

转基因技术在污染土壤植物修复中的研究进展

孙宁宁,王红旗,王 帅

(北京师范大学 水科学研究院 水沙科学教育部重点实验室,北京 100875)

[关键词] 土壤污染;转基因植物;植物修复

[摘要] 利用植物及其相关的微生物修复污染土壤、沉积物、地下水,已经成为一种经济环保的技术,越来越受到关注。植物修复主要是利用积聚、络合、挥发、降解、去除、转化或者固定等机制来处理污染物。识别超富集植物中的特定基因,通过基因操纵技术以及植物转化技术,获得高效去除环境中污染物的转基因植物,对于污染场地的植物修复应用具有非常大的潜力。根据相关文献分别从植物提取、植物挥发以及植物降解三个方面,对国外转基因技术在土壤污染植物修复中的研究进展进行了综述。

[中图分类号] S154.4;S157.5 [文献标识码] A [文章编号] 1000-0941(2009)06-0043-04

土壤污染是当前人类面临的一个极为重要的、全球性的环境问题之一。土壤污染物主要是重金属和有机污染物,这两类物质复合作用后,往往加剧污染程度,不但对植物和动物造成很大威胁,而且会通过食物链进入人体,危害人类健康。目前,含有重金属或有机污染物的土壤修复方法包括气提技术、土壤淋洗、固定化等,由于这些技术容易造成二次污染、破坏自然环境,并且成本较高^[1],因此利用植物及其相关的微生物修复污染土壤、沉积物、地下水,已经成为一种经济环保的技术,越来越受到关注。植物修复主要是利用积聚、络合、挥发、降解、去除、转化或者固定等机制来处理污染物,相对于常规微生物修复,除了可以通过植物过程固定积聚污染物,阻止污染物随水流和风尘而扩散外^[2],植物本身作为天然自养系统,也能够向根际微生物提供营养,保证微生物生长和一定的微生物群落,从而能够进一步使污染物脱毒。

大量具有修复能力的植物种类已被鉴定^[3]。据报道,一些超富集植物的富集能力是普通植物的 50~500 倍,高生物富集因子以及高效根—茎传输系统使得重金属耐受力增强,从而使超富集植物具有较高的脱毒能力。但是,许多超富集植物具有生长缓慢、生物量低的特点,严重限制了在污染场地实际修复中的应用。因此,识别超富集植物中的特定基因,通过基因操纵技术以及植物转化技术,获得高效去除环境中污染物的转基因植物,对于污染场地的植物修复应用具有非常大的潜力。

1 转基因技术在植物提取修复中的应用

植物提取技术是指利用重金属富集植物从土壤中吸收重金属,通过植物的迁移转运作用,在可收割部位富集,待植物收获后再进行处理,据报道,目前已发现了 400 多种天然超富集植物。识别出对重金属耐性强或富集性高的生物,通过生物化学、分子生物学等方法鉴别出控制这些性状的基因,然后将这些基因按设计方案定向连接起来,并在特定的受体细胞中,与载体一起得到复制与表达,使受体细胞获得新的遗传特性,从

而提高修复潜能具有重要应用价值^[4]。过表达与金属螯合物的生物合成有关的基因,通过螯合物的不同和螯合物所处部位的不同,可以提高或降低金属的吸收,提高金属的转运和区室化。依靠基因在植物组织(根、茎叶、维管束)和细胞内(细胞膜、液泡膜)中过表达金属转运体基因可能提高金属的吸收、转运,或者区室化的效率。表 1 介绍了一些转基因植物在土壤重金属植物提取修复技术中的应用^[5]。

表 1 转基因植物在植物提取修复技术中的应用

基因	来源	目标植物	表达效果
MT2	人类	烟草	Cd 的耐受性增加
MT1	老鼠	烟草	耐受 200 mM CdCl ₂
CUP1	酵母	烟草	富集 2~3 倍的 Cu
gshII	<i>E. coli</i>	印度芥菜	总 Cd 浓度提高 3 倍
gshI	<i>E. coli</i>	白杨	Cd、Cr 及 Cu 高累积
TaPCS1	小麦	烟草	Pb 及 Cd 高耐受性
AtPCS1	拟南芥	<i>Arabidopsis</i>	Cd 及 Zn 超敏感性
GR	<i>E. coli</i>	印度芥菜	Cd 耐受性增加
APS	拟南芥	印度芥菜	富集 2~3 倍的 Se
ArsC	<i>E. coli</i>	<i>Arabidopsis</i>	累积 2~3 倍的 As
ArsC	<i>E. coli</i>	烟草	累积 1.5 倍的 Cd
NtCBP4	烟草	烟草	Ni 耐受性提高
NtCBP4	烟草	烟草	增加 Pb 耐受性
AtCAX2	拟南芥	烟草	累积超过 15%~20%
ZAT1	拟南芥	<i>Arabidopsis</i>	根部累积 2 倍 Zn
ZntA	<i>E. coli</i>	<i>Arabidopsis</i>	生长旺盛
YCF1	酵母	<i>Arabidopsis</i>	Pb 及 Cd 耐受性提高

1.1 金属硫蛋白 MTs(metallothioneins)

金属硫蛋白(MTs)是富含半胱氨酸的低分子量蛋白,对金属如 Cd、Cu 和 Zn 具有高亲和力。它们通过半胱氨酸残基上的巯基与重金属结合形成无毒或低毒的络合物,从而清除重金属的毒害。合成金属螯合剂基因的高效表达取决于螯合剂的类型以及结合定域的位置,从而影响金属的摄取、迁移以及截留。例如,在烟草和油菜中 MT 基因的表达能够增加 Cd 的耐受性。

当 MT 酵母基因 (CUP1) 在花椰菜中表达时, 能够使 Cd 的耐受性增加 16 倍。Thomas 等研究者发现, 酵母基因 (CUP1) 能够促进烟草对 Cu 的吸收, CUP1 转化株在较老植株能够比年轻植株聚集高达 7 倍的 Cu。当种植在 Cu 污染土壤中时, 相对对照条件, 转基因植物在叶子部位能够积累 2~3 倍的 Cu^[6]。

1.2 植络素 PCs (phytochelatin)

植络素 (PCs) 是一种小的富半胱氨酸的金属螯合缩氨酸 (5~23 个氨基酸), 对多种金属具有清除和解毒作用, 通过巯基与金属离子螯合形成无毒化合物, 减少细胞内游离的金属离子, 从而减轻金属对植物的毒害。通过土壤细菌菌解转化, 将植物螯合酶编码的小麦基因 (TaPCS1) 在粉蓝烟草中表达, 能够显著增加对 Pb 和 Cd 的耐受性。当在金属污染的土壤上生长到 6 周后, 这种转基因植物能够积累较高的 Pb 浓度 (地上部分增加 50%, 根部增加 85%)。将 *Arabidopsis* PC 合成酶 (AtPCS1) 表达在转基因植物 *Arabidopsis* 中, 转基因植物相对于野生型, PCs 产量增加 (3 天时间在 85 μM CdCl₂ 压力下, 增加 1.3~2.1 倍)。转基因幼苗相对于未修饰的植物, 根系较长, 植株较高, 叶子较绿, 并且这种野生型植物具有比较广的地理分布, 生长速度快, 生物量高, 对草食动物具有排斥性, 因此在植物修复中具有一定的应用前景^[5]。

1.3 谷胱甘肽酶

在植物中的谷胱甘肽酶, 一般称为 γ-谷氨酰半胱氨酸合成酶 γ-ECS (γ-glutamylcysteine), 对重金属脱毒起到非常重要的作用。将两种谷胱甘肽合成酶, 即 γ-ECS 以及谷胱甘肽合成酶 GS (glutathione synthetase) 基因在印度芥菜 (indian mustard) 中过表达, 显示出对 Cd 具有较强的耐受性和积累作用。除了对 Cd 的耐受性增加以外, γ-ECS 还能够促进硫的吸收, 使得植株总硫增加, 当 γ-ECS 基因在白杨中表达时, 也得到相似的结果。Bennett 等研究者利用转基因印度芥菜植株, 表达 γ-ECS, GS 和三磷酸腺苷硫化酶 (APS) 用来比较评估对于混合污染物的植物修复潜力。相对于野生型, 表达 γ-ECS 和 GS 的转基因植株显示出较高的累积浓度, Cd (+50%), Zn (+45% GS 及 +93% γ-ECS)。同时 γ-ECS 转基因植物对于其他金属的累积也具有较高的水平, 分别为 Cr (+170%), Cu (+140%), Pb (+200%)。但是 APS 转基因植物在植株中的金属浓度没有明显不同。相对于野生型植物, APS、γ-ECS 和 GS 转基因植物在植物叶部位分别累积 4.3、2.8 和 2.3 倍的 Se^[7]。通过从大肠杆菌 *E. coli* 导入两种基因, 砷酸盐还原酶 *arsC* (arsenate reductase) 以及 γ-ECS 到植物拟南芥中去除土壤中的污染物 As。当生长在 As 污染的土壤中时, 相对于野生型以及仅仅由 γ-ECS 或 *ArsC* 单独表达的转基因植物, 过表达两种基因的转基因植物能够在新鲜植株中累积 4~17 倍, 在每克组织中, 累积 As 高达 2~3 倍^[5]。这些研究表明, ATP 硫酸化酶的基因表达可以促进植物提取混合重金属, 从而可以应用于修复受不同金属污染的土壤。

1.4 金属转运子

金属和碱离子通过植物等离子膜以及细胞器膜的运输对于植物生长以及对有毒金属的植物修复来说是非常重要的。转运子将潜在的有毒离子穿过细胞膜, 在植物中具有非常重要

的作用。通过修改金属转运子例如 CAX2、ZAT、NtCBP4、FRE1 及 FRE2, 金属的耐受性和累积性在一些植物种类中得到显著提高。Hirschi 等人^[8] 通过从 *Arabidopsis* 获得钙液泡转运子 CAX2, 在烟草中表达, 使得 Ca、Cd 和 Mn 的耐受性提高。但是, 液泡转运子 AtMHX 在烟草中表达时, 并没有发现对 Mg 和 Zn 的累积增加。通过锌转运子 (ZAT) 在拟南芥中的表达, 结果发现这种转基因植物能够增加对锌的抵抗力, 并且能够在根部的累积量增加 2 倍。NtCBP4 是从烟草中得到的一种金属转运子, 编码一个植物钙调素 (calmodulin), 当其过表达时, 增加 Ni 的耐受性但降低了 Ni 的累积, 促进 Pb 的累积但是降低了 Pb 的耐受性。这是对于植物蛋白参与金属摄取, 通过等离子体膜调节植物耐受性并且增加 Pb 的累积作用的首次报道。由 Fe 还原酶 (FRE1、FRE2) 编码的酵母基因在烟草中的表达, 在植株部位的 Fe 含量增加 1.5 倍^[5]。

2 转基因技术在植物挥发中的应用

植物挥发常用于提取可挥发性的元素, 例如 Hg 和 Se, 从污泥或者土壤中, 以无毒的气体形式通过蒸腾作用到达大气中, 目前, 转基因植物已经开始尝试用于去除土壤中的这些金属。

2.1 Hg 的耐受性和挥发

Hg 是一种全球性的污染物质, 由于自然过程和人类活动, 能够在大气、水和土壤中循环。尽管不是所有的污染场地都是以甲基汞的形式存在, 但是土壤中的 Hg 仍具有一定的风险, 目前, 利用植物修复去除 Hg 的方式主要有两种。

第一种方式, 是从能够脱汞的细菌中得到基因, 编码到植物中, 从而不仅能够增加 Hg 的抗性, 而且还可以增加其挥发能力。Heaton 等研究者将细菌有机汞裂解酶 (*merB*) 和汞还原酶 (*merA*) 基因修饰到 *Arabidopsis* 和烟草植物中, 从土壤中吸收 Hg (II) 和甲基汞 (MeHg), 最终以气态 Hg (0) 形式从叶表进入到大气中。转基因植物拟南芥, 表达 *merB* 基因, 能够显著增加甲基汞的耐受性, 并且将甲基汞转化为离子汞, 后者的毒性是前者的 1/100^[5]。另外, 当 *merA* 和 *merB* 转基因植物生长在浓度为 25 μM 的甲基汞溶液中时, 每 1g 新鲜生物量每天挥发 14.4~85.0 μg 的 Hg (0)。

第二种方式, 是利用含有硫的无毒溶液, 将 Hg 累积在高产植物 (无基因转变) 土壤中。通过在含有 1 g/kg S₂O₃ 的溶液中, 调查植物 Hg 的累积量和挥发量。(NH₄)₂S₂O₃ 的添加使得印度芥菜植株和根部的 Hg 浓度比对照增加了 6 倍。但是, 相对于添加 (NH₄)₂S₂O₃ 的处理, 在对照植物 (定期浇水) 中挥发速率明显较高。

2.2 Se 的耐受性和挥发

Se 是环境中的主要污染物, 高于 Se 的限值会产生毒性效应。Se 的挥发涉及到无机硒同化为硒代胱氨酸 (SeCys) 和硒代蛋氨酸 (SeMet)。CGS 基因在云苔植物中的表达, 能够促进 Se 的挥发, 并且 CGS 转基因幼苗对 Se 具有较高的耐受性。当供给硒酸盐时, 相对于野生型, CGS 转基因植物在植株部位, Se 的浓度为 20%~40%, 而在根部为 50%~70%。所以, CGS 基因的表达为植物的生产提供了一种具有前景的方法, 以低毒性可挥发二甲基硒化物的形式从污染场地中去除 Se。

植物挥发的主要优势,在于能够从污染场地中完全去除污染物,不需要植物收获和处置。但是,也存在一定的风险,那就是挥发性物质的安全性。最近的风险评估报告表明,关于植物修复中硒和汞的挥发,对环境没有明显的危害,相对于其他形式的污染其危害可以忽略。用于提高植物挥发能力的工程植物和它们的性能见表2。

表2 转基因植物在植物挥发修复技术中的应用

基因	来源	目标植物	表达效果
merApe9	突变 merA	黄杨	汞的挥发量提高
merA	细菌	烟草	耐受 500 mg/kg Hg(II)
merA、merB	细菌	<i>Arabidopsis</i>	1 mg 新鲜生物量挥发 59 pg Hg(0)
merB	细菌	<i>Arabidopsis</i>	挥发 763 ng / (min · g) Hg(0)
merA9、merA18	修饰的 merA	杨木	40 mg/kg 的 Hg(II) 污染土壤中,生物量较高
SMT	<i>A. bisulcatus</i>	印度芥菜	当供给硒酸盐时,挥发量增加 2.5 倍

3 转基因技术在植物降解修复中的应用

植物降解修复是指通过植物分泌的酶或者植物和其相关的微生物的生物代谢过程,尤其是对有机污染物(例如氯乙酰胺, TNT, TCE, 阿特拉津等),能够化学降解为无毒的物质,或矿化为 CO₂ 和 H₂O 分子,或者部分转化为稳定的中间物质贮存在植物中的一种修复方式。应用于植物降解的一些很重要的酶,有过氧化酶、过氧化酵素、漆酶、磷酸酯酶、硝化还原酶和脱卤素酶等。转基因植物工程用于提高植物降解效率,在不同有机污染物条件下的表现在表3中列出。对于有机污染物例如氯乙酰胺和 TNT,已经获得对其有降解能力的转基因植物。为了增加工程植物对 TNT 的耐受性,能够使 TNT 降低为污染性低的化合物的两种细菌酶(PETN 还原酶和硝化还原酶)基因,在烟草植物中得到表达,结果表明 Onr 和 nfsI 两种基因在结构启动子的控制下,对 TNT 的耐受性提高。

另外一个能够促进植物降解修复的是哺乳动物细胞色素 P450 2E1。这种细胞色素能够氧化非常大范围的化合物,包括 TCE 和二溴乙烷(EDB)。表达人体 P450 2E1 的转基因烟草可以增加 TCE 和 EDB 的代谢。另外,谷胱甘肽合成酶(γ-ECS 和 GS)的表达,不但能够增加重金属的耐受性,还可以增加某些有机污染物的耐受性,例如阿特拉津,异丙甲草胺和菲。Flocco 等^[9]将 γ-ECS 和 GS 基因表达达到芥菜型油菜(*B. juncea*)植物中,结果表明能够增加阿特拉津的耐受性(50 和 100 mg/L)。当在 100 mg/L 的阿特拉津状态下,野生型的幼苗根抑制 50%,而 γ-ECS 和 GS 转基因植物仅仅抑制 20%~30%。与野生型植物对照,转基因植物显示出对 CDNB(1-氯-2,4-二硝基苯)具有略微较高的耐受性(分别在 5 和 10 mg/L 下测试),异丙甲草胺(50 和 100 mg/L),菲(100 和 200 mg/L)。

所有的研究表明,具有较高酶活性的工程植物参与限速步骤,可能对于提高有机污染物的植物降解效率具有重要的作用。尽管有机污染物在植物中的代谢已经有很多研究,但是转基因植物修复技术的优势以及潜在风险,仍然还有很多工作需

要做。

表3 转基因植物在植物降解修复技术中的应用

基因	来源	目标植物	有机污染物	表达效果
Onr	PETN 还原酶	烟草	GTN (硝化甘油)	促进硝化甘油脱毒
nfsI	硝基还原酶	烟草	TNT	使 TNT 脱毒
gshI	γ-ECS	白杨	氯乙酰胺	提高除草剂的耐受性
P450	CYP1A1	老鼠单加氧酶	马铃薯	绿麦隆,噻唑隆耐受性及脱毒能力增强
P450 CYP1A1	老鼠单加氧酶	马铃薯	阿特拉津,绿麦隆	代谢除草剂到无毒的形式

4 展望

转基因技术的应用为污染土壤的植物修复提供了广阔的发展前景,无论从市场角度还是科研角度,基因技术领域的研究都很有价值。随着细胞和分子水平上对重金属在植物体内新陈代谢机理的认识及相关基因的不断鉴定,有机污染物脱毒的研究,应用转基因技术提高植物提取、挥发、降解方面已经取得了一些进展。但是,在理解植物-微生物交换、金属累积以及离子动态平衡过程中,仍然有很多未知领域,应用转基因手段进行植物修复的研究还有许多问题需要解决,需要植物学、植物生理学、生物化学、地球化学、农业工程、微生物学以及基因工程等多门学科的交叉研究。下面一些研究领域应给予特别关注:①金属转运子的操纵和它们对于特定细胞类型的靶细胞,例如液泡,在不影响其他细胞功能的情况下,提高金属的转运和区室化。②对于某些植物,在避免基因逃逸情况下,通过叶绿体染色体的基因操纵,获得高基因表达^[10]。③识别出更多种能够阻止草食动物啃食的备选植物,通过基因转化提高对金属的耐受能力,从而避免金属转移到食物链。④发展能够促进植物-微生物的交互作用或者根际微生物的活性的转基因植物。⑤考虑污染场地的复合污染,将多种基因转移到受体植物中,从而帮助去除混合或者复杂条件下的污染物。⑥目前在植物修复中的转基因植物用于野外修复的很少,建议建立场地试验,尽快发展能够商业化运作且可行的修复技术。

[参考文献]

- [1] Kassel A G, Ghoshal D, Goyal A. Phytoremediation of trichloroethylene using hybrid poplar[J]. *Physiol. Mol. Plants*, 2002, 8(1):3-10.
- [2] Pulford I D, Watson C. Phytoremediation of heavy metal contaminated land by trees - a review[J]. *Environ. Int.*, 2003 (29): 529-540.
- [3] 陈同斌, 韦朝阳, 黄泽春, 等. 砷超富集植物蜈蚣草及其对砷的富集特征[J]. *科学通报*, 2002, 47(3): 207-210.
- [4] 骆永明. 金属污染土壤的植物修复[J]. *土壤*, 1999(5): 261-265.
- [5] Cherian S, Margarida O M. Transgenic plants in phytoremediation: recent advances and new possibilities [J]. *Environmen*

- tal Science & Technology, 2005, 39(24): 9377 - 9390.
- [6] Thomas J C, Davies E C, Malick F K, *et al.* Yeast metallothionein in transgenic tobacco promotes copper uptake from contaminated soils[J]. Biotechnol. Prog, 2003, 19 (2): 273 - 280.
- [7] Lee S, Moon J S, Ko T S, *et al.* Overexpression of Arabidopsis phytochelatin synthase paradoxically leads to hypersensitivity to cadmium stress[J]. Plant Physiol, 2003, 131(2): 656 - 663.
- [8] Hirschi K D, Korenkov V D, Wilganowski N L, *et al.* Expression of Arabidopsis CAX2 in tobacco. Altered metal accumulation and increased manganese tolerance [J]. Plant Physiol, 2000, 124(1): 125 - 133.
- [9] Flocco C G, Lindblom S D, Smits E A. Overexpression of enzymes involved in glutathione synthesis enhances tolerance to organic pollutants in Brassica juncea[J]. Int. J. Phytochem. 2004, 6(4): 289 - 304
- [10] Van Huysen T, Terry N, Pilon - Smits E A. Exploring the selenium phytoremediation potential of transgenic Indian mustard overexpressing ATP sulfurylase or cystathioninegamma - synthase [J]. Int. J. Phytorem, 2004, 6 (2): 111 - 118.
- [作者简介] 孙宁宁(1982 -),女,山东聊城市人,在读博士,主要从事土壤污染修复研究;通讯作者:王红旗(1962 -),男,博士,教授,主要从事污染土壤修复、水文地质、环境地质方面的研究与教学工作。
- [收稿日期] 2009 - 03 - 15
- (责任编辑 李艳霞)