

生物强化系统微生物分子诊断技术的应用及新发展

全向春¹ 施汉昌² 杨志峰¹ 何孟常¹

(1. 北京师范大学环境学院环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 北京 100875;

2. 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)

摘 要 现代分子生物技术的飞速发展及其在环境研究领域的应用, 为生物强化技术的研究和发展提供了新方法和新思路。本文从生物强化系统特异微生物检测及量化技术、生物强化系统微生物群落结构组成及动态演替规律研究、生物强化作用机制的分子生物学解析、生物强化菌的基因工程构建、生物强化系统微生物的安全释放及控制技术几方面, 对生物强化系统微生物分子诊断技术的应用和发展作了较为全面的综述。

关键词 生物强化 分子生物技术 基因 PCR

中图分类号 X783 **文献标识码** A **文章编号** 1008-9241(2006)03-0001-07

Application and recent developments of molecular biotechnologies for microorganisms detection in the bioaugmented systems

Quan Xiangchun¹ Shi Hanchang² Yang Zhifeng¹ He Mengchang¹

(1. State Key Joint Laboratory of Environmental Simulation and Pollution Control, School of Environment, Beijing Normal University, Beijing 100875; 2. State Key Joint Laboratory of Environmental Simulation

and Pollution Control, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084)

Abstract The rapid development of modern molecular biotechnology and its application in the field of environmental study creates new means and ideas for the research and development of bioaugmentation. This article provides an overview of recent developments of the study of bioaugmentation with molecular biotechnologies from the following aspects: methods for detecting and quantifying specific microorganisms in the bioaugmented system; the analysis of microbial community structure and its dynamic changes in the bioaugmented system; the study on the mechanism of bioaugmentation on molecular level; the construction of bioaugmentation microorganisms genetically and the safe release and containment techniques for the bioaugmented microorganisms.

Key words bioaugmentation; molecular biotechnology; gene; PCR

生物强化技术, 是通过向污染系统中直接投加具有特殊作用的微生物来去除某一种或某一类污染物质, 或对污染物处理系统的性能进行优化和改善。该项技术起源于 20 世纪 70 年代中期, 80 年代以来, 这项技术被广泛研究并应用于污染环境的修复、活性污泥性能的改善、难降解有机污染物的去除等多个方面^[1~4]。以往对生物强化技术的研究, 多是通过强化与非强化系统污染物去除宏观效果的对比和分析, 来调整、优化强化系统操作参数, 缺乏针对强化系统微生物生态学的深入研究。近年来, 现代分子生物技术的迅猛发展及其在生物强化研究中的应用, 使得人们能够从细胞、分子以及基因水平深入认识生物强化技术的作用机制、影响因素、强化效

应等等, 使生物强化技术的研究进入了一个新领域。

1 生物强化系统特异微生物检测及量化技术

生物强化系统不仅包含所投加的强化微生物, 往往还包含固有微生物。强化微生物在系统中的存活状态及其对固有微生物的影响会直接影响到生物强化效果的好坏。传统的平板培养计数法对特异微

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (50508006); 国家“973”重点基础研究发展规划项目 (2004CB418502)

收稿日期: 2004-10-31; **修订日期:** 2005-05-30

作者简介: 全向春 (1973~), 女, 博士, 主要从事生物强化技术的研究工作。E-mail: quanxiangchun@tsinghua.org.cn

生物量化所需的时间比较长,且对不同种类的微生物的分辨率比较差。分子标记和聚合酶链反应(PCR)技术的发展,为生物强化系统特异微生物的检测和量化提供了新方法。

1.1 生物标记基因

生物标记,或称为标记基因,是将一段外源

DNA序列插入到目标微生物体内,使其具备一定的基因型或表现型,能够在环境中识别并检测出来。表1列出了一些用于跟踪环境中特定微生物的标记基因及检测方法。生物标记的选择主要根据所研究的系统及要解决的问题来确定^[5]。

表 1 用于跟踪环境中特定微生物的生物标记
Table 1 Biomarkers for tracing specific mikroorganisms in the environment

生物标记	检测表现型	一般检测方法
抗生素抗性基因 nptII	具有抗生素抗性(如抗卡那霉素)	用含抗生素的选择性培养基培养
重金属抗性基因 mer	抗重金属(如抗汞)	用含重金属的选择性培养基培养
产色素标记基因 lacZY	分解底物产生带颜色的产物(如半乳糖苷酶分解 X-gal形成蓝色的产物)	用产色素培养基培养
产色素标记基因 xylE	当邻苯二酚存在时产生黄色的代谢产物	用产色素培养基培养
细菌荧光素酶基因 luxAB	在含 n 癸醛的基质中产生生物荧光	用光度计测定光的输出产荧光素菌落平板计数
真核生物荧光素酶基因 luc	在含荧光素的基质中产生生物荧光	用光度计测定光的输出对产荧光素菌落进行平板计数
绿色荧光蛋白基因 gfp	在蓝光的激发下会产生绿色荧光	选择性培养流式细胞仪或表面荧光显微镜计数

1.1.1 抗生素抗性基因

抗生素抗性基因,如卡那霉素基因 nptII是最早用于生物标记的基因。将抗生素抗性的基因插入到目标微生物体内,微生物便会对此种抗生素产生一定的抗性。通过在含抗生素的选择平板培养基上培养可识别目的菌种。

1.1.2 产色素标记基因

一些具有特定代谢特性的酶的编码基因也可作为生物标记,如 xylE 基因(编码邻苯二酚 2,3氧化酶)在邻苯二酚存在时产生黄色的代谢产物。产色素基因还有 lacZY(编码 β 半乳糖苷酶和乳糖透性酶)和 gusA(β 葡糖苷酸酶)基因等。但由于环境土著微生物中也可能含有较高含量的产色素基因,使其在土壤及水污染治理中的应用受到一定限制。

1.1.3 荧光素酶生物标记(luciferase biomarkers)

用萤火虫荧光素(luc)基因或细菌荧光素基因(luxAB)标记的微生物会产生荧光,通过平板培养或用光度计直接测定光输出量可以识别和监测特异微生物^[6]。但当环境条件恶劣微生物活性受到抑制时,单位微生物光输出量会降低,此时该方法所指示的生物量会产生一定偏差。也可以通过直接提取生物样品中总蛋白的方法进行测定,因为总蛋白中含有荧光素蛋白,荧光素酶的活性与样品中以荧光素酶标记的生物量直接相关^[7]。将 2,4-二氯苯氧基乙酸(简称

2,4-D)降解菌 *Pseudomonas cepacia* 用 lacZY 和 luxAB 基因标记后,加入到含 2,4-D 的土壤中,可以通过菌落培养对其数量变化进行监测^[8]。

1.1.4 绿色荧光蛋白基因(green fluorescent protein gene, 简称 gfp)

gfp 基因是编码水母体内一种绿色荧光蛋白的基因,它是一种很有应用前景的标记基因。与其他标记技术相比,其优点在于蛋白荧光是蓝色,除了在发色团形成初期需要加氧外,无需加入其他能量物质或基质。gfp 标记的细胞可用表面荧光显微镜、流式细胞仪等比较容易地检测出来。gfp 基因被广泛用于环境样品的生物标记^[9,10]。如对硝基苯酚降解菌 *Moraxella*^[11] 和菲降解菌 *Pseudomonas*^[12] 以 gfp 基因标记后,就可对其在土壤中的变化情况进行跟踪。

在许多情况下,往往一种生物标记不能够灵敏地检测出环境样品中的特异微生物,采用 2 种甚至几种标记基因,并采用多种检测方法成为该领域的研究热点之一。采用双基因标记,如将抗生素抗性基因与生物荧光基因相结合, luxAB 基因和 gfp 基因相结合,对于微生物的检测将更加有效。luxAB 基因作为生物标记时,发出的生物荧光与细胞的能量状态有关,而细胞代谢需要能量,故生物荧光的输出直接与细胞的代谢活性有关。相反, gfp 基因产生荧光不需要能量。因此,这 2 种标记基因的结合可同

时检测样品中特异微生物的总量及其代谢活性。

1.2 基于聚合酶链式反应 (PCR)技术

从环境样品中提取的核酸往往存在于一个复杂的混合物体系中,且含量很少,往往难以直接用于定性或定量研究。PCR 是一种在体外扩增核酸序列从而得到多个核酸拷贝的技术。PCR 与 DNA 技术相结合,使环境样品中微量特异 DNA 片断的检测成为可能。采用嵌套引物进行 2 轮 PCR 扩增,或采用

实时检测系统,则会进一步提高检测的灵敏度。虽然 PCR 扩增的检测限是不确定的,但一般对于含 $10^2 \sim 10^3$ 个细胞 /g 土壤的系统,可以通过 PCR 扩增检测到其中的特异 DNA 片段。尽管 PCR 方法很灵敏,但对于环境样品中微生物的定量化检测还是有一定的难度。目前,基于 PCR 技术的 DNA 定量化方法主要有:MPN-PCR 和竞争 PCR (cPCR),这些方法在生物强化中的应用如表 2 所示。

表 2 基于 PCR方法的微生物定量化技术在生物强化系统中的应用
Table 2 Application of microbial quantitative methods based on PCR in bioaugmented systems

细 菌	目标基因	定量化方法	参考文献
<i>Mycobacterium chlorophenolicum</i> strain(五氯酚降解菌)	16 rRNA	MPN-PCR	[13]
<i>Desulfitobacterium frappieri</i> strain(五氯酚降解菌)	16 rRNA	嵌套 PCR	[14]
<i>Pseudomonas abietaniphila</i> BKME-9(树脂酸降解菌)	16S rDNA	竞争 PCR和竞争 RT-PCR	[15]
<i>Pseudomonas putida</i> strain mx(甲苯降解菌)	xylE	竞争 PCR	[16]
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 11172(苯酚降解菌)	dmpN	PCR和 RT-PCR	[17]
<i>Pseudomonas</i> sp. Strain P51(三氯苯降解菌)	tbcC	竞争 RT-PCR	[18]
<i>Pseudomonas resinovorans</i> strain CA10(呋唑和二苯基 对 二恶英降解菌)	carAa	实时竞争 PCR	[19]

1.2.1 竞争 PCR

定量的 cPCR 方法是在每个 PCR 反应体系中加入人工构建的带有突变的竞争模板作为内标物(竞争 DNA),内标应与目标 DNA 相似,能够被同一引物扩增,但又能够与目标 DNA 片段相区分。一般是通过对目标基因进行人工改造,使其带有一个小片断的缺失,作为 PCR 扩增的竞争模板。通过向经过系列稀释的目标 DNA 样品中加入某一已知含量的竞争 DNA,并以 PCR 扩增 DNA 的产率对目标 DNA 的初始浓度作图,建立标准曲线。通过标准曲线来计算目标 DNA 在环境样品中的未知浓度。在进行实际样品测定时,加入到样品中的竞争 DNA 内标量要与作标准曲线时的用量相同。

在生物强化研究中,为了监测投加到污染环境 中强化微生物的数量变化,一般要通过提取环境样品的 DNA,采用竞争 PCR 方法测定强化微生物降解 性功能基因片断的数量。

1.2.2 MPN-PCR

该方法是对样品进行系列稀释后,进行多次 PCR 扩增,每个稀释度一般重复扩增 3 次。扩增后 呈阳性反应的样品与用来计算目标 DNA 数量的 MPN 表进行对照,从而得出特异 DNA 片断的数量。MPN-PCR 方法的关键是要在 PCR 扩增前对样品

DNA 提取液进行系列稀释,稀释度主要参考已知的 对照稀释度来确定。

2 生物强化系统微生物群落结构组成及动态演替规律研究

现代分子生物技术极大地推动了生物强化系统 微生物分子生态学的研究和发展,使人们能够更准 确地了解向生物强化系统投加外源菌对菌群结构所 产生的影响,掌握微生物菌群动态演替规律,为生物 强化技术在实际污染治理中的应用提供有益指导。

2.1 基因指纹技术

基因指纹技术可提供微生物菌群基因的多态性 谱图。环境样品的微生物 DNA 提取物是不同微生 物的 DNA 混合物,经 PCR 扩增后,得到序列等长但 不同源的 DNA 片段的混合物。混合物中序列的多 样性和不同序列的丰度在一定程度上反映了原始样 品中微生物种群的多样性和不同物种的丰度。如果 可以将这些序列等长但不同源的 DNA 片段分离,则 可对样品中的微生物群落组成进行初步分析。用于 生物强化系统微生物菌群结构分析的基因指纹技术 主要有:限制性长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、PCR 变性梯度凝胶电 泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) /

温度梯度凝胶电泳 (temperature gradient gel electrophoresis, TGGE)、PCR 单链构象多态性 (single strand conformational polymorphism, SSCP) 等。

2.2.1 末端限制性片段多态性分析 T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism)

碱基的改变或染色体结构的变化会导致生物个体或种群之间 DNA 片断酶切位点的变化,用限制性内切酶切割会产生长短、种类、数目不同的 DNA 限制性片断。T-RFLP 就是对样品中的 DNA 采用 PCR 技术进行特异性扩增后,用特定的酶对其进行酶切,来检测末端限制片段的多态性。这种方法能够检测酶切位点因 DNA 插入、重排或缺失而造成的长度差异,具有较高的分辨率。它可以在群落水平上提供丰富的、反映基因多样性的可靠信息,广泛应用于微生物遗传多样性、菌群结构组成及其变化规律等研究中。

Cacilia Jemberg 等^[20]研究了加入 4 氯酚降解菌 *Arthrobacter chlorophenolicus* A6L 对氯酚污染土壤固有菌群结构的影响,采用荧光蛋白基因 *Luc* 对这株菌进行了染色体标记,同时对不同条件下的土壤微生物菌群结构用 T-RFLP 方法进行了分析。发现固有菌中一些菌对 4 氯酚及 4 氯酚降解菌的加入非常敏感,明显受到抑制或激励。含有 4 氯酚的土壤, *Arthrobacter chlorophenolicus* A6L 菌的丰度也明显高于对照系统。Lendvay 等^[21]采用 T-RFLP 方法对受到污染的含水层实施生物强化后的菌群结构变化进行了研究,发现强化后 5 周内系统均可检测到强化菌的存在,但未实施生物强化的对照系统,在 72 d 后也可检测到与强化菌相同的生物菌种的存在,说明含水层中也存在与强化菌相同的固有菌,在生物促效作用下能够被激活。

2.2.2 PCR-DGGE/TGGE

从环境样品中所提取的微生物 DNA 通常是多种微生物 DNA 的混合体,用 PCR 引物扩增得到的是等长但不同源的 DNA 混合物,一般的电泳方法往往很难将其分开。但同样大小的 DNA 序列由于含有的碱基不同,各片断的变性温度 T_m 和变性剂浓度也会有所不同。DGGE 和 TGGE 就是应用这种差异来区分不同的基因序列。DGGE 的原理是:在碱基序列上存在差异的不同 DNA 双链,其解链需要不同的变性剂浓度,通过在聚丙烯酰胺胶中添加线性梯度的变性剂 (一般是甲酰胺),形成从低到高的线性梯度,再将 PCR 扩增得到的 DNA 片段加入到变性剂梯度的凝胶中进行电泳,序列不同的 DNA 片段

就会最终停滞在其变性梯度的位置,从而达到分离效果。TGGE 则是在电泳中形成温度梯度,利用不同构象的分子具有不同的变性温度进行分离。DGGE 和 TGGE 方法还可以半定量地测定样品 DNA 浓度,反映微生物群落组成的变化。

Nico Boon 等^[22]研究了活性污泥反应器受到 3-氯胺 (3-chloroaniline, 简称 3-CA) 冲击时,加入 3-CA 降解菌 *Canamonas testosteroni* 2 gfp 对反应器硝化功能和有机物去除能力的影响。采用 DGGE 技术并结合 FISH 方法对 3-CA 冲击后的氨氧化菌数量及菌群结构变化进行了研究。发现没有加入高效菌的对照系统,受到 3-CA 冲击 2 d 后,氨开始累积,氨氧化菌数量急剧下降,硝化功能也永久性丧失。而加入 3-CA 降解菌的强化系统在 4 d 后恢复了硝化功能,氨氧化菌的菌群结构、活性和丰度也都得到有效恢复。说明在受到有毒有害物质冲击时,强化菌的加入有助于保持系统结构和功能的稳定性。

2.2.3 PCR-SSCP

单链 DNA 的碱基间的作用力使其呈现复杂的空间折叠构象,当构成 DNA 的碱基发生改变时,其空间构象也会发生一定的改变,空间构象有差异的单链 DNA 分子在聚丙烯酰胺中受排阻的大小不同,因此可通过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 非常敏锐地将构象上有差异的分子分离。这就是单链构象多态性分析的原理。这种方法能够有效检测 100 ~ 300 bp DNA 片断碱基点突变。其优点是操作简单、步骤少、检测所需时间短、成本低,不需要特殊仪器。但 SSCP 方法不能够确定变异位置,对于大于 300 bp 的 DNA 片断检测灵敏度会降低^[23]。由于 RNA 有着更加精细的二级和三级构象,且这些构象对单个碱基的突变也很敏感,不易结合成双链,可以较大量地进行电泳,故一部分研究人员转而利用 RNA 进行 SSCP 的分析。

Wenderoth 等^[24]对受氯苯污染的地下水进行了生物强化研究。强化菌为氯苯降解菌 *Pseudomonas putida* GJ31, *Pseudomonas aeruginosa* RHO1 和 *Pseudomonas putida* F1DCC。采用荧光原位杂交 (FISH) 方法对这些菌在微宇宙系统中的变化进行了跟踪检测,同时从环境样品的总 DNA 获取 16S rDNA,用 SSCP 方法分析了固有菌及强化菌的动态变化。发现 *P. aeruginosa* RHO1 不能够促进氯苯降解,但 *P. putida* GJ31 和 *P. putida* F1DCC 能够在固有菌群中存活并生长,并且促进氯苯的降解。当

氯苯类污染物消失后, *P. putida* GJ31 也随之消失, 而 *P. putida* F1DCC 菌可持续存在于系统中。

2.2 荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH)

传统的微生物培养方法对微生物的培养效率低, 时间长, 往往不能够及时、有效地提供生物强化系统微生物数量、形态、空间分布等重要信息。荧光原位杂交技术结合了分子生物学的精确性和显微镜的可视性, 能够在自然的微环境中快速监测和鉴定不同微生物个体, 同时对微生物群落进行评价。FISH 是目前单个细胞水平上分析微生物群落结构的常用的分子生态学方法。其原理是: 微生物细胞在固定材料上脱水后, 与带有荧光染料标记的寡核糖探针在一定温度下混合。与探针碱基对完全互补序列的 RNA 随即与探针发生杂交, 从而使该菌体在荧光显微镜下发出荧光。

探针的设计是 FISH 法应用的前提和关键。常用的寡核苷酸探针长度一般是 15 ~ 30 bp。探针的灵敏度可达到 10 ~ 20 个 mRNA 拷贝 / cell。除了用一种荧光染料对探针进行标记外, 还可用多种染料标记的探针同时测定多个靶序列, 这样可将多次繁琐的 FISH 实验和多种不同应用目的 FISH 实验一次完成。

Patureau 等^[25]采用好氧脱氮菌 *Microvirgula aerodenitrificans* 强化脱磷系统, 期望在脱磷的同时能够去除水中的氨氮, 研究中采用 FISH 方法, 对投加菌在系统中的变化情况进行了研究。Bouchez 等^[26]向硝化反应器内投加好氧反硝化菌 *Microvirgula aerodenitrificans*, 以期达到同时硝化反硝化。发现强化菌投加量较少时, 对氨的强化去除效果很短暂, 用 FISH 法对投加的反硝化菌进行了跟踪检测, 发现在原生动物体的体内有许多荧光标记的强化菌, 说明原生动物对强化菌具有较强的捕食作用。FISH 法还可以对生物强化系统生物膜表面微生物数量和种群的空间分布进行分析。

3 生物强化作用机制的分子生物学解析

虽然对生物强化技术的研究和应用已经有近 30 年的历史, 但对于生物强化的作用机制还缺乏明晰的认识。生物强化效果的发挥究竟是依靠强化菌的高效降解作用还是其所携带的可移动基因片断在固有菌中的水平转移和分配作用? 现代分子生物学的发展为回答这一问题提供了有力工具^[27, 28]。

有研究表明, 编码氯代苯甲酸降解的 *c/c* 基因片断在活性污泥系统中的传播有助提高系统抗 3CBA 负荷冲击能力^[28]。*P. putida* BN210 菌在染色体上携带有 *c/c* 基因, 当其投加到传统活性污泥膜生物反应器耦合系统时, *P. putida* BN210 菌在系统中的数量会急剧减少甚至消失, PCR-DGGE 分析表明, *c/c* 基因片断转移到系统其他微生物中, 形成了新的 3CBA 降解菌群。进一步的研究还表明, 以生物膜形式存在的微生物由于接触密切, 更利于基因片断的水平转移^[28]。对于污水处理系统主要依靠基因水平转移作用来实现生物强化的成功范例还比较少, 但在污染土壤生物修复过程中, 基因水平转移的发生比较普遍^[29, 30]。如 *Enterobacter agglomerans* DK3 菌携带质粒 RP4: Tn4371, 其中 Tn4371 是编码联苯降解的基因片断, 但该菌不能利用联苯为惟一碳源和能源^[27]。该菌投加到受联苯污染的土壤中后会很快消失, 但其所携带的质粒转移到土壤中其他微生物体内, 使这些微生物能够表达降解基因 *bph*。借助 PCR、DGGE、FISH、报告基因等分子生物学方法研究基因水平转移在生物强化中的作用, 深入揭示生物强化的作用机制, 可为生物强化途径的构建及在实际污染中的应用提供指导。

4 生物强化菌剂的基因工程构建

分子生物技术的发展, 拓展了生物强化系统高效菌剂的来源, 除了利用野生型微生物作为强化菌剂外, 也可以根据净化污染物的具体需求对野生型微生物进行基因工程改造, 构建多功能高效微生物。

对生物强化菌进行基因改造的目的主要有: (1) 拓宽强化微生物的底物利用范围; (2) 提高微生物对目标污染物的降解性能; (3) 提高微生物抗有毒有害物质冲击性能; (4) 改善微生物的絮凝沉降性, 提高其在强化系统中的保持能力; (5) 改善微生物的表面性能, 增强强化系统的生物可给性; (6) 维持低浓度下微生物的代谢活性。

利用基因工程构建新型、高效的强化微生物, 为生物强化技术的发展开创了崭新领域。如 *Burkholderia cepacia* G4 菌通常要芳香族化合物存在条件下才能够共代谢三氯乙烯 (TCE), 但通过 Tn5 插入产生 *Burkholderia cepacia* G4 5223-PR1 菌, 它能够从结构上表达降解 TCE 的邻甲苯单氧合酶, 在没有诱导物 (如芳香族化合物) 的情况下也可降解 TCE^[31]。将编码甲苯加双氧酶的 *td* 基因克隆到 *Deinococcus*

*radiodurans*中后,这种菌能够降解甲苯、氯苯、3,4-二氯-1-丁烯和吡啶。这种菌已经成功应用到放射性和有机溶剂混合废弃物的生物修复中^[32]。

目前,应用基因工程菌进行污染水体和土壤生物强化的研究多数还局限于实验室,出于安全考虑,各国政府严格限制将基因工程菌用于实际污染源的治理。相信随着分子生物学的发展,人类对基因工程菌环境迁移和变化规律的认知,以及科学控制方法的把握,基因工程菌有望在生物强化技术应用中发挥其特有的作用。

5 生物强化系统微生物的安全释放及控制技术

向生物强化系统投加外源微生物,特别是基因工程菌,可能会对原来的生态系统产生一定影响。为了保证强化系统的生态安全,有必要采取适当的措施对强化菌进行控制,限制或阻止其在受纳环境中产生不必要的扩散^[33]。

目前,生物强化系统强化菌安全释放和控制机制主要有 2 种^[34]。

一种办法是采用“自杀”机制,即通过对强化微生物进行基因工程改造,在其体内插入“自杀基因”。当强化微生物分解的目标基质不存在时,“自杀基因”被诱导,系统中的强化微生物被去除。如通过控制编码链霉抗生素的基因来控制所投加的强化菌。在生长基质存在时,链霉抗生素基因受到抑制;当生长基质消失时,链霉抗生素基因得以表达,产生链霉抗生素,其与维生素 D 结合可杀死投加的强化微生物^[35]。

另外一种控制强化微生物基因扩散的方法是引入一种基因,在基因扩散过程,引入基因的产物能够杀死那些不具有免疫性的受体细胞,这种引入基因称为“灭活”基因。如图 1 所示 *E. coli* *gef* 基因编码的蛋白和调控途径能够控制基因的扩散^[36, 37]。*gef* 基因受控于 *lac* 启动子,而 *lac* 启动子的阻遏物 *lacI* 则在间位分解途径启动子的控制下。当间-甲基苯甲酸存在时,其作为 *xyIS* 的效应物,使 *gef* 基因的表达受到抑制。而当基质消失后, *gef* 的表达不再受到抑制,宿主细胞被灭活。

6 结束语

现代分子生物技术的发展为生物强化技术的研究提供了强有力的工具。可使人类更加深入认识生

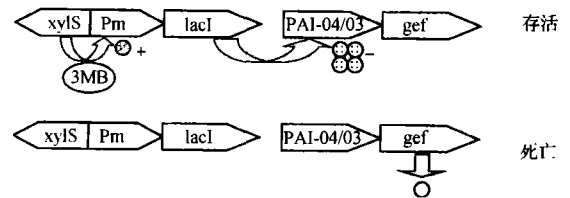


图 1 “灭活基因”的作用机制

Fig 1 The mechanism of killing gene

物强化作用机制,了解和掌握强化系统微生物数量及菌群结构的动态演变规律及其与强化效果的关系,摒弃以往生物强化应用中的盲目性和被动性,更加主动、科学、有效地将生物强化运用到环境污染治理中。

参考文献

- [1] Rittmann B. E. and Whitman R. Bioaugmentation: A coming of age Water Quality International, **1994**, 1: 12 ~ 16
- [2] Boon N., Goris J., de Vos P., et al Bioaugmentation of activated sludge by an indigenous 3-chloroaniline-degrading *Cananonas testosterone* strain Dgfp. Appl. Environ. Microbiol., **2000**, 66 (7): 2906 ~ 13
- [3] 全向春,刘佐才,范广裕,韩力平. 生物强化技术及其在废水治理中的应用. 环境科学研究, **1999**, 12 (3): 22 ~ 27
- [4] Huban C.M. and Plowman R.D. Bioaugmentation: Put microbes to work Chemical Engineering, **1997**, 104 (3): 74 ~ 84
- [5] Jansson J. K., Björklöf K., Elvang A.M., et al Biomarker for monitoring efficacy of bioremediation by microbial inoculants Environmental Pollution, **2000**, 107 (2): 217 ~ 223
- [6] Rattray EAS, Prosser J. I., Killham K., et al Luminescence-based nonextractive technique for in situ detection of *Escherichia coli* in soil Appl Environ Microbiol, **1990**, 56: 3368 ~ 3374
- [7] Möller A., Jansson J.K Detection of firefly luciferase-tagged bacteria in environmental samples In La Rossa R. (Ed). Methods in Molecular Biology 1998, Vol 102: Boluminescence Methods and Protocols Humana Press, Totowa, NJ. 269 ~ 283
- [8] Masson L., Comeau Y., Brousseau R., et al Construction and application of chromosomally integrated *lac-lux* gene markers to monitor the fate of a 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading bacterium in contaminated soils Microbiol Releases, **1993**, 1: 209 ~ 216
- [9] Unge A., Tombolini R., Davey M. E., et al GFP as a marker gene In: Akkermans A.D.L., van Elsas J.D., de Bruijn F. J. (Eds). Molecular Microbial Ecology Manual Kluwer, Dordrecht The Netherlands Vol 6. 1. 13: 1 ~ 16
- [10] Tombolini R., Unge A., Davey M. E., et al Flow cytometric and microscopic analyses of GFP-tagged *Pseudomonas fluorescens* FEMS Microbiology Ecology, **1997**, 22 (1): 17 ~ 28
- [11] Tress O., Errampalli D., Kostrzynska M., et al Green fluorescent protein as a visual marker in a p-nitrophenol

- degrading *Moraxella* sp. FEMS Microbiol Lett, **1998**, 164(1): 187 ~ 193
- [12] Errampalli D.M., Okamura H., Lee H., et al Green fluorescent protein as a marker to monitor survival of contaminated soil FEMS Microbiol Ecol, **1998**, 26(2): 181 ~ 191
- [13] Elsas J.D. van, Mantynen V., Wolters A.C. Soil DNA extraction and assessment of the fate of *Mycobacterium chlorophenolicum* strain PCP-1 in different soils by 16S ribosomal RNA gene sequence based most probable-number PCR and immunofluorescence Biol Fertil Soil, **1997**, 24: 188 ~ 195
- [14] Levesque M.J., La-Boissiere S., Thomas J.C., et al Rapid method for detecting *Desulfitobacterium frappiri* strain PCP-1 in soil by the polymerase chain reaction. Appl Microbiol Biotechnol, **1997**, 47: 719 ~ 725
- [15] Ka J.O., Yu Z. and Mohn W.W. Monitoring the size and metabolic activity of the bacterial community during biostimulation of fuel-contaminated soil using competitive PCR and RT-PCR. Microbiol Ecology, **2001**, 42(3): 267 ~ 273
- [16] Hallier Soulier S., Ducrocq V., Mazure N., et al. Detection and quantification of degradative genes in soils contaminated by toluene FEMS Microbiol Ecol, **1996**, 20(2): 121 ~ 133
- [17] Selvaratnam S., Schoedel B.A., McFarland B.L., et al Application of the polymerase chain reaction (PCR) and reverse transcriptase/PCR for determining the fate of phenol-degrading *Pseudomonas putida* ATCC 11172 in a bio-augmented sequence batch reactor Appl Environ Microbiol, **1997**, 63(12): 4708 ~ 4716
- [18] Tchelet R., Meckenstock R., Steinle P., et al Population dynamics of an introduced bacterium degrading chlorinated benzenes in a soil column and in sewage sludge Biodegradation, **1999**, 10(2): 113 ~ 125
- [19] Widad J., Nojiri H., Kasuga K., et al Quantification of carbazole 1,9a-dioxygenase gene by real-time competitive PCR combined with co-extraction of internal standards FEMS Microbiol Lett, **2001**, 202(1): 51 ~ 57
- [20] Cecilia Jemberg and Janet K Jansson Impact of 4-chlorophenol contamination and/or inoculation with the 4-chlorophenol-degrading strain, *Athrobacter chlorophenolicus* A6L, on soil bacterial community structure FEMS Microbiology Ecology, **2002**, 42(3): 387 ~ 397
- [21] Lendvay J.M., Löffler F.E., Dollhopf M., et al Bioreactive barriers: A comparison of bioaugmentation and biostimulation for chlorinated solvent remediation Environ Sci Technol, **2003**, 37: 1422 ~ 1431
- [22] Nico Boon, Eva M. Top, Willy Verstraete and Steven D. Siciliano Bioaugmentation as a tool to protect the structure and function of an activated sludge microbial community against a 3-chloroaniline shock load Applied and Environmental Microbiology, **2003**, 69(3): 1511 ~ 1520
- [23] 王爱杰, 任南琪等编著. 环境中的分子生物序诊断技术. 北京: 化学工业出版社, **2004**
- [24] D. F. Wenderoth, P. Rosenbrock, W.R. Abraham, et al Bacterial community dynamics during biostimulation and bioaugmentation experiments aiming at chlorobenzene degradation in groundwater Microbial Ecology, **2003**, 46(2): 161 ~ 176
- [25] Patureau D., Helboin E., Rustrian M.E., et al Combined phosphate and nitrogen removal in a sequencing batch reactor using the aerobic denitrifier, *Microvirgula aerodenitrificans* Wat Res., **2001**, 35(1): 189 ~ 197
- [26] Bouchez T., Patureau D., Wagner M., et al Successful and unsuccessful bioaugmentation experiments monitored by fluorescent in situ hybridization Wat Sci Tech, **2000**, 41(12): 61 ~ 68
- [27] De Rore H., Demolder K., De Wilde K., et al Transfer of the catabolic plasmid RP4::Tn4371 to indigenous soil bacteria and its effect on respiration and biphenyl breakdown FEMS Microbiol Ecol, **1994**, 15: 71 ~ 81
- [28] Eva M. Top, Dirk Springael and Nico Boon Catabolic mobile genetic elements and their potential use in bioaugmentation of polluted soils and waters FEMS Microbiol Ecol, **2002**, 42(2): 199 ~ 208
- [29] Ghyoot W., Springael D., Dong Q., et al Bioaugmentation with clc-element carrying *Pseudomonas putida* BN210 in a membrane separation bioreactor Water Science and Technology, **2000**, 41(10 ~ 11): 279 ~ 286
- [30] Newby D. T., Gentry T.J. and Pepper I.L. Comparison of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid degradation and plasmid transfer in soil resulting from bioaugmentation with two different pJP4 donors Appl Environ Microbiol, **2000**, 66(8): 3399 ~ 3407
- [31] Winkler J. and Timmis K.N. Tracking the response of burkholderia-cepacia G4-5223 prl in aquifer microcosms Applied and Environmental Microbiology, **1995**, 61(2): 448
- [32] Lange C.C., Wackett L.P., Minton K.W., et al Engineering a recombinant *Deinococcus radiodurans* for organopollutant degrading in radioactive mixed waste environments Nat Biotechnol, **1998**, 16: 929 ~ 933
- [33] Springael D., Peys K., Ryngaert A., et al Community shifts in seeded 3-chlorobenzoate degrading membrane biofilm reactor: Indications for involvement of in situ horizontal transfer of the clc-element from inoculum to contaminant bacteria Environ Microbiol, **2002**, 4(2): 70 ~ 80
- [34] Ronchel M.C., Molina L., Witte A., et al Characterization of cell lysis in *Pseudomonas putida* induced upon expression of heterologous killing gene Appl Environ Microbiol, **1998**, 64(12): 4904 ~ 4911
- [35] Szafranski P., Mello C.M., Sano T., et al A new approach for containment of microorganisms: Dual control of streptavidin expression by antisense RNA and the T7 transcription system. Proc Natl Acad Sci USA, **1997**, 94: 1059 ~ 1063
- [36] Molina L., Ramos C., Ronchel M.C., et al Construction of an efficient biologically contained *Pseudomonas putida* strain and its survival in outdoor assays Appl Environ Microbiol, **1998**, 64(6): 2072 ~ 2078
- [37] Widad J., Nojiri H. and Omori T. Recent developments in molecular techniques for identification and monitoring of xenobiotic-degrading bacteria and their catabolic genes in bioremediation Appl Environ Biotechnol, **2002**, 60(1 ~ 2): 45 ~ 59