

耐辐射基因工程菌 *Deinococcus radiodurans* 及其 在环境修复中的应用

王建龙

(清华大学核能与新能源技术研究院 北京 100084)

摘要 耐辐射球菌 (*Deinococcus radiodurans*) 是一种革兰氏阳性微球菌, 非致病菌, 可以应用于放射性核素污染环境的生物修复。由于一般的微生物对辐射非常敏感, 因此不能用于既存在放射性核素, 又存在有机污染物的复合污染场所。利用物理化学方法清除这类污染, 其价格非常昂贵。利用微生物修复这类环境是一种具有活力的替代技术。基因工程手段可以解除微生物固有的一些物理、化学和生理方面的限制。在辐射成为限制微生物生存和发挥其功能的情况下, 利用基因改造的 *Deinococcus radiodurans* 进行环境修复是一种具有实用潜力的手段。

关键词 耐辐射球菌, 基因工程菌, 放射性污染, 复合污染, 生物修复, 环境生物技术

中图分类号 Q937

核工业和核试验产生的大量放射性废物, 可能导致严重的环境污染。据报道, 美国在 1945 年至 1986 年期间, 由于国家安全问题至上而忽视了环境问题, 生产核武器产生的大量放射性废物未经处置直接排入地下。这些废物中既含无机污染物, 又含有毒性有机污染物, 包含放射性核素、重金属、酸/碱以及各种溶剂, 构成了严重的复合污染, 使这类环境的修复非常困难^[1]。在美国, 地下埋葬的放射性废物 ($3 \times 10^6 \text{ m}^3$) 污染了约 $7 \times 10^7 \text{ m}^3$ 的地表土壤、 $3 \times 10^{12} \text{ dm}^3$ 的地下水^[2]。在前苏联, 环境核污染问题更加严重^[3]。随着冷战的结束, 在 20 世纪 90 年代初期, 美国能源部 (DOE) 将其工作重点从核武器生产转向了核废物污染环境的修复。

1992 年, 美国能源部在 18 个受核研究设施污染的 3000 个场所中调查了 91 个污染点。结果发现, 在地下和地下水中最常见的污染物包括: 放射性核素 ^{235}U (γ , α)、 ^{238}Pu (α)、 ^{99}Tc (β^-)、 ^{90}Sr (β^-)、 ^{137}Cs (γ , β^-); 金属 Cr、Pb、Hg 以及大量的有毒有机污染物, 如甲苯、三氯乙烯^[1]。在所调查的 91 个污染点中, 1/3 的场所具有放射性。据报道, 在污染源内或接近污染源的地方, 其辐射水平高达 10 mCi/L ($3.7 \times 10^8 \text{ Bq/L}$)^[1]。

1 复合污染环境的修复

这类环境既存在放射性核素, 又存在有机污染物, 是典型的复合污染场所。这些高辐射水平以及有毒有害化学物质会严重损害生物, 并导致细胞死

亡。因此, 对于这类污染环境, 大多利用物理化学方法进行修复, 但其价格非常昂贵。近年来的研究表明, 大量的微生物, 包括 *Shewanella* 和 *Pseudomonas* spp., 可以对一系列金属和有机污染物进行转化、脱毒和固定。这些微生物得到了深入的研究^[4-11]。与大多数微生物一样, 这些微生物对辐射损伤效应敏感^[12], 因此, 它们只能用于辐射水平非常低的环境的修复。从自然界中寻找或通过基因工程手段构建具有耐辐射特性的微生物可以有效地解决这个问题。

到目前为止, 高放射性废物场所的微生物生态还没有得到很好的研究, 或许自然界通过天然选择已经产生了适合于这些场所的微生物。耐辐射微生物很容易分离到。一个简单有效的方法是利用营养丰富的固体培养基在低剂量 γ 辐射 (60 Gy/h) 条件下进行培养。利用这种方法人们分离出了许多新的耐辐射微生物。报道的大多数耐辐射微生物可以形成孢子, 当它们在处于营养生长时, 耐辐射性并不强。这些微生物大多是病原菌并且缺少进行遗传操作的发育系统^[12,13]。少数营养型细菌, 如 *Enterococcus faecium* 和 *Alcaligenes* spp., 对辐射具有很强的耐性, 但由于它们是病原菌, 所以不适合用于环境生物修复。

2 耐辐射菌 *Deinococcus radiodurans*

属于 *Deinococcaceae* 家族的细菌是非常奇特的^[14,15]。它们不仅具有耐辐射性, 而且是营养型的,

国家自然科学基金 (50278045) 和清华大学基础研究基金 (JC2002054) 资助

第一作者: 王建龙, 男, 1964 年 1 月出生, 1993 年在哈尔滨工业大学获博士学位, 环境工程专业, 现为清华大学教授, 博士生导师

收稿日期: 初稿 2003-12-25, 修回 2004-02-23

容易培养,为非病原菌。尽管 *Deinococcaceae* 分布广泛,起源非常早,但是,到目前为止,只有几个种得到了较好的研究^[15,16]。在这些属中,仅对 *Deinococcus radiodurans* 的基因转化和遗传操作进行了研究^[17-20]。细菌 *Deinococcus radiodurans* 对一系列的损伤因子,如电离辐射、干燥、紫外辐射、氧化剂以及亲电诱变剂等表现出极强的耐性^[15,21,22]。*Deinococcus radiodurans* 为好氧菌,在土壤中形成四联球菌^[14]。*Deinococcus radiodurans* 不仅可以在超过 15000Gy 的急性 γ 辐照下存活,不出现致死或发生诱变,而且可以在慢性 γ 辐照下 (60Gy/h) 连续生长,生长速率和克隆基因的表达不受这种辐照的影响^[23]。作为比较, *Bacillus* spp. 营养细胞在 60Gy/h 的辐照下不能生长,而 *Bacillus* 孢子在 2000—10000Gy 的急性辐照后,其存活力降低 5 个数量级^[12]。*Deinococcus radiodurans* 的全基因组测序和基因组的分析已经完成^[24-26]。这些结果表明, *Deinococcus radiodurans* 可以作为安全地应用于污染环境的生物修复。利用功能基因组和基因工程技术,可以对 *Deinococcus radiodurans* 进行遗传改造,构建基因工程菌,用于含放射性废物场所中金属的处理和有毒有机污染物的降解。

3 耐辐射菌的生理特性和辐射抗性

耐辐射球菌是一种革兰氏阳性微球菌,直径在 1.5—3.5 μm 之间,不产生孢子,能产生粉红色色素,非致病性,最适合生长温度为 30 $^{\circ}\text{C}$, O_2 是耐辐射球菌生长所必需的,缺氧条件下耐辐射球菌几乎不能生长^[27-29]。

在某些含放射性污染的场所,除了微生物的存活受放射性、金属和毒性有机污染物的影响外, *Deinococcus radiodurans* 细胞固有的某些生理特性也会受到限制。例如,基因组信息学的研究结果表明,在野生型 *Deinococcus radiodurans* 细胞中,氨基酸(丝氨酸、半胱氨酸和赖氨酸)的生物合成途径是不完全的。人们研究了该微生物的生理特性以及在放射性不良环境下生长和存活最佳参数。在最佳生长条件下, *Deinococcus radiodurans* 的 DNA 修复能力与其在急性或慢性辐射照射下的存活情况非常一致^[19,23]。然而,在一些营养物缺乏的放射性环境中, *Deinococcus radiodurans* 不能生长,并且很快被杀死。但是,当没有放射性时,这种环境可以支持 *Deinococcus radiodurans* 生长。

Deinococcus radiodurans 的生长研究及其全基因组序列分析结果表明,在 *Deinococcus radiodurans* 细胞的整体代谢调节中存在一些缺陷,限制了碳、氮和 DNA 的代谢,这是以前没有预计到的。因为

在过去的 40 多年里, *Deinococcus radiodurans* R1 菌株一直保藏在营养丰富合成培养基上。在营养物限制条件下, DNA 的修复受到微生物代谢能力的限制,而不是受营养物诱导的遗传修复缺失所限制。人们利用这个信息作为指导,成功地确定了在营养物限制的放射性环境中恢复 *Deinococcus radiodurans* 过度生长所需的氨基酸和维生素。基于这些分析,以及基因缺失的可能矫正,人们可以利用这些微生物来设计放射性污染场所的原位修复方案。

Deinococcus radiodurans 的基因组具有非常大的可塑性。细胞内可以维持、复制、表达插入到其基因组中非常大的外源 DNA 片段^[17,30]。因此,插入到 *Deinococcus radiodurans* 基因组中的编码生物修复功能的 DNA 可以在宿主细胞中有效地表达并行使其功能。这样,可以将多种不同生物修复功能的基因系统引入到 *Deinococcus radiodurans* 细胞中,用于放射性污染环境的修复。

4 遗传改造的 *Deinococcus radiodurans* 用于生物修复

由于 *Deinococcus radiodurans* 可以在 60Gy/h 的电离辐射下生长,因此,人们从 1997 年开始研究将其应用于放射性废物污染场所的修复^[23]。事实上, *Deinococcaceae* 的所有种均可以在该辐射剂量下生长,并且具有各自的特性。例如, *Deinococcus geothermali*s 可以在温度约为 50 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下生长^[16],最近研究表明, *Deinococcus radiodurans* 的表达系统可以在这个嗜热菌中起作用。这样, *Deinococcus radiodurans* 的一些特性可以通过基因工程手段很容易地转移到 *Deinococcus geothermali*s 中,从而使该微生物可以适用于因为放射性衰变而导致温度较高的环境。

Minton 等^[14]报道,当 *Deinococcus radiodurans* 细胞中 DNA 受到损伤时, DNA 的复制便停止,因此,人们起初认为该微生物在高剂量慢速辐照下不会生长^[14,15]。后来人们发现,这些微生物可以在 ^{137}Cs 辐照下生长,并且可以进行 DNA 半保留复制和同源重组^[31]。最近一系列研究结果表明,经过遗传改造的 *Deinococcus radiodurans* 可以在 60Gy/h 的辐照下生长,并且克隆的一些进行生物修复的基因功能可以表达,这些基因工程菌可用于一些更复杂环境系统的修复。

4.1 重金属和核素污染的生物修复

微生物抵抗金属毒性的作用机理通常是把这些有毒金属转化为毒性较小的状态^[4,5,8,9,32,33]。人们对

Deinococcus radiodurans 细胞中大量的金属抗性/还原基因进行了研究。一般来讲,金属在较低的氧化态时其溶解度降低,此时,催化金属还原功能的酶就更加重要^[4,34]。例如,辐射敏感型细菌, *Shewanella oneidensis* MR-1,可以有效地将溶解性的 U (VI)、Cr (VI) 和 Tc (VII) 分别还原为不溶性的 U (IV)、Cr (III) 和 Tc (IV) 沉淀物^[35]。该微生物的全套基因组序列已经被测定,部分基因可以在 *Deinococcus radiodurans* 中表达。此外,通过扩增微生物的自然能力也可以设计金属抗性工程菌。例如,厌氧条件下 *Deinococcus radiodurans* 可以在腐植酸存在的情况下还原 U (VI) 和 Tc (VII),在没有腐植酸存在的条件下还原 Cr (VI)。利用其基因组序列,人们有可能通过基因工程手段来修饰或增强这些功能。

汞、铬和铅是环境中常见的重金属污染物,人们构建了一系列编码这些金属抗性的基因载体,并且在 *Deinococcus radiodurans* 中进行试验。例如,人们将 *Escherichia coli* 中的 *merA* 克隆到 *Deinococcus radiodurans* 细胞中^[32]。*merA* 编码汞离子还原酶 (MerA),该酶可以将高毒性的、硫醇反应活性的汞离子 Hg (II),还原为毒性较小的、几乎是惰性的挥发性元素汞 Hg (0)。

人们开发了四种不同的 *Deinococcus radiodurans* 表达系统,通过改变其细胞的基因剂量来调节 *merA* 的表达^[30]。例如,表达 *merA* 的 *Deinococcus radiodurans* 菌株,在 60Gy/h 剂量照射下生长时可以抵抗浓度为 30—50 $\mu\text{mol/L}$ 的 Hg (II) 的致死效应,并且可以有效地将 Hg (II) 还原为 Hg (0)。

此外,人们还研究了将以下微生物还原特定金属离子的基因克隆到 *Deinococcus radiodurans* 细胞中,包括: *Desulfovibrio vulgaris* (cytC3)、U (VI); *Ralstonia eutrophus* CH34 (czc)、Cd (II)、Zn (II) 和 Co (II) 以及 *Bacillus thuringiensis*、Cr (VI)。

4.2 毒性有机污染物的降解

对于受有毒有机物污染的土壤和地下水,利用原位生物修复技术代替传统的物理化学处理方法是一个新的发展趋势。

出现在放射性污染场所的主要有机污染物是有机的溶剂,例如,苯、甲苯、乙苯和二甲苯(这些污染物在一起称为 BTEX)。这些污染物可以作为某些微生物,如 *Pseudomonas putida* 的底物,该微生物代谢这些污染物的遗传和生化特性得到了深入的研究^[7,8,10,11]并且该微生物的全套基因组序列也已经被测定。

由于一般的微生物,如 *Pseudomonas* spp.,对辐射非常敏感,因此不能用于既存在放射性核素污染,又存在有机污染物的场所^[12]。利用基因重组技术,可以构建具有降解毒性有机污染物的 *Deinococcus radiodurans* 菌株,例如,假单胞菌 *P.putida* 的甲苯双加氧酶基因 (*todC1C2BA*) 可以在 *Deinococcus radiodurans* 细胞中有效地表达其功能^[23]。在慢性辐照下,这些菌株可以氧化甲苯、氯代苯以及 3, 4-二氯-1-丁烯。例如,含有 *todC1C2BA* 的 *Deinococcus radiodurans* 细胞,可以将甲苯氧化为甲苯-顺-二羟基二醇,然后由天然的、非专一性的脱氢酶进一步氧化为 3-甲基邻苯二酚,邻苯二酚类化合物一旦形成,马上聚合成深棕色的不溶性聚合物。将假单胞菌 *Pseudomonas* 细胞中转化 3-甲基邻苯二酚为丙酮酸的代谢基因引入到含有 *todC1C2BA* 基因的 *Deinococcus radiodurans* 中,构建基因工程菌,该工程菌可以代谢甲苯及其相关的化合物。

5 结论

利用物理化学方法清除自然环境、沉积物和地下水中的污染,价格非常昂贵。利用微生物处理这些污染环境是一种具有活力的替代技术。基于耐辐射型细菌 *Deinococcus radiodurans* 的生物修复技术可以用于辐射水平高或辐射敏感型微生物不能利用的污染场所。利用金属还原和有机污染物降解基因,人们成功地研究了 *Deinococcus radiodurans* 在高辐射环境的遗传系统。通过基因工程手段构建耐辐射微生物,可以解除该微生物固有的一些物理、化学和生理方面的限制。在辐射成为限制微生物生存和发挥其主要功能的情况下,利用 *Deinococcus radiodurans* 进行环境修复是一种具有实用潜力的手段。

参考文献

- 1 Daly M J. Curr Opin Biotechnol, 2000, 11(3): 280-285
- 2 McCullough J, Hazen T C, Benson S M, et al. US DOE, Office of Biological and Environmental Research, 1999
- 3 Macilwain C. Nature, 1996, 383(6599): 375-379
- 4 Lovely DR, Coats J D. Curr Opin Biotechnol, 1997, 8(3): 285-289
- 5 Diels L, Dong Q, Van der Lelie D, et al. J Ind Microbiol, 1995, 14(2): 142-153
- 6 Leisinger T, Cook A M, Hutter R, et al. Microbial Degradation of Xenobiotic and Recalcitrant Compounds. New York, NY: Academic Press, 1981
- 7 Li S, Wackett L P. Biochem Biophys Res Commun, 1992, 58(12): 2820-2826
- 8 Lovely D R. J Ind Microbiol, 1995, 14(1): 85-93

- 9 Nies D H, Silver S. J Ind Microbiol, 1992, **14**(2): 186-199
- 10 Wackett L P, Sadowsky M J, Newman L M, *et al.* Nature, 1994, **368**(6472): 627-629
- 11 Zylstra G J, Gibson D T. J Biol Chem, 1989, **264**(25): 14940-14946
- 12 Thornley M J. J Appl Bacteriol, 1963, **26**(4): 334-345
- 13 Van Gerwen S J, Rombouts F M, van't Riet K, *et al.* J Food Prot, 1999, **62**(8): 1024-1032
- 14 Minton K W. Mutat Res DNA Repair, 1996, **362**(1): 1-7
- 15 Battista J R, Earl A M, Park M J. Trends Microbiol, 1999, **7**(4): 362-365
- 16 Ferreira A C, Nobre M F, Rainey F A, *et al.* Int J Syst Bacteriol, 1997, **47**(8): 939-947
- 17 Smith M D, Lennon E, McNeil L B, *et al.* J Bacteriol, 1988, **170**(8): 2126-2135
- 18 Daly M J, Ouyang L, Fuchs P, *et al.* J Bacteriol, 1994, **176**(12): 3508-3517
- 19 Daly M J, Minton K W. J Bacteriol, 1995, **177**(19): 5495-5505
- 20 Daly M J, Minton K W. J Bacteriol, 1996, **178**(15): 4461-4471
- 21 Anderson A W, Nordan H C, Cain R F, *et al.* Food Technol, 1956, **10**(6): 575-577
- 22 Mattimore V, Battista J R. J Bacteriol, 1996, **178**(17): 5232-5237
- 23 Lange C C, Wackett L P, Minton K W, *et al.* Nat Biotechnol, 1998, **16**(10): 929-933
- 24 Lin J, Qi R, Aston C, *et al.* Science, 1999, **285**(5419): 1558-1562
- 25 White O, Eisen J A, Heidelberg J F, *et al.* Science, 1999, **286**(5445): 1571-1577
- 26 Makarova K S, Wolf Y I, White O, *et al.* Res Microbiol, 1999, **150**(8): 711-724
- 27 孙翠凤, 刘芬菊, 汪涛. 辐射研究与辐射工艺学报, 2002, **20**(3): 161-165
SUN Cuifeng, LI Fenju, WANG Tao. J Radiat Res Radiat Process, 2002, **20**(3): 161-165
- 28 华跃进, 高冠军. 微生物学报, 2003, **43**(1): 120-126
HUA Yuejin, GAO Guanjin. Acta Microbiol Sin, 2003, **43**(1): 120-126
- 29 孔向荣, 杜泽吉. 辐射研究与辐射工艺学报, 1999, **17**(2): 89-92
KONG Xiangrong, DU Zeji. J Radiat Res Radiat Process, 1999, **17**(2): 89-92
- 30 Brim H, McFarlan S C, Fredrickson J K, *et al.* Nat Biotechnology, 2000, **18**(1): 85-90
- 31 Minton K W, Daly M J. BioEssays, 1995, **17**(5): 457-464
- 32 Summers A O. Annu Rev Microbiol, 1986, **40**(4): 607-634
- 33 Schottel J L. J Biol Chem, 1978, **253**(12): 4341-4349
- 34 Stephen J R, Macnaughton S J. Curr Opin Biotechnol, 1999, **10**(3): 230-233
- 35 Venkateswaran K, Moser D P, Dollhopf M E, *et al.* Int J Syst Bacteriol, 1999, **49**(4): 705-724

Engineered radiation-resistant bacteria and their application in bioremediation of radioactive wastes-contaminated environment

WANG Jianlong

(Laboratory of Environmental Technology, INET, Tsinghua University, Beijing 100084)

ABSTRACT *Deinococcus radiodurans* is a radiation-resistant bacterium, possessing remarkable resistance to a range of damage caused by ionizing radiations, desiccation, ultra-violet ray and oxidizing agents. Its potential applications include remediation of radioactive wastes-contaminated environments. Radiation-sensitive organisms cannot be used in the environment contaminated by both radioactive wastes and organic pollutants. Physicochemical cleanup technologies that could be used are expensive. The use of microorganisms to stabilize or detoxify these environments is a viable alternative. A bioremediation strategy based on the radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* is being developed for the decontamination of sources where radiation levels are high. The genetic engineering could be overcome the physical, chemical, and physiologic constraints imposed on microorganism by radioactive wastes. Application of engineered *D. radiodurans* for the treatment of environments where radiation is the principle factor limiting microbial survival and function appears to be a potential and effective approach.

KEYWORDS *Deinococcus radiodurans*, Engineered bacterium, Radioactive contamination, Complex contamination, Bioremediation, Environmental biotechnology

CLC Q937