

# 非均匀电场对土壤中基因工程菌的迁移与机理

罗启仕<sup>1</sup>,张锡辉<sup>1,2\*</sup>,王慧<sup>1</sup>,钱易<sup>1</sup> (1.清华大学环境科学与工程系,环境模拟与污染控制国家重点联合实验室,北京 100084; 2.清华大学深圳研究生院,环境工程与管理研究中心,广东 深圳 518057)

摘要: 以克隆有绿色荧光蛋白基因的 Rm1021-GFP 细菌作为标记细菌,研究了该细菌在非均匀电场作用下在土壤中的运移特征和存活性,分析了其运移机理和影响因素.结果表明,非均匀电场能有效地促进土壤中 Rm1021-GFP 细菌的运移,电泳、介电泳和随电渗析流迁移是其主要机理.土壤介质、电压梯度和电极反应是其主要影响因素,电极反应对电极附近细菌的存活性有不利影响.

关键词: 非均匀电场; 基因工程菌; 细菌迁移; 细菌存活性

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2004)03-0285-05

**The movement and its mechanism of genetic engineering bacteria in soils by non-uniform electric field.** LUO Qi-shi<sup>1</sup>, ZHANG Xi-hui<sup>1,2</sup>, WANG Hui<sup>1</sup>, QIAN Yi<sup>1</sup> (1.State Key Joint Laboratory of Environmental Simulation and Pollution Control, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 2.Research Center for Environmental Engineering and Management, Shenzhen Graduate School, Tsinghua University, Shenzhen 518057, China). *China Environmental Science*, 2004,24(3): 285~289

**Abstract** :With Rm1021-GFP bacteria of green fluorescent protein gene as a mark bacterium, the movement character and survival of the bacteria in soil under non-uniform electric field were studied, and the movement mechanisms and affecting factors were analyzed. Non-uniform electric field could promote effectively the movement of the bacteria in soil. Electrophoresis, dielectrophoresis and electroosmosis were its main mechanism; and soil media, voltage gradient and electrolysis of pore fluids on electrodes were its main affecting factors. Electrolysis of pore fluids on electrodes affected adversely the survival of the bacteria near the electrodes.

**Key words** : non-uniform electric field ; genetic engineering bacteria ; bacteria movement ; bacteria survival

微生物的移动性是影响生物修复速率和生物强化效率的重要因素之一.具有降解活性的微生物在土壤中的吸附、沉降和过滤,阻止或延迟了微生物的运移<sup>[1]</sup>,使土壤污染物被降解的机会大大降低.当污染环境缺乏活性微生物或其数量不足时,则需加入活性微生物或基因工程菌进行生物强化<sup>[2]</sup>.传统方法是通过水力作用将外源微生物注入受污染环境中.这种方式注入的微生物通常集中于注入点的局部位置,容易堵塞土壤孔隙,使强化过程失败.非均匀电场可以使微生物产生电泳和介电泳运动<sup>[3,4]</sup>,因而可能成为生物强化的手段.本研究以克隆有绿色荧光蛋白基因 *gfp* 的基因工程菌 *Rhizobium meliloti*1021 (Rm1021-GFP)作为标记细菌,研究该细菌在非均匀电场作用下,在不同土壤介质中的运移特征

及其机理,以揭示利用非均匀电场加速土壤微生物运移的特性.

## 1 材料与方法

### 1.1 受试土壤和微生物

自然土取自清华园附近林地,风干磨细过 2mm 筛后,储存待用;高岭土和石英砂购自北京旭东化工厂.石英砂平均粒径为 0.5mm;自然土和高岭土的主要性质见表 1.

受试微生物为 Rm1021-GFP.该菌株由美国麻省理工学院生物技术研究中心提供.

### 1.2 土壤灭菌和菌液制备

收稿日期: 2003-10-08

基金项目: 日本地球环境产业机构资助项目

\* 责任作者, 教授, xihuizh@tsinghua.edu.cn

表 1 受试土壤的主要性质

Table 1 Major characteristics of the tested soils

参数	自然土	高岭土
质地	沙壤土	轻黏土
粒径( $\%$ ) < 2 $\mu\text{m}$	11.21	19.07
2~10 $\mu\text{m}$	5.01	47.92
10~50 $\mu\text{m}$	7.00	32.38
50~250 $\mu\text{m}$	63.31	0.63
> 250 $\mu\text{m}$	13.47	0
表面积( $\text{m}^2/\text{g}$ )	8.10	9.53
碳酸盐( $\%$ )	0.0306	0.0125
有机质( $\text{g}/\text{kg}$ )	5.33	0.98
CEC ( $\text{cmol}/\text{kg}$ )	11.25	8.80
饱和含水量( $\%$ )	33.0	53.6
Zeta 电位( $\text{mV}$ )	-34	-48
等电点	1.3	2.0

取适量受试土壤,湿热(121 $^{\circ}\text{C}$ , 2h)和干热(105 $^{\circ}\text{C}$ , 6h)交替灭菌 3 次,冷至室温后使用。

用 LB/MC 培养基<sup>[5]</sup>将 Rm1021-GFP 恒温培养至指数期,离心浓缩,测定其光密度并用菌落计数法测定细菌数。

### 1.3 实验方法

取 1.0kg 灭菌土壤,按其饱和含水率为 70% 的比例加入无菌水(含链霉素 500mg/L 和放线菌酮 25mg/L),充分拌匀后逐层装入有机玻璃反应器(24cm $\times$ 10cm $\times$ 6cm),振动压实,吸去表层压出水,制成体积为 24cm $\times$ 10cm $\times$ (2.2~2.6)cm 的实验土壤。测定其含水率和细菌量。在反应器中部取出体积为 0.5cm $\times$ 9cm $\times$ (2.2~2.6)cm 的土壤,填入相同体积灭菌石英砂。用微量移液管在石英砂区每隔 0.5cm 加入菌液 50 $\mu\text{L}$ 。往整个土壤中加入细菌时,则直接将菌液与土壤充分混合。

插入板状(0.5cm $\times$ 10cm $\times$ 5cm)和圆柱状(直径 $\times$ 长=0.5cm $\times$ 5cm)高纯石墨电极,分别产生均匀和非均匀电场,电极间距为 20cm。用导线将阳极和阴极分别与电源正极和负极相连。加盖密封反应器。施加 40V 和 20V 恒定电压(即电压梯度分别为 2V/cm 和 1V/cm),同时以不加电场作为对照。试验运行 1~2d,每隔 2~4h 在 a0、a1、c0 和 c1 处取样;整个土壤中加入细菌时则实验结束后在 a0~c0 区域每隔 3cm 取样。取样位置见图 1。

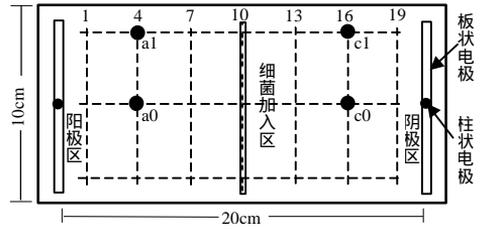


图 1 取样点空间分布

Fig.1 Layout of sampling positions

### 1.4 分析方法

取 0.1g 土样加 0.1% 焦磷酸钠溶液 0.9mL,振荡 10min,取上清液 0.1mL 按 10 倍梯度稀释,测定 0.1mL 稀释样中的细菌量。Rm1021-GFP 活菌数用 LB/MC 琼脂平板法,30 $^{\circ}\text{C}$  恒温培养 2d 后在波长 365nm 紫外灯下计数绿色荧光菌落数<sup>[6]</sup>。死菌数用 *BacLight* LIVE/DEAD 探针,室温下染色 15min,用荧光显微镜在 460~490nm 计数红色细菌数,计数方法及样品细菌量换算见文献[7]。同时用 BCA 试剂测定样品蛋白质含量,测试原理和方法见文献[8]。另取 2g 土样加入 0.01mol/L  $\text{CaCl}_2$  溶液 5mL,振荡 3h 后用 pH 计测定上清液 pH 值。同时用烘干法(105 $^{\circ}\text{C}$ )测定样品水分含量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 土壤中 Rm1021-GFP 细菌的运移特征

首先研究了自然土中 Rm1021-GFP 的迁移。试验开始时测得土壤含水率为 17.5%,其水分饱和度和为 53%。在反应器中部加入 Rm1021-GFP 菌液,测得土壤初始菌量为 9.13 log CFU/g,其他区域不含该细菌。施加电场后 a0、c0、a1 和 c1 处的细菌量明显增加(图 2)。对照实验中在各取样点均没有检测到该细菌。表明电场能加速不饱和土壤中 Rm1021-GFP 细菌的运移。

图 2 表明,各取样点细菌量随时间增加均出现一个明显的峰,意味着电场作用下,大多数细菌是被一起迁移的。由经过 a0、c0、a1 和 c1 处的细菌迁移速率和累计迁移量(表 2)可以看出, Rm1021-GFP 通过 a0~a1 向阳极迁移速率比通过 c0~c1 向阴极的迁移速率快 2.3~6.4cm/d,而且向

阳极累计迁移量比向阳极的迁移量大约 3 个数量级. 这表明在电场作用下自然土中的 Rm1021-GFP 细菌主要是向阳极区迁移的. 细菌表面通常带负电荷, 在电场中能以电泳方式向阳

极运动<sup>[3]</sup>, 同时也能被电渗析流拖向阴极<sup>[9]</sup>. 自然土粒径较大且水分含量较低, 电场引起的电渗析流较弱<sup>[9]</sup>, 因而随电渗析流迁移的细菌量较少.

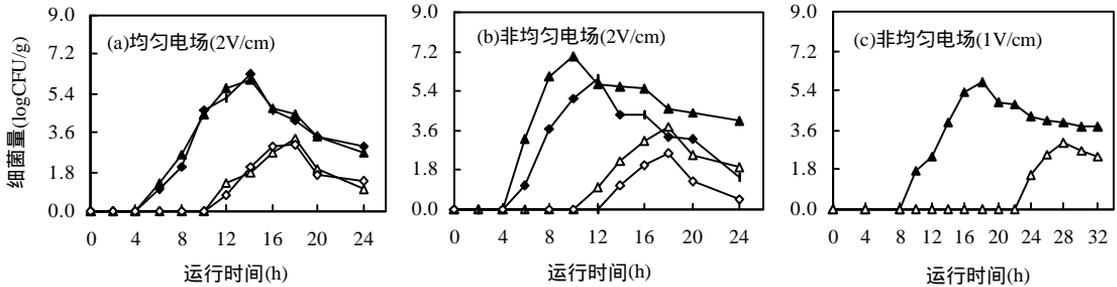


图 2 各取样点 Rm1021-GFP 细菌量随时间的变化

Fig.2 Variation of Rm1021-GFP at sampling positions with time

a0 c0 a1 c1

在均匀电场作用下, Rm1021-GFP 细菌经过 a0~c0 和 a1~c1 的迁移基本相同; 但在非均匀电场作用下, 24h 内经过 a0~c0 的累计迁移量比经过 a1~c1 的迁移量至少大 1 个数量级(表 2). 可见 Rm1021-GFP 细菌在非均匀电场中主要是通过 a0~c0 区域迁移. 这可能是由不同系统中场强分布的空间差异引起的. 在均匀系统中 a0~c0 和 a1~c1 场强大小相同, 而非均匀系统中 a0~c0 场强最大, a1~c1 场强较小, 而且离电极越近场强越大<sup>[4]</sup>.

累计迁移量分别为 14.4cm/d 和 7.40 log CFU/g, 而在均匀电场作用下则分别为 10.3cm/d 和 6.54log CFU/g; 尽管非均匀系统中通过 c0 处向阴极迁移速率与均匀系统相同, 但其累计迁移量比后者大 0.40 log CFU/g. 这表明, 在相同条件下非均匀电场更有利于土壤中细菌的迁移. 这是因为, 在非均匀电场中细菌还可能发生极化, 并通过介电泳方式向场强较大的电极区运动, 而在均匀电场中细菌则不能进行介电泳迁移<sup>[4]</sup>.

表 2 自然土中 Rm1021-GFP 迁移速率和累计迁移量  
Table 2 Migration rate and cumulative amount of Rm1021-GFP in the natural sandy loam

取样点	均匀(2V/cm)		非均匀(2V/cm)		非均匀(1V/cm)	
	V	C-24h	V	C-24h	V	C-32h
a0	10.3	6.54	14.4	7.40	8.0	6.29
a1	10.3	6.68	12.0	6.35		
c0	8.0	3.78	8.0	4.18	5.1	3.59
c1	8.0	3.66	8.0	3.00		

注: V 为迁移速率(cm/d), C-24h 和 C-32h 分别为 24h 和 32h 内的累计迁移量(log CFU/g)

电压梯度为 2V/cm 时, Rm1021-GFP 在非均匀电场作用下通过 a0 处向阳极的迁移速率和 24h

电压梯度为 1V/cm 时, Rm1021-GFP 细菌在非均匀电场作用下通过 a0~c0 向阳极迁移速率为 8.0cm/d, 比 2V/cm 时小 6.4cm/d, 而且其累计迁移量也小得多. 外加电压直接决定着对细菌作用力的大小, 因而对土壤中细菌的迁移有重要影响.

实验同时研究了非均匀电场(2V/cm)对高岭土和石英砂中 Rm0121-GFP 的迁移(图 3). 石英砂中的 Rm1021-GFP 通过 a0 向阳极迁移速率高达 24.0cm/d, 比自然土中快 9.6cm/d, 但通过 c0 向阴极的速率比自然土中慢 3.2cm/d. 高岭土中的 Rm1021-GFP 向阳极和阴极的迁移速率分别为 5.1 和 3.4cm/d, 比在自然土和石英砂中的迁移慢得多. 可见非均匀电场对土壤中细菌的迁移与土壤介质密切相关. 土壤的孔隙大小、表面积和表

面电荷等可能是其重要影响因素<sup>[3,9]</sup>.高岭土颗粒最小、表面积和表面电荷最大(表 1),石英砂则相反,自然土介于二者之间.受土壤孔隙大小的限制,细菌在 3 种介质中迁移难易顺序为:高岭土 > 自然土 > 石英砂,但是随电渗析流向阴极迁移的难易顺序则相反.

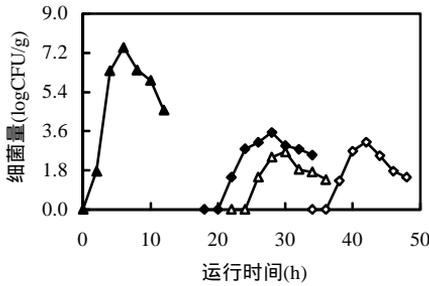


图 3 Rm1021-GFP 细菌在高岭土和石英砂中的迁移  
Fig.3 Migration of Rm1021-GFP through kaolin soil and quartz sand under non-uniform electric field

石英砂-a0      石英砂-c0      高岭土-a0  
高岭土-c0

2.2 电场对 Rm1021-GFP 细菌存活性的影响

直接将 Rm1021-GFP 菌液与自然土均匀混合,施加非均匀电场(2V/cm)运行 5h、24h 和 48h,在 a0~c0 区域每隔 3cm 取样.用 BCA 和 CFU 法同时测定其细菌量.BCA 法假定土壤细菌量越多,土壤蛋白质含量则越高,样品在波长 610nm 吸光度则越大<sup>[8]</sup>.BCA 法测定结果(图 4a)表明随着运行时间增加,土体中部细菌量逐渐减少,阳极区细菌量急剧增加,阴极区细菌量也一定程度地增加.这与只在土体中部加入细菌的结果相符. CFU 法测定结果(图 4b)表明,尽管土体中部细菌量逐渐减少,但电极区尤其是阴极区的细菌量也显著降低,因此细菌总量变少.CFU 法测定的是能在 LB/MC 中生长的活细菌,而 BCA 法反映的是包括活菌和死菌在内的总菌量,这意味着土壤中死细菌量在逐渐增加.

用 BAclight LIVE/DEAD 探针可将活细胞和死细胞分别染成绿色和红色<sup>[7]</sup>.在土壤和 MC/LB 培养基中加入的链霉素和放线菌酮可抑

制杂菌生长<sup>[5]</sup>,在荧光显微镜下观察到的红色细胞应主要是 Rm1021-GFP 死细菌.测定结果(图 5)表明,在 2V/cm 下运行 24h 时,距阴极 1cm 的死细菌比例为 29.4%,运行 48h 时距阴极 1cm 和 4cm 的死菌量分别高达 95.9%和 79.8%,距阳极 1cm 的死菌量也明显增加.

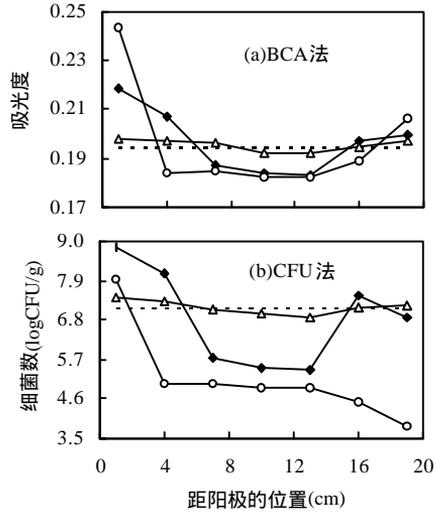


图 4 自然土中 Rm1021-GFP 细菌含量的变化  
Fig.4 Variation of Rm1021-GFP in the natural soil under non-uniform electric field

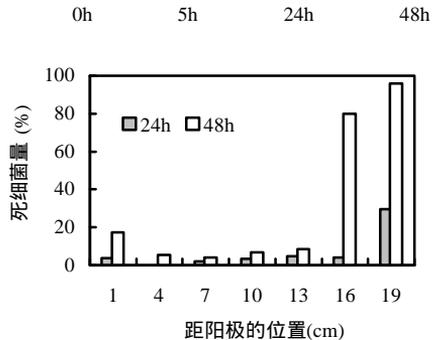


图 5 Rm1021-GFP 死细菌的分布  
Fig.5 Distribution of dead Rm1021-GFP

细菌电消毒的相关研究表明,直接致死细胞需要高压脉冲电场<sup>[10]</sup>.本研究所用电压梯度(2V/cm)和电流密度(最大为 0.104mA/cm<sup>2</sup>)均较小,因而由电场直接致死细菌的可能性较低.土壤 pH 值测试表明,48h 时距阳极 1cm 的 pH 值降为

5.9,距阴极 1cm 和 4cm 的 pH 值则分别升高为 11.8 和 10.9. Rm1021-GFP 适合在中性 pH 值生长<sup>[5]</sup>,因而土壤 pH 值变化可能是细菌死亡的主要原因.另外土壤中未添加生长基质,部分细菌也可能因饥饿死亡.实验过程中电极表面发生水电解反应,在阳极和阴极分别产生  $H^+$  和  $OH^-$ ,从而导致阳极附近土壤 pH 值降低,阴极附近 pH 值升高.细菌表面电荷、电渗析流和土壤性质等都会随土壤 pH 值的变化而改变<sup>[3,9]</sup>,因此土壤 pH 值急剧变化不仅直接影响细菌存活,而且还会改变细菌迁移速率和方向.

### 3 结论

3.1 非均匀电场能有效地促进土壤中 Rm1021-GFP 细菌的运移,其作用效果与土壤介质类型和电压梯度密切相关.2V/cm 时 Rm1021-GFP 在石英砂、自然土和高岭土中向阳极迁移速率分别为 24.0,14.4,5.1cm/d,而 1V/cm 时在自然土中的迁移速率仅为 8.0cm/d.

3.2 在电场作用下 Rm1021-GFP 细菌主要通过电泳方式向阳极迁移,同时还受到向阳极的电渗析流影响,在非均匀电场中还可通过介电泳方式向场强较大的电极区运动.

3.3 电极反应引起土壤 pH 值急剧变化并对电极附近细菌的存活性有不利影响,因而必须采取适当的 pH 值控制措施.

#### 参考文献：

- [1] 郭笃发,姜爱霞.微生物在土壤中的迁移及其影响机制 [J]. 土壤通报,1998,29(4):188-190.
- [2] Ripp S, Nivens D E, Werner C, *et al.* Vertical transport of a field-released genetically engineered microorganism through soil [J]. Soil Biology Biochem., 2001,33:1873-1877.
- [3] DeFlaun M F, Condee C W. Electrokinetic transport of bacteria [J]. J. Hazar. Mater., 1997,55:263-277.
- [4] Betts W B. The potential of dielectrophoresis for the real-time detection of microorganisms in foods [J]. Trends in Food Sci. Tech., 1995,6:51-58.
- [5] Pellock B J, Cheng H P, Walker G C. Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides [J]. J. Bacteriol., 2000,182(15):4310-4318.

- [6] Cassidy M B, Leung K T, Lee H, *et al.* A comparison of enumeration methods for culturable *Pseudomonas fluorescens* cells marked with green fluorescent protein [J]. J. Microbiol. Methods, 2000,40:135-145.
- [7] Boulos L, Prevost M, Barbeau B, *et al.* LIVE/DEAD BacLight: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water [J]. J. Microbiol. Methods, 1999,37:77-86.
- [8] 孙国芬.电动力学强化生物修复研究 [D]. 北京: 清华大学, 2001.23-29.
- [9] Virkutyte J, Sillanpää M, Latostenmaa P. Electrokinetic soil remediation-critical overview [J]. The Science of the Total Environment, 2002,289:97-121.
- [10] Ju L. Efficiency of biosurfactants applied by means of electrokinetics [D]. Montreal: Concordia Univ., 1999.82-87.

作者简介：罗启仕(1971-),男,四川宣汉人,清华大学环境科学与工程系在读博士生,主要从事环境污染控制与修复研究.发表论文 10 篇.

### 环保信息

我国将建环境和灾害监测小卫星星座 国家航天局局长栾恩杰透露,在未来几年内,我国将向太空发射多枚光学小卫星和合成孔径雷达小卫星,建立一个专门用于环境与灾害监测预报的小卫星星座,以形成由灾害信息运行系统和空间资源相结合的天地一体灾害管理体系.

摘自《中国环境报》

2004-04-29