够代谢甲苯或氯苯同时能够抵抗毒性 Hg^{2+} 并将其还原为元素 $\text{Hg}^{[14]}$, 这一特性使得我们能够将 *D. radiodurans* 应用于复杂的混合放射性废弃物治理。其它已克隆于 *D. radiodurans* 的金属还原和抗性基因包括还原 U^{6+} 的普通脱硫弧菌 (*Desulfonibrio vulgaris*) *cytC3* 基因, 还原 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 的真养产碱菌 (*Ralstonia eutrophus*, 原名 *Alcaligenes eutrophus*) CH34 *czc* 基因, 还原 Cr^{6+} 的苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 基因。

5 利用耐辐射奇球菌降解毒性有机化合物

利用微生物对放射性废弃物污染土壤和地下水中的毒性有机物进行生物修复比常规方法也具有不可比拟的优势, 放射性废弃物中最常见的有机溶剂包括苯、甲苯、乙苯和二甲苯, 已经发现有一些微生物可以天然利用这些有机溶剂, 如恶臭假单胞菌 (*pseudomonas putida*), 并且其遗传背景和生理生化特性也已经研究得比较清楚, 但是, 由于这些细菌对辐射敏感所以不适合于放射性环境中生物修复作用。采取与重金属汞生物修复类似的策略, 也可以利用工程手段改造 *D. radiodurans* 以使其具备有机物降解功能。Lange 等已将恶臭假单胞菌 F1 甲苯双加氧酶 (TDO) 基因 *todC1C2BA* 表达于 *D. radiodurans*^[15], TDO 是一大类细菌双加氧酶的典型代表, 底物广谱, 功能性 TDO 需要 4 种基因协同表达以及 3 种蛋白组分的组装, 此外还需要金属以及有机因子参与, 其成功表达提示其它更为简单的生物降解酶也能够在此 *D. radiodurans* 中表达。在慢性辐射条件下, 这些工程菌可以氧化甲苯、氯苯以及二氯苯。表达 *todC1C2BA* 的工程菌可以氧化甲苯为甲苯-顺-二氢二醇, 随后可被天然的非特异性脱氢酶代谢为 3-甲基儿茶酚, 800mg/L 甲苯和 1200mg/L 三氯乙烯对工程菌生长无影响。其它转化甲基儿茶酚的假单胞菌代谢基因也已被导入表达 *todC1C2BA* 的工程 *D. radiodurans* 菌, 可以矿化甲苯和相关化合物。

6 耐辐射奇球菌的生理限制

虽然 *D. radiodurans* 在重金属以及有机物污染防治中显示出诱人的前景, 但是在实际应用中仍然可能受到 *D. radiodurans* 本身的限制。比如野生型耐辐射奇球菌丝氨酸、半胱氨酸和赖氨酸氨基酸合成通路不完全。因此, 在最适的生长条件下, *D. radiodurans* DNA 修复能力极强, 因此能够在急性或慢性辐射条件下生长, 然而, 在营养缺乏的放射性环境中则生长受到抑制。这种变化对于 *D. radiodurans* 实际应用于放射性污染治理非常重要, 通过生长研究以及全基因组序列分析发现, *D. radiodurans* 代谢调控限制了碳、氮和 DNA 代谢, 其中一个很重要的原因是 *D. radiodurans* R1 在过去 40 年中一直维持于营养丰富的合成培养基中。在营养缺乏条件下, DNA 修复能力, 主要受细菌代谢能力的限制。因此, 当在营养受限的放射性环境中应用 *D. radiodurans* 进行生物修复作用时, 有必要进一步分析维持 *D. radiodurans* 在营养缺乏的放射性环境中旺盛生长的氨基酸和维生素。

参考文献

- [1] McCullough J, Hazen T C, Benson S M, *et al.* Bioremediation of Metals and Radionuclides. Germantown, MD: US Department of Energy, Office of Biological and Environmental Research, 1999.
- [2] Riley R G, Zachara J M, Wobber F J. Chemical Contaminants on DOE Lands and Selection of Contaminant Mixtures for Subsurface Science Research. Washington, DC: US Department of Energy, Office of Energy Research, Subsurface Science Program, 1992.
- [3] 赵仁恺, 张伟星. 国土资源, 2002, 9: 4~9.
- [4] 谈成龙. 铀矿地质, 2000, 16 (4): 247~250.
- [5] Viamajala S, Peyton B M, Apel W A, *et al.* Biotechnol Prog, 2002, 18 (2): 290~295.
- [6] Sauge ~ Merle S, Cuine S, Carrier P, *et al.* Appl Environ Microbiol, 2003, 69 (1): 490~494.
- [7] Van Gerwen S J, Rombouts F M, van't Riet K, *et al.* J Food Prot, 1999, 62P: 1024~1032.
- [8] 吕 星, 邢瑞云, 周绪斌, 等. 微生物学报, 2003, 43 (3): 301~306.
- [9] Anderson A, Nordan H, Cain R, *et al.* Food Technol, 1956, 10: 575~578.
- [10] White O, Eisen J A, Heidelberg J F, *et al.* Science, 1999, 286: 1571~1577.
- [11] Levin ~ Zaidman S, Englander J, Shimon E, *et al.* Science, 2003, 299: 254~256.
- [12] Daly M J. Current Opinion in Biotechnology, 2000, 11: 280~285.
- [13] Fredrickson J K, Kostandarithes H M, Li, S W, *et al.* Appl Environ Microbiol, 2000, 66 (5): 2006~2011.
- [14] Brim H, McFarlan S C, Fredrickson J K, *et al.* Nat. Biotechnol, 2000, 18: 85~90.
- [15] Lange C C, Wackett L P, Minton K W, *et al.* Nature Biotechnology, 1998, 16: 929~933.