

# 高效工程菌的构建及其降解有机农药的研究进展

## Construction of the Effective Engineering Bacteria and the Research Progress in Its Degradation of Organic Pesticide

叶国青<sup>1</sup> 唐文伟<sup>2</sup> 曾新平<sup>1</sup>

(1. 同济大学生命科学与技术学院 上海 200092); (2. 同济大学化学系 上海 200092)

**摘要** 综述了目前环境治理保护中构建高效工程菌常用的质粒转移、原生质体融合和基因重组等方法。介绍了工程菌在处理有机农药污染方面的降解性能及其固定化研究,并简要阐述了工程菌改造及应用方面所存在的问题及未来的研究展望。

**关键词** 工程菌 质粒转移 原生质体融合 基因重组 有机农药

**Abstract** This article summarizes the construction methods of the effective engineering bacteria in the governance and protection of the environment: plasmid transfer, protoplast fusion and gene recombination, etc. The performance of the engineering bacteria and its immobilized cell in the degradation of the organic pesticides is introduced. Problems in the construction and application, and the research progress are discussed.

**Key words** Engineering Bacteria Plasmid Transfer Protoplast Fusion Gene Recombination Organic Pesticide

农药在为农业生产提供高效杀虫、除草等性能的同时,也带来了严重的环境污染。部分人工合成有机化合物需要不同降解菌之间的协同代谢或共代谢等复杂机制才能最终得以降解。如何将分属于不同菌体中的污染物代谢途径组合起来,构建具有特殊降解功能的工程菌,有效地提高农药有机物的生物降解能力,是目前环境微生物领域的研究前沿和热点。

### 1 构建工程菌的方法

现代生物技术用于构建工程菌的方法有诱变育种、质粒转移、原生质体融合和基因重组等,这些方法各有其使用范围和优缺点。诱变育种因筛选过程繁琐,突变具有不确定性,一般多与其他方法联用。目前研究热点主要集中于质粒转移、原生质体融合和基因重组<sup>[1,2]</sup>。

#### 1.1 降解性质粒转移

质粒是独立于染色体外能自主复制的 DNA 分子,当细胞处于某些特殊环境时,其对环境中特异

性限制因子的应答能力一般由质粒控制。携带着难降解有机物降解基因的质粒被称为降解性质粒。将不同细胞的降解性质粒转移到一个受体细胞中,构建多质粒菌株,可以使一种微生物降解多种污染物或能完成降解过程中的多个环节。Song 等<sup>[3]</sup>分离到一株以 1,2,4-三氯苯(TCB)为唯一碳源的施氏假单胞菌株 THSL-1,将其降解质粒 pTHSL-1 转化 E. coli JM109,转化子不仅繁殖快,而且能高效降解土壤中残留的 1,2,4-TCB。

#### 1.2 原生质体融合

亦称细胞融合,是将双亲株细胞在酶的作用下脱去细胞壁,形成原生质体,在高渗和助融条件下混合,通过细胞质融合、核融合,使基因组得到重组,随后再生出细胞壁来,获得重组子的过程<sup>[4]</sup>。原生质体融合步骤包括<sup>[5]</sup>:①标记菌株的筛选和稳定性验证;②原生质体制备;③原生质体融合;④原生质体再生;⑤融合子验证、分离。与分子克隆相比,投资省,易操作,能快速组建新菌株。常用的促融技术<sup>[6]</sup>主要有仙台病毒诱导、聚

乙二醇诱导、电场诱导及激光诱导。Wang等<sup>[7]</sup>发现,采用不同强度、不同时间的紫外线照射原生质体,有利于融合子中亲本优势性状的增强。

### 1.3 基因重组

亦称重组DNA技术,其主要过程有:①通过酶切消化,从供体细胞基因组中分离出目的性状的基因片段;②将外源DNA片段在体外通过连接酶连接到自我复制的、并具有选择记号的载体分子上,形成重组质粒分子;③将重组质粒分子转移到适当的受体细胞中,使之在新的遗传背景下实现新的功能。Walker等<sup>[8]</sup>通过基因克隆构造了一株同时表达有机磷水解酶(OPH)和对硝基苯酚(PNP)降解酶的工程菌。Liu等<sup>[9]</sup>把含有甲基对硫磷水解酶基因mpd导入吡喃丹的降解菌CDS-1,构建的基因工程菌CDS-pBBR-mpd对甲基对硫磷的降解能力提高了6.75倍。

基因重组能大幅度提高降解酶活性,打破物种界限,加快变异速度,能定向选育、定向制备降解能力极高的工程菌株,其应用标志着现代遗传学已发展到能定向获得遗传性状的新阶段。

## 2 工程菌在降解有机农药污染物方面的应用

### 2.1 工程菌的降解性研究

有机农药污染主要由有机磷、有机氮和有机氯等造成。虽自然环境中某些细菌、真菌、放线菌和藻类等均对有机农药具有降解作用,但直接从环境中筛选降解菌,费时费力,且在环境中受土著菌的影响较难成为优势菌<sup>[10]</sup>。近年来,随着生物工程技术的发展,构建降解能力强、底物广泛及功能稳定的工程菌是目前研究的重点。

在有机磷降解方面,Wang等<sup>[11]</sup>筛选出一株能高效降解甲基对硫磷(MP)的细菌HS-D36,在以MP为唯一碳源的无机盐培养基上可以耐受800mg/L的MP,在LB培养基上可耐受2000mg/L的MP;同时克隆了甲基对硫磷水解酶基因mpd,并在E. coli中获得高效表达,重组甲基对硫磷水解酶粗酶液活性达到52.5U/mL。张丽青等<sup>[12]</sup>将抗性库蚊解毒酶酯酶B1(能有效水解有机磷、有机氯、氨基甲酸酯、拟除虫菊酯等四大类农药)基因片段引入融合表达载体pThioHisA中,转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 。工程菌DH5 $\alpha$ /pThioHisA-B1对甲基对硫磷能够快速降解,在2h内降解率达81%。

阿特拉津是一种广泛使用的有机氮除草剂。李颖<sup>[13]</sup>以模式菌株假单胞菌ADP为供体,通过质粒转移,培育并筛选出两株高效、快速降解阿特拉津的菌株AD3和AD25。它们能以阿特拉津为唯一氮源生长,降解速率和降解率都远高于ADP菌株,能将培养基中500mg/L的阿特拉津在72h内降解95%以上。崔俊涛等<sup>[14]</sup>以阿特拉津降解菌青霉(P-02-07)的灭活原生质体为供体,以黑曲霉(A-02-10)为受体,利用原生质体融合技术得到融合子A1,可使土壤中阿特拉津降解的半衰期由30d缩短为10d。此外,Liuchun等<sup>[15,16]</sup>还研究发现,基因工程菌在MBR工艺中对阿特拉津具有很好的生物强化处理效果,阿特拉津平均出水浓度为0.84mg/L,平均去除率为95%。

因有机农药用量大、品种多、成分复杂,研究能降解多种有机农药的多功能工程菌也是热点之一。蒋建东等<sup>[17-19]</sup>用同源重组方法将甲基对硫磷水解酶基因mpd整合到吡喃丹降解菌CDS-1染色体的16SrDNA位点,构建得到的工程菌mpd-CDS-1在土壤中对甲基对硫磷在4d、11d和30d的降解率分别为89.82%、97.79%和100%,对吡喃丹的降解率分别为21.92%、39.94%和100%。最近,Lu等<sup>[20]</sup>通过转座子介导同源重组法,将mpd导入到六六六降解菌BHC-A的染色体上,构建了能同时降解六六六和甲基对硫磷的工程菌BHC-A-mpd,且其对杀螟硫磷的降解率为99.5%,对对硫磷的降解率为88.5%,表达出有活性的底物广谱性有机磷水解酶,能降解多种有机磷农药;在遗传稳定性方面也优于以质粒为载体构建的基因工程菌。

Wu等<sup>[21]</sup>以多菌灵高效降解菌株DJL-6为受体,通过PCR从六六六降解菌BHC-A扩增出完整的脱氯化氢酶基因linA,克隆到含有mini-Tn5的自杀性质粒pUT4K上,再通过三亲杂交,得到工程菌株DJL-6A,具有同时降解多菌灵和六六六的功能。

### 2.2 工程菌固定化方面的研究

为提高工程菌的实际应用价值,防止其在使用中流失而导致去除效果下降,人们对工程菌的固定化进行了研究<sup>[22-25]</sup>。Wei等<sup>[23]</sup>用固定化工程菌与传统活性污泥法串联工艺,实现了对高浓度高负荷阿特拉津废水的生物强化处理,没有出现工程菌大量流失的现象,在固定化颗粒表面及浅层均观察到大量菌体,颗粒表面还出现了生物

膜和菌胶团。张丽青等<sup>[12]</sup>研究酯酶 B1 基因在大肠杆菌中的融合高效表达并进行固定化,结果表明固定化工程菌株对有机磷农药有高效降解能力。谢珊等<sup>[24]</sup>采用 PVA 胶体法<sup>[25]</sup>将工程菌 BL21 固定,对比研究其与悬浮状态对混合农药废水的处理效果,发现虽然固定化工程菌的降解效率比悬浮工程菌略低,但其稳定性较好,能较长时间保持降解活性,且固定化工程菌更适宜于实际废水处理 and 大规模应用。

### 3 存在问题及展望

虽然工程菌在降解有机农药污染物方面显示出极大优越性,但由于构建方面的技术问题和应用中的生态安全性等问题,将研究成果用于实际工程还很有限。

构建技术问题主要有:①质粒转移时,其排斥性会造成某些质粒无法组合于同一细胞内;质粒的活性易被外界干扰所消除,过多的质粒将使细胞生长能力降低;质粒所编码的功能并不唯一,有可能转移有害的性状。②原生质体融合的局限性在于,难于找到便于检测的遗传标记,融合后染色体的重组是随机的,种属间细胞对异源 DNA 的限制和染色体 DNA 的非同源性障碍。③基因重组最大的难点是种的壁垒问题,即有些外源性降解基因在其他微生物中表达时,大多数呈现出活性减弱现象<sup>[26]</sup>。

在工程菌应用方面,随着技术研究、开发工作及生物产业的迅猛发展,生物安全问题日益成为各国政府、学术界以及社会公众的关注焦点。比如基因可以随着技术的发展和人类的应用而产生流动,这种“基因流”就可能带来“遗传污染”;基因工程菌不是自然界原有的物种,其某项功能被人增强后在环境中有可能造成巨大的生态灾难。

为促进高效工程菌降解农药技术的推广,未来的研究重点应集中于以下几个方面<sup>[27]</sup>:①通过多途径多方法分离和筛选具有高效降解有机农药特性的菌株,建立高效降解菌的基因库;②利用基因工程技术定向选育遗传工程菌株并构建高效农药工程菌,拓宽降解谱,提高降解能力;③加快有机农药降解酶的酶学研究,采用固定化酶方法或生物酶反应器用于有机农药的降解。

### 4 结束语

治理环境污染的高效工程菌的应用虽然起步较晚,但具有广阔的发展前景。从微生物降解菌株的筛选,到细胞水平的原生质体融合,再到基因工程的 DNA 重组等技术构建高效工程菌,人们已从利用微生物发展到改造微生物来为人类服务。但我们在看到它巨大发展潜力的同时,也不能忽视其安全管理,只有这样才能使工程菌安全、高效地为广大人类造福。

### 参考文献

- 郭杨,王世和.基因工程菌在重金属及难降解废水处理中的应用[J].安全环境与工程,2007,14(4):57-61.
- 王颖,郑旭熙,於焱,等.现代生物技术与环境工程中的应用[J].重庆工商大学学报(自然科学版),2007,24(1):46-50.
- Song L, Wang H, Shi H C, et al. Isolation of a *Pseudomonas Stutzeri* strain that degrades 1,2,4-trichlorobenzene and characterization of its degradative plasmid[J]. *Frontiers of Environmental Science and Engineering in China*, 2008, 2(1):69-72.
- 李保华.细胞融合技术研究进展[J].安徽农业科学,2008,36(15):6187-6188,6207.
- Muralidhar R V, Panda T. Fungal protoplast fusion - a revisit[J]. *Bioprocess Engineering*, 2000, 22(5):429-431.
- 赵志强,郑小林,张思杰,等.细胞融合技术[J].生物学通报,2005,40(10):40-41.
- Wang M Q, Xia G M, Peng Z Y. High UV-tolerance with introgression hybrid formation of *Bupleurum scorzoniferolium* Willd[J]. *Plant Science*, 2005, 168(3):593-600.
- Walker A W, Keasling J D, et al. Metabolic engineering of *Pseudomonas putida* for the utilization of parathion as a carbon and energy source[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2002, 78(7):715-721.
- Liu Z, Hong Q, Xu J H, et al. Construction of a genetically engineered microorganism for degrading organophosphate and carbamate pesticides[J]. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2006, 58(2):65-69.
- 梁伊丽,曾富华,卢向阳.有机磷农药的微生物降解研究进展[J].微生物学杂志,2004,24(6):51-55.
- Wang B B, Xiong L, Zheng Y L, et al. Cloning and expression of the *mpd* gene from a newly isolated methylparathion-degrading strain of bacteria[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2008, 28(10):1969-1975.
- 张丽青,姜红霞,闫艳春,等.工程菌及其固定化细胞对有机磷农药的降解[J].环境科学与技术,2008,31(5):45-48.
- 李颖.通过质粒分子育种培育高效降解除草剂阿特拉津的细菌菌株[D].南开大学,2007.
- 崔俊涛,张伟,曹天舒.阿特拉津降解融合子的原生质体制备及其筛选[J].农业环境科学学报,2008,27(6):2269-2273.

(下转第 53 页)

的非相关性,并且作为专业的监测单位,技术和设备更为专业,因此所提供的监测数据更为客观、真实和专业。

(2)第三方为流域环境管理机构提供民意调查服务。流域环境管理机构在制定相关政策、法规、条例、标准和流域规划时,根据国家相关法律的要求,需公告公示,实行公众参与,尊重民意。由于流域环境管理机构本身作为政策的制定者,在进行民意调查时难免有公众主观性质的导向,导致调查结果的失真。而第三方提供的调查服务,则由于其独立性,可以消除主观导向,并更容易为公众信任,从而获得最真实客观的民意调查结果,为流域管理机构提供决策依据。

(3)第三方为流域环境管理机构提供投资服务。在流域管理中,水污染治理是必不可少的管理措施,例如污水处理厂的建设与运营,其巨大费用无疑增大了流域环境管理机构的财政负担,而流域中不同的行政单位出于利益考虑,不愿承担该费用。目前国际上最广为使用的 BOT 融资方式,为第三方投资流域治理设施提供了有效可行的运作模式。第三方对治理设施的投资,不但解决了资金来源,减轻了地方政府与流域管理机构的财政负担,而且由于流域管理机构的监督作用,治理设施的质量及正常运营得到了保证,有效治理流域水污染。

#### 4.2 第三方服务对我国跨流域监管的意义

基于第三方服务的流域环境管理机构,不但要有效维护第三方在运营中的法律地位、利益独立地位,更要善于有效利用第三方提供的服务,打破行政区域的分割,完善流域管理机制。一个完善的流域环境管理机构,需要建立事故发生通报机制、监测结果互通机制、协调处置机制、共同监测机制、事故调查情况互

通机制、联合后督察机制、环境风险预警机制。在流域环境监测中引入第三方服务,当发生不明原因的跨流域、区域,环境污染事故或出现水质异常时,第三方服务单位在协商之后可以在省区跨界水质监测断面取样、分析和监测,并及时将事故基本情况告知受影响省(自治区)同级环保部门,以及流域中其他受影响地方的环保部门(省区级)及水利管理机构,以便提早采取防治措施,有利于建立事故发生通报机制、监测结果互通机制、共同监测机制和协调处置机制。

#### 5 结论与建议

在我国现行的流域环境管理体制中引进第三方服务,有效解决了流域管理过程中被行政区域割裂的问题,提高了流域环境管理机构的工作效率,通过利益协调机制使流域中不同地区达到“双赢”效果,较好的解决了流域跨界水污染纠纷问题。

在实际的运行过程中,流域环境管理机构需要明确自身的职责、职能,赋予第三方服务单位清晰明确的服务功能,并保证流域环境管理机构、地方水利部门、地方环保局等政府单位与第三方服务单位之间的利益独立性。

#### 参考文献

1. 陈湘满. 中国流域开发治理的管理与调控研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2001: 63 - 64.
2. 朱伟俊. 第三方开放式管理系统研究[J]. 商业经济, 2006(18): 16 - 17.
3. Dennis W, Chwen Sheu. A model for reverse logistics entry by third-party providers[J]. The International Journal of Management Science, 2002(30): 325 - 333.
4. 沈大军, 王浩, 蒋云钟. 流域管理机构: 国际比较分析及对我国的建议[J]. 自然资源学报, 2004, 19(1): 86 - 95.
21. Wu J, Xu J L, Hong Q, et al. Construction of a genetically engineered and stable strain of degrading  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane and carbendazim by transposon mini-Tn5[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(1): 45 - 50.
22. 何延青, 刘俊良, 张立勇, 等. 工程菌生物强化处理高浓度农药废水的试验研究[J]. 环境科学与技术, 2008, 31(11): 116 - 119.
23. Wei M J, Wang H, Liu C, et al. Bioaugmentation with immobilized genetically engineered microorganism (GEM)/CAS process for treatment of atrazine wastewater[J]. Environmental Science, 2008, 29(6): 1555 - 1560.
24. 谢珊, 刘俊新, 李琳, 等. 利用基因工程菌 BL21 处理有机磷混合农药废水的研究[J]. 环境工程学报, 2008, 2(7): 869 - 874.
25. Gilbert E S, Walker A W, Keasling J D. A constructed microbial consortium for biodegradation of the organophosphorus insecticide parathion[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 61(1): 77 - 81.
26. 高瑞英, 王玉生, 卢桂宁, 等. 土壤有机农药污染微生物修复及降解菌基因工程研究进展[J]. 甘蔗糖业, 2007(4): 12 - 17.
27. 王晓辉, 杜利平, 赵丽霞. 有机磷农药生物降解研究进展[J]. 河北工业科技, 2008, 25(6): 405 - 409.

(上接第 33 页)

15. 刘春, 黄霞, 孙炜, 等. 基因工程菌生物强化 MBR 工艺处理阿特拉津试验研究[J]. 环境科学, 2008, 28(2): 417 - 421.
16. Liu C, Huang X, Wang H. Start-up of a membrane bioreactor bioaugmented with genetically engineered microorganism for enhanced treatment of atrazine containing wastewater[J]. Desalination, 2008, 231(1 - 3): 12 - 19.
17. 蒋建东, 顾立峰, 孙纪全, 等. 同源重组法构建多功能农药降解基因工程菌研究[J]. 生物工程学报, 2005, 21(6): 884 - 891.
18. 蒋建东, 李荣, 郭新强, 等. 多功能农药降解基因工程菌株 m-CDS-1 环境释放安全评价[J]. 微生物学报, 2008, 48(11): 1479 - 1485.
19. Jiang J D, Zhang R F, Li R, et al. Simultaneous biodegradation of methyl parathion and carbofuran by a genetically engineered microorganism constructed by mini-Tn5 transposon[J]. Biodegradation, 2007, 18(4): 403 - 412.
20. Lu P, Hong Y F, Hong Q. Construction of a stable genetically engineered microorganism for degrading HCH and methyl parathion and its characteristics[J]. Environmental Science, 2008, 29(7): 1973 - 1976.