

# 携带污染物降解基因的可移动基因元件及其介导的生物修复\*

李慧<sup>1\*\*</sup> 周丽莎<sup>1</sup> 王亚菲<sup>1</sup> Eva M. Top<sup>2</sup> 张颖<sup>1</sup> 徐慧<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>中国科学院沈阳应用生态研究所中国科学院陆地生态过程重点实验室, 沈阳 110016; <sup>2</sup>Department of Biological Sciences, University of Idaho, Moscow ID 83844, USA)

**摘要** 可移动基因元件(mobile genetic elements, MGEs)在环境微生物群落中的水平转移是细菌基因组进化和适应特定环境压力的重要机制. 在污染土壤和水体中接种携带具有降解基因 MGEs 的菌株后, 随着 MGEs 的水平基因转移, 可使降解基因转移至具有竞争性的土著微生物中并在其中表达, 从而不必考虑供体菌在环境中是否能够长期存活. 这种由可移动降解基因元件水平转移介导的生物修复为探索新的生物修复途径提供了可行性. 本文重点综述了环境样品中携带降解基因 MGEs 的多样性及其在促进污染物降解过程中的重要作用, 介绍了从环境样品中分离代谢 MGEs 的方法, 并列举了在污染土壤、活性污泥、其他生物反应器等生态系统中 MGEs 水平转移的几个实例.

**关键词** 可移动基因元件(MGEs) 水平基因转移(HGT) 外源分离法 生物修复  
**文章编号** 1001-9332(2011)02-0526-11 **中图分类号** Q938.1 **文献标识码** A

**Degradative mobile genetic elements (MGEs) and their potential use in MGE-mediated biodegradation.** LI Hui<sup>1</sup>, ZHOU Li-sha<sup>1</sup>, WANG Ya-fei<sup>1</sup>, Eva M. TOP<sup>2</sup>, ZHANG Ying<sup>1</sup>, XU Hui<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Key Laboratory of Terrestrial Ecological Processes, Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China; <sup>2</sup>Department of Biological Sciences, University of Idaho, Moscow ID 83844, USA). -*Chin. J. Appl. Ecol.*, 2011, 22(2): 526-536.

**Abstract:** The horizontal transfer of mobile genetic elements (MGEs) in environmental microbial communities plays an important role in the evolution of bacterial genomes and the adaptation of microbial populations to specific environmental stress. Inoculation of the bacterial strains with MGEs with pollutant-degrading gene and the subsequent horizontal transfer of the MGEs to one or various well-established and competitive indigenous bacterial populations in an ecosystem will allow the catabolic gene to be transferred and expressed in indigenous microbial populations, and hence, the survival of the introduced donor strains is no longer needed to be considered. The MGE-mediated bioremediation provides the feasibility for developing new bioremediation strategies. This paper summarized the diversity of MGEs with pollutant-degrading gene in the environment and the important roles of these MGEs in promoting pollutant degradation, introduced the methodological approaches for the isolation of the MGEs from environmental samples, and listed several studies that monitored the horizontal transfer of the MGEs in polluted soil, activated sludge, and other bioreactors.

**Key words:** mobile genetic elements (MGEs); horizontal gene transfer (HGT); exogenous isolation; bioremediation.

可移动基因元件(mobile genetic elements, MGEs)主要包括插入序列(IS)、转座子(transposons)、整合子(integrans)、自转移广宿主质粒

(self-transmissible broad host range plasmids)、基因岛(genomic islands)和噬菌体(phage)等. 目前, 诸多科学家已开始广泛关注 MGEs 水平转移(horizontal gene transfer)在细菌基因组进化和适应特定环境压力过程中的重要作用. 最为大家熟知的例子就是由滥用抗生素导致的抗生素抗性基因的广泛传播<sup>[1]</sup>,

\* 国家自然科学基金项目(31070102)资助.

\*\* 通讯作者. E-mail: huili@iae.ac.cn

2010-07-06 收稿, 2010-11-10 接受.

目前已从临床耐药菌株中分离出多种携带抗性基因的 MGEs, 并对其开展了较为深入的研究。

然而, 人们很少关注污染环境样品中的 MGEs。近年来, 随着现代工农业的发展导致大量人造的异生化合物 (xenobiotic), 如药物、杀虫剂、致癌物等, 进入各种生态系统 (土壤、地表水、地下水等), 这些污染物为微生物代谢功能的进化提供了强大的选择压力。在适合的环境条件下, 某些土著微生物种群也确实得以进化, 具有了代谢一系列难降解物质的能力, 而编码这些代谢活性的遗传信息往往由具有自我转移特性的质粒或其他 MGEs 所携带<sup>[2-4]</sup>。对这些具有代谢功能 MGEs 特性的分析能够进一步揭示在污染生态系统中, 微生物群落是如何在原位建立新的代谢途径的。此外, 在污染土壤和水体中接种 MGEs 后, 随着 MGEs 在环境中的水平转移, 代谢基因转移至土著细菌并在其中表达, 可使具有竞争性的土著微生物获得降解能力, 从而不必考虑供体菌能否长时间存活。这种由可移动降解基因元件水平转移介导的生物修复为探索新的生物修复途径提供了可行性。

本文重点综述了环境样品中携带降解基因 MGEs 的多样性及其在促进污染物降解过程中的重要作用, 介绍了从环境样品中分离 MGEs 的方法, 并列出了在污染土壤、活性污泥和其它生物反应器等生态系统中 MGEs 水平转移的几个实例。

## 1 环境样品中的可移动基因元件 (MGEs)

编码特定代谢基因的 MGEs 在微生物适应环境污染选择压力的过程中发挥着重要作用。其机制可能有两种, 一种是通过代谢基因在微生物群落中传播进而增加具有降解能力的功能微生物的多样性, 另一种是微生物群落中原来已存在的一些代谢基因或部分基因片段通过重组从而构建出新的代谢途径。这些携带代谢基因的 MGEs 包括质粒、转座元件以及一些带有类似噬菌体整合酶的元件 (表 1)。

### 1.1 代谢质粒

具有 MGEs 特征的代谢质粒大都具有广宿主 (broad host range) 特性, 所谓的“广宿主质粒”被定义为至少能够在变性细菌 (proteobacteria) 两个亚纲 (例如  $\beta$ -,  $\gamma$ -) 之间互相转移并稳定传代的质粒<sup>[5]</sup>。目前, 已报道的参与污染物代谢的广宿主质粒还不到 20 个, 其中大部分为分子量大于 50 kb 的大质粒。这些质粒包括: 降解 4-氯苯甲酸的 pSS60<sup>[6]</sup>; 降解 3-氯苯甲酸的 pBRC60<sup>[7]</sup>、pAC25<sup>[8]</sup>、pENH91<sup>[9]</sup>;

降解 2, 4-二氯苯氧乙酸 (2, 4-D) 的 pJP4<sup>[10]</sup> 和 pEMT1<sup>[11]</sup>; 降解对-甲苯磺酸的 pTSA<sup>[12]</sup>; 降解 1, 3-二氯丙烯的 pPC170<sup>[13]</sup>; 降解对硫磷的 pCSI<sup>[14]</sup>; 降解 2-氯丙酸的 pUU204<sup>[15]</sup>; 降解 3-氯苯胺的 pC1-3<sup>[16]</sup>; 降解 1, 2, 4, 5-四氯苯的 pPS12-1<sup>[17]</sup>; 降解氯苯的 pP51<sup>[18]</sup>; 降解阿特拉津的 pADP1<sup>[19]</sup>; 参与卤代乙酸代谢的 pUO1<sup>[20]</sup>。还有新近报道的降解  $\gamma$ -六氯环己烷 (六六六) 的 pLB1<sup>[21]</sup>。此外, 还包括参与石油烃污染物降解的广宿主质粒, 研究比较深入的有能够降解甲苯、二甲苯的 pWWO (第一个被发现的 TOL 质粒)<sup>[22-23]</sup> 和降解萘的 pDTG1 质粒<sup>[24]</sup>。随着相关研究的深入, 广宿主代谢质粒的数量仍将不断增加。在已发现的这些广宿主代谢质粒中, 编码降解天然存在污染物的质粒与编码参与人造异生化合物代谢的质粒存在很大差别。编码天然有机污染物降解基因的质粒大多为 IncP-2 和 IncP-9 质粒, 而编码人造异生化合物 (如卤代芳烃) 代谢基因的质粒往往属于 IncP-1 不相容群。

研究表明, 携带降解基因的广宿主质粒在建立新代谢途径的过程中发挥着非常重要的作用, 这种新的代谢途径通常是由来自不同微生物的代谢基因或基因片段在一个合适的新宿主中进行重组而获得的。例如, 氯代芳烃降解质粒 pPS12-1<sup>[17]</sup> 和 pP51<sup>[18]</sup>, 其中的甲苯降解基因使氯代芳烃转化为氯代邻苯二酚, 与编码氯代邻苯二酚代谢的基因重组后, 则构成了针对异生化合物的新代谢途径。

### 1.2 转座子及其他可移动基因元件

根据携带污染物降解基因的代谢转座子结构, 可将其分为 I 类转座子和 II 类转座子。I 类转座子是一种复合转座子, 代谢基因的两端为正向或反向插入的两个相同或高度同源的 IS 序列; 而 II 类转座子两端为短的末端反向重复序列, 且 II 类转座子是通过复制模式进行转座, 需要转座酶和解离酶的参与。代谢转座子通常位于质粒上, 最为典型的是位于 TOL 质粒和 NAH7 质粒上的 II 类转座子<sup>[4]</sup>。此外, 还有一些 I 类代谢转座子由 IncP-1 质粒携带, 例如能够降解 3-氯苯甲酸的 pBRC60<sup>[7,27]</sup>。

1999 年, 从多氯联苯 (PCB) 降解菌 *Ralstonia oxalatica* A5 中分离到一种新的代谢 PCB 的 MGE<sup>[29]</sup>, 结构中包含了一个 55 kb 的联苯代谢转座子 Tn4371, 该转座子能彻底降解 4-氯联苯。与 I 类和 II 类转座子不同的是, Tn4371 是以一种“剪切/整合”的模式进行转座, 而不是通过复制模式转座。对该转座子的进一步分析表明, Tn4371 与接合转座子

表 1 不同类型代谢移动基因元件的典型示例

Table 1 Typical example of different types of catabolic mobile genetic elements

移动元件 Mobile elements	菌株 Strain	底物 Substrate	MGE 大小 Size of MGE (kb)	不相容群 Inc group	参考文献 Reference
质粒 plasmid					
pSS60	<i>Achromobacter</i> sp. LBS1 C1	4-氯苯甲酸 4-chlorobenzoic acid	53	P1	[6]
pBRC60	<i>Alcaligenes</i> sp. BR60	3-氯苯甲酸 3-chlorobenzoic acid	75	P1	[7]
pAC25	<i>Pseudomonas putida</i> AC858	3-氯苯甲酸 3-chlorobenzoic acid	117	-	[8]
pENH91	<i>Alcaligenes eutropha</i> NH9	3-氯苯甲酸 3-chlorobenzoic acid	78	P1	[9]
pJP4	<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134	2, 4-二氯苯氧乙酸 2,4-dichlorophenoxy acetic acid	75	P1	[10]
pEMT-1	Exogenously isolated from 2,4-D-treated soil	2, 4-二氯苯氧乙酸 2,4-dichlorophenoxy acetic acid	-	-	[11]
pTSA	<i>Comamonas testosteroni</i> T-2	对-甲苯磺酸 Toluene sulfonic acid	85	P1	[12]
pPCI70	<i>Pseudomonas cichori</i> 170	1, 3-二氯丙烯 1,3-dichloropropene	60	P1	[13]
pCS1	<i>Pseudomonas diminuta</i>	对硫磷 Parathion	68	-	[14]
pUU204	<i>Pseudomonas</i> sp. E4	2-氯丙酸 2-chloro-propanoic acid	293	-	[15]
pC1-3	<i>Delftia acidovorans</i> CA28	3-氯苯胺 m-chloroaniline	-	P1	[16]
pPS12-1	<i>Burkholderia</i> sp. PS12	1, 2, 4, 5-四氯苯 1,2,4,5-tetrachlorobenzene	85	P1	[17]
pP51	<i>Pseudomonas</i> sp. P51	氯苯 Chlorobenzene	-	-	[18]
pADP1	<i>Pseudomonas</i> sp. ADP	阿特拉津 Atrazine	109	-	[19]
pUO1	<i>Delftia acidovorans</i> B	卤代乙酸 Haloacetic acid	67	P1	[20]
pLB1	Exogenously isolated from HCH-contaminated soil	$\gamma$ -六氯环己烷(六六六) Hexachlorocyclohexane	66	-	[21]
pWWO (TOL)	<i>Pseudomonas putida</i> mt-2	甲苯 / 二甲苯 Toluene / dimethyl benzene	117	P9	[22-23]
pDTG1	<i>Pseudomonas putida</i> NCIB 9816-4	萘 Naphthalene	83	P9	[24]
I 型转座子 Class I transposons					
Tn5542	<i>Pseudomonas putida</i> ML2 (pHMT112)	苯 Benzene	12		[25]
Tn5280	<i>Pseudomonas</i> sp. P51 (pP51)	氯苯 Chlorobenzene	8.5		[26]
Tn5271	<i>Alcaligenes</i> sp. BR60 (pBRC60)	3-氯苯甲酸 3-chloro-Benzoic acid	17		[27]
Tn5707	<i>Ralstonia eutropha</i> NH9 (pENH91)	3-氯苯甲酸 3-chloro-benzoic acid	15		[25]
DEH	<i>Pseudomonas putida</i> PP3	氯代脂肪酸 Chloro-fatty acid	9.74		[28]
II 型转座子 Class II transposons					
Tn4651	<i>Pseudomonas putida</i> mt-2 (pWWO)	甲苯/二甲苯 Toluene / dimethyl benzene	56		[4]
Tn4653	<i>Pseudomonas putida</i> mt-2 (pWWO)	甲苯/二甲苯 Toluene / dimethyl benzene	70		[4]
Tn4656	<i>Pseudomonas putida</i> MT53 (pWW53)	甲苯 / 二甲苯 Toluene / dimethyl benzene	39		[4]
Tn4655	<i>Pseudomonas putida</i> G7 (NAH7)	萘 Naphthalene	38		[4]
其他 MGEs Other MGEs					
Tn4371	<i>Ralstonia oxalatica</i> A5	联苯/4-氯联苯 Biphenyl/4-Chlorobiphenyl	55		[29]
bph-sal element	<i>Pseudomonas putida</i> KF715	苯/水杨酸盐 Benzene/salicylate	90		[30]
clc element	<i>Pseudomonas</i> sp. B13	氯代儿茶酚 Chloroacetyl catechol	105		[3]

类似,其分子结构中包括类噬菌体整合酶基因、类假单胞菌代谢基因和类质粒转移基因。

另一类比较特殊 MGEs 具有噬菌体相关功能,被称为“*clc*-元件”,该元件是从 3-氯苯甲酸降解菌 *Pseudomonas* sp. B13 中分离出来的,编码氯代邻苯二酚降解基因。这个大小为 105 kb 的 MGE 可能是利用类似于 P4 噬菌体的整合酶进行转座,先将代谢基因从原来位置剪切下来,然后整合到新的靶 DNA 中。此外,该元件在整合过程中具有位点特异性,特异识别甘氨酸 tRNA 基因位点。在其他 MGEs 中也发现了类似的 P4 型整合酶,包括致病性基因岛 (pathogenicity island) 和共生岛 (symbiosis island),

但 *clc* 元件的整合酶包含 250 个氨基酸,比其他 P4 型整合酶都要长。编码芳香化合物降解的基因通常按整合酶类型进行分类,因此 *clc* 元件有可能成为一种新的“代谢基因岛”的代表<sup>[3]</sup>。

综上,编码一系列天然存在污染物和人造有机化合物代谢酶的基因往往由各种各样的 MGEs 携带。并且有研究表明,这些元件在环境样品中通过不同的转移、整合或复制机制使降解基因在土著微生物群落中转移,是微生物群落适应环境选择压力和构建新的污染物代谢途径的重要机制。例如,较确凿的研究证据表明,在煤焦油污染土壤中,萘双加氧酶基因在土著微生物群落中发生了自然水平基因转

移,并且其中一个萘降解质粒的水平转移是微生物群落适应煤焦油污染压力的重要机制<sup>[31]</sup>.此外,在研究一株从氯苯(CB)污染地下水中分离出来的CB降解菌时发现,由于在水体环境中细菌之间发生了基因重组,从而在该菌株中构建了一条新的CB代谢途径,这也是该菌株适应CB污染的重要机制.这种在原位发生的基因重组显著提高了环境中CB的去除率<sup>[32]</sup>.

## 2 从水平基因库(HGP)中分离MGEs的方法

在自然生境中,介导细菌水平基因转移的MGEs统称为水平基因库(horizontal gene pool, HGP)<sup>[33]</sup>.研究环境样品中MGEs的分布和多样性,首先要从环境样品HGP中分离大量MGEs,并进行全序列分析.从环境样品中分离代谢质粒的技术大致有两类:一是内源分离法(endogenous isolation),另一种是外源分离法(exogenous isolation,图1).目前研究比较透彻的代谢MGEs,大都是从可培养的污染物降解功能菌株中分离的(如表1中的大部分质粒),提取质粒后进行自我转移性和遗传多样性分析,这种传统的方法被称为内源分离法.近年来,也有一些新的代谢质粒是直接通过外源质粒分离方法获得的.例如:表1中降解2,4-D的pEMT1<sup>[11]</sup>;降解六六六的pLB1<sup>[21]</sup>;还有一些类pDTG1质粒<sup>[31-34]</sup>.

### 2.1 从纯培养菌株中分离MGEs(内源分离法)

传统内源质粒分离方法的一般技术流程为,纯培养菌株在选择性培养基(添加抗生素、重金属、有机污染物)或非选择性培养基中进行培养后,提取质粒以验证其是否存在,该技术仅适用于环境样品中优势可培养菌株含有质粒的情况.对于质粒所编码的表型特征的鉴定需要进行质粒消除(plasmid curing)试验,或者将质粒转入一个表型特征已知的宿主进一步研究.目前,分子生物学方法的应用也大大推动了质粒编码表型特征的鉴定,例如DNA探针、基因芯片及大规模高通量测序技术.然而,对质粒的全序列分析并不一定都能揭示其潜在的表型特征.例如,在植物病原菌*Xylella fastidiosa*的基因组序列中,就发现了一个隐秘质粒的存在<sup>[35]</sup>.

诸多研究表明,从不同环境样品中分离的许多菌株均含有质粒.Powell等<sup>[36]</sup>从糖甜菜叶表分离了435株细菌,其中18%含有质粒.在62株携带质粒的革兰氏阴性菌中,有61株能够转移IncQ质粒R300B.*Erwinia herbicola*和*Brenneria salicis*中的可自我转移质粒携带氨基青霉素抗性基因(Amp<sup>r</sup>)和铜抗性基因,或镍抗性基因,或镍、铜、锌抗性基因,而来自*Pseudomonas fluorescens*中的自转移质粒编码汞抗性基因.提取这些质粒DNA,与Couturier建立的inc/rep探针系统进行杂交并初步确定其不相同

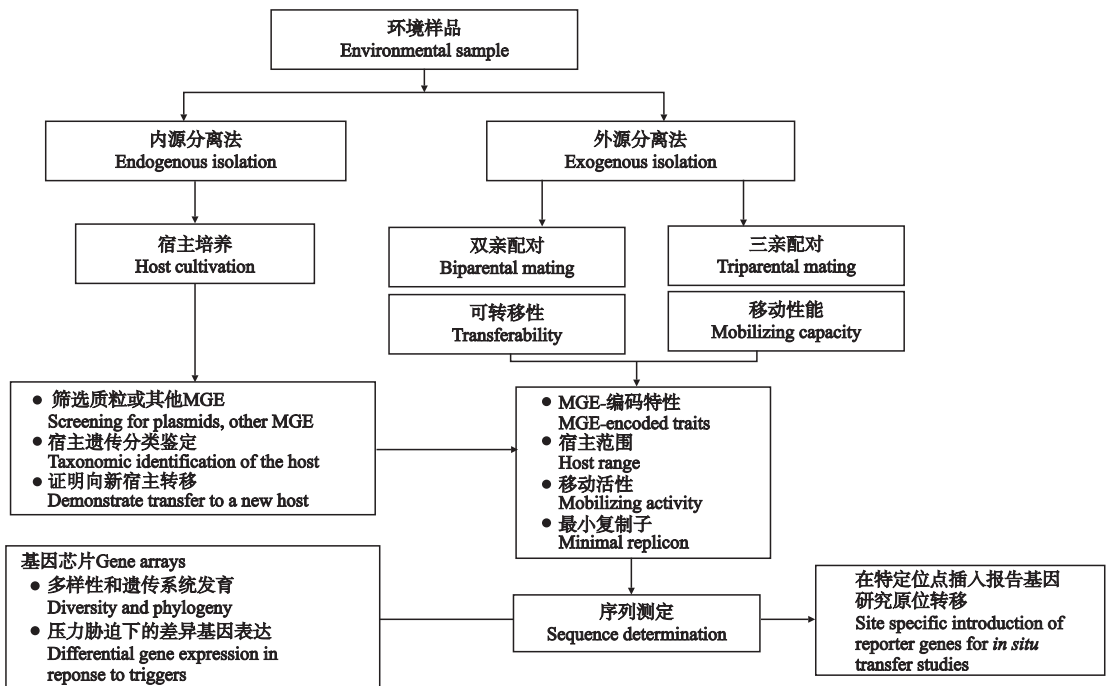


图1 自然环境微生物群落水平基因库中质粒和其他MGEs特性的研究方法

Fig. 1 Approaches for the characterization of plasmids and other MGEs from the horizontal gene pool in naturally occurring microbial communities.

群,结果表明,大部分 *Klebsiella* 和 *Erwinia* 菌株能够与 repFIB 或 repFIIA 探针杂交,而来自于其他宿主的质粒与 Couturier 探针无同源性. Sobecky 等<sup>[37-38]</sup>通过内源质粒分离法,研究了海洋底泥微生物及海滩湿地杂草根区固氮菌的质粒多样性和丰度. 从海洋底泥中所分离的菌株大部分都含有质粒,并且这些质粒均不能与 Couturier 建立的探针系统杂交. 从海洋底泥分离的  $\alpha$ -或  $\gamma$ - proteobacteria 菌株中提取的质粒大小为 5 ~ 60 kb,扩增其复制起点功能区的片段,通过杂交和序列分析表明,这些复制起点的序列与以前所报道的质粒复制起点没有同源性. 应用 RAPD 指纹图谱技术对质粒进行进一步遗传分型,结果表明,这些质粒多样性很高并且绝大多数为隐秘质粒.

内源质粒分离法的优点是可以明确知道所分离质粒的原宿主,根据宿主的特性,可以预知质粒在不同生态环境中的归宿. 但这种方法存在很大的局限性,首先,大部分细菌是不可培养的,因此这种传统的从可培养宿主中分离质粒的方法大大低估了广宿主质粒的多样性;其次,这种方法不涉及质粒的转移过程,因此在分离过程中不能确定所分离质粒的自我转移特性. 为了避免这一问题,建立了外源质粒分离(exogenous plasmid isolation)方法,其中最为常见的是“双亲配对法”和“三亲配对法”.

## 2.2 双亲配对外源分离法

双亲外源质粒分离法的基本原理为,环境样品本源微生物群落作为 MGEs 的供体,通过与带有遗传选择标记的受体菌之间进行接合转移,然后通过质粒所编码的特定表型特征筛选接合子,从而从环境样品中获得具有特定表型特征的 MGEs. Bale 等<sup>[39]</sup>首先将双亲配对外源分离技术用于从 Epilithon 河水样品中原位捕获汞抗性( $Hg^r$ )质粒. 所采用的受体菌为携带利福平抗性基因( $Rif^r$ )的 *Pseudomonas putida* KT 2440,而河水样品土著微生物群落作为携带  $Hg^r$  质粒的供体. 通过接  $Rif^r$  和  $Hg^r$  双重选择标记筛选接合子,就能够从环境样品中捕获具有自我转移特性的  $Hg^r$  质粒. 这些质粒大多具有抗 UV 的能力,但所有这些质粒都不编码抗生素抗性基因. 传统的不相容群测定表明,部分外源分离的质粒属于 IncP-7 和 IncP-13 不相容群. 目前,已有诸多报道表明,采用 *P. putida* UWC1、*P. fluorescens* R2f、*Escherichia coli* HB101、*Agrobacterium tumefaciens* UBAPF2、*Sinorhizobium meliloti* FP2-gfp 等菌株作为受体菌,利用双亲外源质粒分离技术能够成功的从

环境样品中(土壤、根际、海水、污泥)分离广宿主的重金属抗性质粒(主要为汞抗性质粒)<sup>[40-45]</sup>及抗生素抗性质粒<sup>[46-47]</sup>,但关于携带污染物降解基因的代谢 MGEs 的报道并不多.

Top 等<sup>[11]</sup>采用改进的双亲外源分离法从 2,4-D 污染土壤中成功分离了携带 2,4-D 降解基因的广宿主质粒. 所采用的受体菌为携带利福平抗性基因( $Rif^r$ )的 *Ralstonia eutropha* JMP228,根据 *EcoR* I 限制性酶切图谱,共分离了 7 个不同的质粒(pEMT1 ~ 7),其中 6 个质粒(pEMT2 ~ 7)属于 IncP-1 不相容群,而 pEMT1 有可能是一个新型的广宿主质粒. Stuart-Keil 等<sup>[31]</sup>采用萘降解菌的质粒消除菌株作为受体菌,利用双亲外源分离技术,从煤焦油污染土壤和底泥中分离出 2 个广宿主萘降解质粒,这两个质粒与分离自 *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 的萘降解质粒 pDTG1 具有很高的同源性,因此称其为类-pDTG1 质粒.

## 2.3 三亲配对外源分离法

双亲外源分离法的局限性在于,所分离的质粒必须具有特定的表型特征,才能作为筛选接合子的标记. 为了克服局限性,在双亲配对法的基础上建立了“三亲配对法”,其接合配对的三方分别为:一个携带小质粒的供体菌,该质粒可被移动但不能自我转移(Tra-Mob+),并带有一定选择标记;一个染色体带有选择标记的受体菌,该受体菌与供体菌在遗传分类上最好是属于 Proteobacteria 的不同亚纲,这样就能增加分离广宿主质粒的几率;第三方就是含有广宿主可自我转移质粒(Tra+Mob+)的环境样品. 当三方进行接合配对时,供体菌质粒(Tra-Mob+)在环境样品本源微生物群落所含有的可自我转移广宿主质粒(Tra+Mob+)的协助下转移进入受体菌,通过特定的筛选标记,就能够得到同时获得供体菌质粒和自然环境中广宿主质粒的接合子(图 2),从而大大扩展了所分离质粒的范围.

Hill 等<sup>[48]</sup>率先将三亲配对外源分离技术应用用于从环境样品中分离广宿主质粒,所选用的受体菌为 *P. putida* UWC5 ( $Rif^r$ ,  $Sm^r$ ,  $Trp^-$ ),具有  $Tra^-Mob^+$  特性的小质粒为 pD10,该质粒携带卡那霉素抗性基因( $Km^r$ )并编码氯邻苯二酚代谢的关键基因. 经与环境样品三亲配对,从岩石附生微生物群落中共分离到 54 个广宿主质粒,其中 19 个质粒携带汞抗性基因( $Hg^r$ ). Top 等<sup>[49]</sup>采用改进的三亲配对法从污染土壤和活性污泥中分离具有可自我转移特性的广宿主质粒. 选择 InQ 质粒 pMOL155 作为三亲配对体

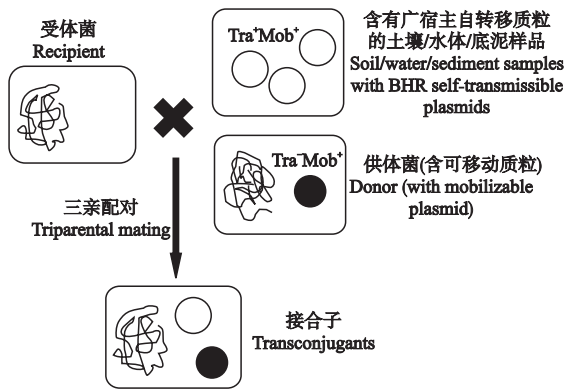


图2 采用三亲配对外源分离法从环境样品中分离自转移广宿主质粒

Fig. 2 Exogenous isolation of self-transmissible BHR plasmid from environmental samples by triparental mating.

系中的  $\text{Tra}^- \text{Mob}^+$  小质粒, 该质粒的供体菌为 *E. coli* CM330, 并携带 *czc* 基因盒; 所选用的受体菌为 *R. eutropha* AE815 ( $\text{Rif}^r$ ). 该三亲配对体系将  $\text{InQ}$  质粒从  $\gamma$ -Proteobacteria 菌株 (*E. coli*) 转移至  $\beta$ -Proteobacteria 菌株 (*R. eutropha*), 因此大大增加了所分离质粒的广宿主性. 所分离的质粒一部分属于  $\text{IncP}$  不相容群, 还有一些质粒与  $\text{IncP}$ 、 $\text{IncN}$  和  $\text{IncW}$  的特异性探针均不产生杂交信号, 表明这些质粒有可能是新型的广宿主质粒. 此后, van Elsas 等<sup>[50]</sup> 又采用 Top 等改进的三亲配对体系, 从小麦幼苗根际微生物群落中分离出一个独特的广宿主质粒 pIPO2, 该质粒能够自我转移至  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -Proteobacteria 菌株, 也能转移  $\text{IncQ}$  质粒 pIE723. 但 pIPO2 不属于任何已知的不相容群, 也不编码任何抗生素和重金属抗性基因.

尽管外源分离法较内源分离法具有很多优点, 但也存在一些缺点和局限性, 例如, 不能获得质粒原宿主的信息, 以及目前所采用的受体菌还局限于 Proteobacteria 菌株等. 因此, 为了从环境样品中分离尽可能多的广宿主质粒, 有必要综合运用多种分离技术.

### 3 MGEs 的水平基因转移 (HGT) 及其介导的生物修复

目前, 对环境污染的主要微生物修复方式为, 从实验室分离高效功能微生物并投加到环境中加速污染物的代谢. 诸多研究表明, 这种微生物修复技术对降解不同土壤有机污染物是行之有效的<sup>[51]</sup>. 但由于接种的高效降解菌与土著微生物在营养和空间上的竞争, 以及环境中各种不利条件的影响, 往往导致接种的功能微生物很难定殖或长期存活, 不能持久发

挥生物修复作用. 这一问题成为制约微生物修复技术高效、持久发挥作用的“瓶颈”. 为避免上述“瓶颈”问题, 接种携带具有特定降解基因 MGEs 的菌株是一种有效的解决方案. 接种后, 随着 MGEs 在环境中的水平基因转移 (horizontal gene transfer), 代谢基因转移至土著细菌并在其中表达, 可使具有竞争性的土著微生物获得降解能力, 从而不必考虑供体菌的存活条件<sup>[52]</sup>. 已有报道证明, 在环境样品中 (土壤、水体、生物反应器) 接种携带 MGEs 的菌株后, 确实能够发生水平基因转移, 并且通过这种基因交换使整个微生物群落降解污染物的能力有所提高. 这种由可移动降解基因元件水平转移介导的生物修复提出了与传统生物修复技术完全不同的思路和概念, 有望成为一种新的污染物生物修复途径.

#### 3.1 由广宿主代谢质粒介导的污染土壤生物修复

De Rore 等<sup>[53]</sup> 最早报道了由广宿主质粒水平转移介导的污染土壤生物修复. 供体菌 *Enterobacter agglomerans* DK3 携带一个  $\text{IncP-1}\alpha$  质粒 RP4 :: Tn4371, 该质粒在转座子 Tn4371 中插入了编码联苯降解的基因 *bph* (表 1). 在接种后的 3 ~ 5 周, 尽管供体菌很快消失了, 但质粒在土壤中发生了水平基因转移 (能够检测到接合子), 使 *bph* 基因在不同的土著微生物中表达, 从而提高了联苯的去除率.

在已有的广宿主质粒介导的环境污染物生物修复的报道中, 有关除草剂 2,4-D 降解的研究较多. diGiovanni 等<sup>[54]</sup> 的报道表明, 当土壤中添加  $1000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  2,4-D 时,  $\text{IncP-1}\beta$  质粒 pJP4 从供体菌 *Ralstonia eutropha* JMP134 转移至土著微生物群落, 从而提高了 2,4-D 的降解率. 为了将供体菌对 2,4-D 的降解与接合子区分开来, Newby 等<sup>[55]</sup> 以 *Escherichia coli* 作为质粒 pJP4 的供体菌, 该菌株本身及携带质粒时均不能降解 2,4-D. 研究结果表明, 采用 2,4-D 处理的土壤中接合子数目显著高于无污染对照, 能够降解 2,4-D 的接合子主要为 *Pseudomonas* 和 *Burkholderia*. Top 等<sup>[11]</sup> 采用较低的 2,4-D 处理浓度 ( $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 研究了不同广宿主 2,4-D 降解质粒在土壤中的接合转移及其对 2,4-D 的降解. 首先, 研究了两个 2,4-D 降解质粒 pEMT1 和 pEMT3, 从供体菌 *E. coli* 向土著微生物群落的转移, 结果表明 2,4-D 处理显著提高了接合子数量, 同时一定程度上提高了 2,4-D 的去除率. 经过脂肪酸甲酯 (FAME) 分析, 含有质粒 pEMT1 的接合子属于 *Stenotrophomonas* 和 *Ralstonia*<sup>[56]</sup>. 之后, 又采用 *P. putida* UWC3 作为质粒 pEMT1 的供体菌, 同样检测到质粒

在土壤中的转移和 2,4-D 降解率的提高,含有 pEMT1 的接合子鉴定为 *R. eutropha*<sup>[57]</sup>. 最后,比较了 2,4-D 降解质粒 pEMT1 和 pJP4 在砂壤土不同土层 A(0~30 cm)和 B(30~60 cm)中的水平转移,结果显示,这两个质粒均在 B 层发生了水平转移并能够有效促进 2,4-D 的降解. 对 B 层土壤微生物群落结构的 DGGE 分析表明,土壤中特定微生物类群通过水平基因转移获得了降解基因并增殖成为群落中的优势种群,从而提高了污染物的去除效率. 对 95 个能够利用 2,4-D 的接合子的遗传分析表明,质粒 pEMT1 和 pJP4 的宿主范围差别不大,并且 A 层和 B 层的接合子遗传归属基本相同,主要为 *Burkholderia*, *Ralstonia* 和 *Stenotrophomonas maltophilia*<sup>[58]</sup>.

此外,广宿主质粒水平基因转移介导的污染物降解还应用于根际修复中(rhizoremediation). Crowley 等<sup>[59]</sup>报道了由广宿主代谢质粒介导的 2,5-二氯苯甲酸(2,5-DCB)污染土壤的根际修复作用. 在污染土壤中种植菜豆(*Phaseolus vulgaris*)并接种携带 2,5-DCB 降解质粒的供体菌 *P. fluorescens*, 结果在接种降解质粒的土壤中发现了很多与供体菌不同的 2,5-DCB 降解菌,这些菌株被认为是获得了代谢质粒的接合子. 尽管缺少直接证据,但可以推断 2,5-DCB 降解率的提高是由质粒的水平转移介导的. Sarand 等<sup>[60]</sup>在种植松树幼苗的土壤中接种了携带 TOL 质粒的 *P. fluorescens*, 这些松树幼苗已被乳牛肝菌(*Suillus bovinus*)根际化. 经过对-甲苯甲酸盐(mTA)处理 3 个月后,发现代谢质粒转移至土壤微生物群落. 尽管没有具体测定 mTA 的去除率,但接种携带 TOL 质粒的 *P. fluorescens* 后,对植物和菌根真菌均表现出一定的保护作用. 由于处理后检测不到供体菌的存在,因此,这种保护作用可以认为是获得代谢质粒的接合子所介导的. 与根外土壤相比,菌根环境可能更有利于广宿主代谢质粒的高效转移并发挥其代谢活性,因此,菌根修复与代谢质粒水平转移的结合有可能取得更好的生物修复效果.

上述研究表明,在污染土壤中接种携带广宿主代谢质粒菌株和其后的质粒水平转移能够有效促进污染物的降解. 但在这一过程中,还存在很多影响因素,例如土壤类型、污染程度、供体菌种类、质粒、接种和培养条件等. 对这些影响因素的进一步研究,将有助于深入开发这一新的污染土壤生物修复技术.

### 3.2 活性污泥及其他污水处理反应器中代谢质粒的转移及其介导的生物修复作用

在活性污泥或其他污水处理系统中接种携带广

宿主代谢质粒菌株以促进难降解物质代谢的报道并不多,并且在这些报道中,没有具体阐明接合子对降解的促进作用. 1989 年,McClure 等<sup>[61]</sup>在加入 3-氯苯甲酸(3CBA)的活性污泥系统中接种了携带 3CBA 降解质粒的供体菌 *P. putida*, 该质粒为非接合 IncQ 质粒. 研究表明,不携带质粒的供体菌在污泥系统中能够长时间存活,但并不能降解 3CBA; 而接种携带代谢质粒的供体菌后,检测到 3CBA 的降解,但仍缺少直接证据证明这一降解过程是由代谢质粒水平转移至污泥系统本源细菌群落所介导的.

Nüsslein 等<sup>[62]</sup>在活性污泥系统中接种了基因改造菌株 *Pseudomonas* sp. B13FR1, 该菌株携带一个能够同时降解 3CBA 和 4-甲基安息香酸盐(4MBA)的非接合可移动质粒 pFRC20P. 接种 3 d 后,与未接种对照相比,3CBA 和 4MBA 的浓度显著下降. 但是由于质粒 pFRC20P 是非自我转移质粒,本身不能发生接合转移,要依赖存在于污泥系统中的接合质粒转移至污泥本源微生物群落,接合效率是非常低的. 因此,也不能够确定污染物降解是否与代谢质粒的接合转移有关.

编码氯代邻苯二酚降解的“*clc*-元件”在活性污泥和膜反应器中水平转移的报道相对较多. Ravatn 等<sup>[63]</sup>采用 *Pseudomonas* B13 作为供体菌, *P. putida* F1 作为受体菌,同时接种活性污泥系统. 这两株菌均不能降解氯苯(CB),但当 F1 接受 *clc*-元件后,通过降解途径的互补,便可以获得降解 CB 的能力. 当污泥系统中添加供体菌底物 3CBA 和 1,4-二氯苯甲酸(1,4-DCB)时,供体菌数量增加,接合效率较高. 但该研究中并未调查这种基因交换是否对污染物的降解产生影响. 由 *clc*-元件介导 3CBA 降解的直接证据来自于 Ghyoot 等<sup>[64]</sup>的报道,他们在两个不同的活性污泥系统中接种了 *P. putida* BN210, 该菌株染色体上携带 *clc*-元件. 其中一个模型为传统的活性污泥系统(CAS),另一个活性污泥系统配有膜分离装置(CAS-MS),该装置能够增加主反应器的生物量密度. 在两个反应系统中,供体菌 BN210 均消失,但在 CAS-MS 系统中,参与 3CBA 降解的种群建立的更快一些,3CBA 的降解速率也更高. 采用 PCR-DGGE 技术分析污泥系统中的 *clc* 基因,结果表明,尽管供体菌数量减少,但 *clc* 元件在反应器中始终维持较高的水平,表明该元件已转移至污泥本源微生物群落. *clc*-元件的原位水平转移在处理含 3CBA 模式废水的膜生物反应器中也有报道<sup>[65]</sup>,供体菌仍为

*P. putida* BN210. 在膜生物反应器中, 细胞间的接触十分紧密, 这促进了 MGEs 的水平转移效率. 接种后, 供体菌逐渐消失, 而被一些新的 3CBA 降解种群所取代; 而在未接种的反应器中, 并未分离到 3CBA 降解菌, 也未检测到 3CBA 的降解. 采用 *clc*-元件特异探针与基因组 DNA 进行 Southern 杂交和倒转电场凝胶电泳 (field inversion gel electrophoresis, FIGE), 分析表明, 在 3CBA 降解菌株中存在一个或多个 *clc*-元件拷贝. 这些数据充分证明了新的 3CBA 降解种群是通过 *clc* 基因的原位水平转移而获得降解能力的, 而这些本源微生物在活性污泥系统中比供体菌更具有竞争力.

上述几例报道表明, 由代谢基因转移介导的生物修复作用在污水处理反应器中的效果与土壤系统相比并不十分理想. 这可能是由于在污水处理系统中的相关研究较少, 因此对该系统中促进或抑制 MGEs 水平转移的因素还不是十分清楚. 质粒发生接合转移的主要条件为细胞密度, 以使供体菌和受体菌发生紧密接触. Mancini 等<sup>[66]</sup> 的研究表明, 在细胞密度较高的初沉池中, 接合子数量最多, 而细胞密度较低的二沉池接合子数量较低. 因此, 有必要更深入地研究在活性污泥系统中哪些是接合转移发生的热点区域. 尽管目前在活性污泥及其他污水处理反应器中, 有关代谢基因转移介导的生物修复作用研究还很少, 但我们相信在这些生态系统中接种 MGEs 仍是促进污染物降解的有效手段之一.

#### 4 问题与展望

代谢 MGEs 的水平转移是环境样品本源微生物群落适应污染物 (特别是人造异生化合物) 选择压力和促进污染物降解的重要机制之一. 本文重点阐述了环境样品中参与污染物降解的 MGEs, 介绍了从环境样品中分离携带特定降解基因 MGEs 的方法, 并以土壤和污水处理反应器两个生态系统为例, 列举了通过接种携带 MGEs 的菌株从而促进污染物降解的几个实例. 但相关领域的研究仍有很多问题需要进一步探索, 例如, 环境中的水平基因转移是如何发生的, 在哪里发生的, 以什么速率发生以及在哪些微生物之间发生? MGEs 在环境样品中是如何维持稳定的, 在没有环境选择压力的条件下, 它们是否还能稳定存在于微生物群落中, 能维持多久? 这些特定遗传元件的转移是否存在物种间的屏障? 它们的前体基因是什么? 此外, 利用 MGEs 治理环境污染, 还必须考虑 MGEs 释放到环境中后的生物安全

性问题. 为了回答这些问题我们需要更多了解 HGT 调控的分子机制, 以及 MGEs 捕获基因的方式.

采用外源和内源分离方法从水平基因库中分离 MGEs, 是研究 MGEs 多样性的重要前提. 但是, 正如文中所述, 几种 MGEs 分离方法各有优缺点, 因此综合运用图 2 中总结的多种方法从环境样品中分离 MGEs, 才能更完整的获得样品中 MGEs 的多样性和丰度信息, 也能更好的了解它们对细菌基因组进化的贡献. 随着 MGEs 的序列信息越来越丰富, 使我们能够采用基因芯片技术对更多新分离的 MGEs 进行分析. 例如, 将广宿主质粒全序列以 PCR 产物或寡核苷酸的形式制作高密度基因芯片, 对我们研究新分离 MGEs 的遗传系统发育关系具有重要作用. 此外, 随着基因组学和蛋白质组学研究工具的飞速发展, 使我们能够研究更多新的问题, 例如在复杂微生物群落体系中 MGEs 的生态学, 或者 MGEs 之间的相互作用, 以便更好地了解它们的生态功能.

由于在土壤和污水处理反应器生态系统中存在诸多限制因素, 携带降解基因的 MGEs 的水平转移与环境污染降解之间的关系尚不明确, 还需要进一步探索. 例如, 探究在这些生态系统中促进基因转移的条件; 某些携带降解基因的 MGEs 的天然宿主范围及其代谢基因的表达范围; 接合子在环境中的竞争适应能力; 低浓度污染物存在时 MGEs 在环境样品中的动态. 此外, 我们还要了解在土壤、水体、生物膜等微环境中, 细菌之间相互作用的调控信号, 例如在微环境中细菌的生理和运动行为; 它们在群落水平对污染胁迫的响应; 在环境样品中本源存在的 MGEs 是如何产生的以及它们的可转移活性; 影响群落-菌株行为、基因转移和突变率的环境因素等. 检测微生物群落和基因功能的分子生物学工具的进一步发展将对这些研究起到促进和推动作用.

对于携带污染物降解基因的 MGEs 的宏观和微观行为的深入研究将有助于我们了解污染环境胁迫下微生物群落适应污染物胁迫的生态学过程, 并探索促进污染物降解的新的生物修复手段. 尽管国外在相关领域已开展了诸多研究, 但国内尚未有科研人员关注这一领域, 相关研究也处于空白阶段. 我国幅员辽阔, 环境复杂多样, 必然蕴藏着丰富的 MGEs 资源. 本综述旨在让国内更多微生物分子生态学领域的学者了解这一领域, 以便为以后相关工作的开展奠定基础.

#### 参考文献

- [1] Davies J. Inactivation of antibiotics and the dissemina-



- tion of resistance genes. *Science*, 1994, **264**: 375–382
- [2] Top EM, Mo anne-Loccoz Y, Pembroke T, *et al.* Phenotypic traits conferred by plasmids// Thomas CM, ed. *The Horizontal Gene Pool Bacterial Plasmids and Gene Spread*. Amsterdam, the Netherlands: Harwood Academic Publishers, 2000: 249–285
- [3] van der Meer JR, Ravatn R, Sentchilo V. The *clc* element of *Pseudomonas* sp. strain B13 and other mobile degradative elements employing phage-like integrases. *Archives of Microbiology*, 2001, **175**: 79–85
- [4] Tsuda M, Tan HM, Nishi A, *et al.* Mobile catabolic genes in bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 1999, **87**: 401–410
- [5] Szpirer C, Top E, Couturier M, *et al.* Retrotransfer or gene capture: A feature of conjugative plasmids, with ecological and evolutionary significance. *Microbiology*, 1999, **145**: 3321–3329
- [6] Layton AC, Sansverino J, Wallace W, *et al.* Evidence for 4-chlorobenzoic acid dehalogenation mediated by plasmids related to pSS50. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, **58**: 399–402
- [7] Wyndham RC, Cashore AE, Nakatsu CH, *et al.* Catabolic transposons. *Biodegradation*, 1994, **5**: 323–357
- [8] Chatterjee DK, Kellog ST, Hamada S, *et al.* Plasmid specifying total degradation of 3-chlorobenzoate by a modified *ortho* pathway. *Journal of Bacteriology*, 1981, **146**: 639–646
- [9] Ogawan N, Miyashita K. The chlorocatechol-catabolic transposon Tn5707 of *Alcaligenes eutrophus* NH9 carrying a gene cluster highly homologous to that in the 1, 2, 4-trichlorobenzene-degrading bacterium *Pseudomonas* sp. strain P51, confers the ability to grow on 3-chlorobenzoate. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, **65**: 724–731
- [10] Don RH, Pemberton JM. Properties of 6 pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *A. eutrophus*. *Journal of Bacteriology*, 1981, **145**: 681–686
- [11] Top EM, Holben WL, Forney LJ. Characterization of diverse 2,4-D degradative plasmids isolated from soil by complementation. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, **61**: 1691–1698
- [12] Tralau T, Cook AM, Ruff J. Map of the IncP beta plasmid pTSA encoding widespread genes (*tsa*) for p-toluenesulfonate degradation in *Comamonas testosteroni* T-2. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67**: 1508–1516
- [13] Poelarends GJ, Kulakov LA, Larkin MJ, *et al.* Degradation of 1,3-dichloropropene by *Pseudomonas cichorii* 170. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64**: 2931–2936
- [14] Mulbry WW, Karns JS, Kearny PC, *et al.* Identification of a plasmid borne parathion hydrolase gene from *Flavobacterium* sp. by southern hybridization with *opd* from *Pseudomonas dimunita*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1986, **51**: 926–930
- [15] Hardman DJ, Gowland PC, Slater JH. Large plasmids from soil bacteria enriched on halogenated alkanolic acids. *Applied and Environmental Microbiology*, 1986, **51**: 44–51
- [16] Boon N, Goris J, de Vos P, *et al.* Genetic diversity among 3-chloroaniline and aniline degrading strains of the *Comamonadaceae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67**: 1107–1115
- [17] Beil S, Timmis KN, Pieper DH. Genetic and biochemical analyses of the *tec* operon suggest a route for evolution of chlorobenzene degradation genes. *Journal of Bacteriology*, 1999, **181**: 341–346
- [18] Werlen C, Kohler HPE, van der Meer JR. The broad substrate chlorobenzene dioxygenase and *cis*-chlorobenzene dihydrodiol dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. P51 are linked evolutionarily to the enzymes for benzene and toluene degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, **271**: 4009–4016
- [19] de Souza ML, Wackett LP, Sadowsky MJ. The *atzABC* genes encoding atrazine catabolism are located on a self-transmissible plasmid in *Pseudomonas* sp. strain ADP. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64**: 2323–2326
- [20] Sota M, Kawasaki H, Tsuda M. Structure of haloacetate-catabolic IncP-1beta plasmid pUO1 and genetic mobility of its residing haloacetate-catabolic transposon. *Journal of Bacteriology*, 2003, **185**: 6741–6745
- [21] Miyazaki R, Sato Y, Ito M, *et al.* Complete nucleotide sequence of an exogenously isolated plasmid, pLB1, involved in  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, **72**: 6923–6933
- [22] Benson S, Shapiro J. TOL is a broad-host-range plasmid. *Journal of Bacteriology*, 1978, **135**: 278–280
- [23] Arango Pinedo C, Smets BF. Conjugal TOL transfer from *Pseudomonas putida* to *P. aeruginosa*: Effects of restriction proficiency, toxicant exposure, cell density ratios, and conjugation detection method on observed transfer efficiencies. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, **71**: 51–57
- [24] Dennis JJ, Zylstra GJ. Complete sequence and genetic organization of pDTG1, the 83 kilobase naphthalene degradation plasmid from *Pseudomonas putida* strain NCIB 9816-4. *Journal of Molecular Biology*, 2004, **341**: 753–768
- [25] Tan HM. Bacterial catabolic transposons. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, **51**: 1–12
- [26] van der Meer JR, Zehnder AJB, de Vos WM. Identification of a novel composite transposable element Tn5280, carrying chlorobenzene dioxygenase genes of *Pseudomonas* sp. strain P51. *Journal of Bacteriology*, 1991, **173**: 7077–7083
- [27] Nakatsu C, Ng J, Singh R, *et al.* Chlorobenzoate catabolic transposon Tn5271 is a composite class I element with flanking class II insertion sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, **88**: 8312–8316
- [28] Weightman AJ, Topping AW, Hill KE, *et al.* Transposition of DEH, a broad-host-range transposon flanked by

- ISPPu12, in *Pseudomonas putida* is associated with genomic rearrangements and dehalogenase gene silencing. *Journal of Bacteriology*, 2001, **184**: 6581–6591
- [29] Merlin C, Springael D, Toussaint A. Tn4371: A modular structure encoding a phage-like integrase, a *Pseudomonas*-like catabolic pathway and RP4/Ti-like transfer functions. *Plasmid*, 1999, **41**: 40–54
- [30] Nishi A, Tominaga K, Furukawa K. A 9-kilobase conjugative chromosomal element coding for biphenyl and salicylate catabolism in *Pseudomonas putida* KF715. *Journal of Bacteriology*, 2000, **182**: 1949–1955
- [31] Stuart-Keil KG, Hohnstock AM, Drees KP, et al. Plasmids responsible for horizontal transfer of naphthalene catabolism genes between bacteria at a coal tar-contaminated site are homologous to pDTG1 from *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64**: 3633–3640
- [32] van der Meer JR, Werlen C, Nishino SF, et al. Evolution of a pathway for chlorobenzene metabolism leads to natural attenuation in contaminated groundwater. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64**: 4185–4193
- [33] Espinosa M, Cohen S, Couturier M, et al. Plasmid replication and copy number control// Thomas CM, ed. The Horizontal Gene Pool Bacterial Plasmids and Gene Spread. Amsterdam, the Netherlands: Harwood Academic Publishers, 2000: 1–47
- [34] Ono A, Miyazaki R, Sota M, et al. Isolation and characterization of naphthalene-catabolic genes and plasmids from oil-contaminated soil by using two cultivation-independent approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, **74**: 501–510
- [35] Simpson AJ, Reinach FC, Arruda P, et al. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella fastidiosa* Consortium of the Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis. *Nature*, 2000, **406**: 151–157
- [36] Powell BJ, Purdy KJ, Thompson IP, et al. Demonstration of *tra*<sup>+</sup> plasmid activity in bacteria indigenous to the phyllosphere of sugar beet; gene transfer to a recombinant pseudomonad. *FEMS Microbiology Ecology*, 1993, **12**: 195–206
- [37] Sobczyk PA, Mincer TJ, Chang MC, et al. Plasmids isolated from marine sediment microbial communities contain replication and incompatibility regions unrelated to those of known plasmid groups. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **63**: 888–895
- [38] Cook MA, Osborn AM, Bettendorff J, et al. Endogenous isolation of replicon probes for assessing plasmid ecology of marine sediment microbial communities. *Microbiology*, 2001, **147**: 2089–2101
- [39] Bale MJ, Day MJ, Fry JC. Novel method for studying plasmid transfer in undisturbed river Epilithon. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, **54**: 2756–2758
- [40] Lilley AK, Fry JC, Day MJ, et al. *In situ* transfer of an exogenously isolated plasmid between *Pseudomonas* spp. in sugar beet rhizosphere. *Microbiology*, 1994, **140**: 27–33
- [41] Dahlberg C, Linberg C, Torsvik VL, et al. Conjugative plasmids isolated from bacteria in marine environments show various degrees of homology to each other and are not closely related to well characterized plasmids. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **63**: 4692–4697
- [42] Dahlberg C, Bergström M, Andreason M, et al. Interspecies bacterial conjugation by plasmids from marine environments visualized by *gfp* expression. *Molecular Biology and Evolution*, 1998, **15**: 385–390
- [43] Smit E, Wolters A, van Elsas JD. Self-transmissible mercury resistance plasmids with gene-mobilizing capacity in soil bacterial populations: Influence of wheat roots and mercury addition. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64**: 1210–1219
- [44] Drønen AK, Torsvik V, Goksvyr J, et al. Effect of mercury addition on plasmid incidence and gene mobilizing capacity in bulk soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 1998, **27**: 381–394
- [45] Schneiker S, Keller M, Dröge M, et al. The genetic organization and evolution of the broad-host-range mercury resistance plasmid pSB102 isolated from a microbial population residing in the rhizosphere of alfalfa. *Nucleic Acids Research*, 2001, **29**: 5169–5181
- [46] Dröge M, Pühler A, Selbitschka W. Phenotypic and molecular characterization of conjugative antibiotic resistance plasmids isolated from bacterial communities of activated sludge. *Molecular and General Genetics*, 2000, **263**: 471–482
- [47] Smalla K, Heuer H, Götz A, et al. Exogenous isolation of antibiotic resistance plasmids from piggery manure slurries reveals a high prevalence and diversity of IncQ-like plasmids. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**: 4854–4862
- [48] Hill KE, Weightman AJ, Fry JC. Isolation and screening of plasmids from the epilithon which mobilize recombinant plasmid pD10. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, **58**: 1292–1300
- [49] Top E, De Smet I, Verstraete W, et al. Exogenous isolation of mobilizing plasmids from polluted soils and sludges. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, **60**: 831–839
- [50] Van Elsas JD, McSpadden Gardener BB, Wolters AC, et al. Isolation, characterization, and transfer of cryptic gene-mobilizing plasmids in the wheat rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64**: 880–889
- [51] Dejonghe W, Boon N, Seghers D, et al. Bioaugmentation of soils by increasing microbial richness: Missing links. *Environmental Microbiology*, 2001, **3**: 649–657
- [52] Top EM, Springael D, Boon N. Catabolic mobile genetic elements and their potential use in bioaugmentation of polluted soils and waters. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, **42**: 199–208
- [53] 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 break-

- down. *FEMS Microbiology Ecology*, 1994, **15**: 71–81
- [54] DiGiovanni GD, Neilson JW, Pepper IL, *et al.* Gene transfer of *Alcaligenes eutrophus* JMP134 plasmid pJP4 to indigenous soil recipients. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**: 2521–2526
- [55] Newby DT, Josephson KL, Pepper IL. Detection and characterization of plasmid pJP4 transfer to indigenous soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**: 290–296
- [56] Top EM, Van Daele P, De Saeyer N, *et al.* Enhancement of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) degradation in soil by dissemination of catabolic plasmids. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1998, **73**: 87–94
- [57] Top EM, Maila MP, Clerinx M, *et al.* Methane oxidation as a method to evaluate the removal of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) from soil by plasmid mediated bioaugmentation. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, **28**: 203–213
- [58] Dejonghe W, Goris J, El Fantroussi S, *et al.* Effect of dissemination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) degradation plasmids on 2,4-D degradation and on bacterial community structure in two different soil horizons. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**: 3297–3304
- [59] Crowley DE, Brennerova MV, Irwin C, *et al.* Rhizosphere effects on biodegradation of 2,5-dichlorobenzoate by a luminescent strain of root-colonizing *Pseudomonas fluorescens*. *FEMS Microbiology Ecology*, 1996, **20**: 79–89
- [60] Sarand I, Haario H, Jørgensen KS, *et al.* Effect of inoculation of a TOL plasmid containing mycorrhizosphere bacterium on development of Scots pine seedlings, their mycorrhizosphere and the microbial flora in *m*-toluate-amended soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, **31**: 127–141
- [61] McClure NC, Weightman AJ, Fry JC. Survival of *Pseudomonas putida* UWC1 containing cloned catabolic genes in a model activated sludge unit. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, **55**: 2627–2634
- [62] Nüsslein K, Maris D, Timmis K, *et al.* Expression and transfer of engineered catabolic pathways harbored by *Pseudomonas* spp. introduced into activated sludge microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, **58**: 3380–3386
- [63] Ravatn R, Zehnder AJB, van der Meer JR. Low frequency horizontal transfer of an element containing the chlorocatechol degradation genes from *Pseudomonas putida* F1 to indigenous bacteria in laboratory-scale activated-sludge microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64**: 2126–2132
- [64] Ghyoot W, Springael D, Dong Q, *et al.* Bioaugmentation with the *clc*-element carrying *Pseudomonas putida* BN210 in a membrane separation bioreactor. *Water Science and Technology*, 2000, **41**: 279–286
- [65] Springael D, Peys K, Ryngaert A, *et al.* Community shifts in a seeded 3-chlorobenzoate degrading membrane biofilm reactor: Indications for involvement of *in situ* horizontal transfer of the *clc*-element from inoculum to contaminant bacteria. *Environmental Microbiology*, 2002, **4**: 70–80
- [66] Mancini P, Fertels S, Nave D, *et al.* Mobilization of plasmid pHSV106 from *Escherichia coli* HB101 on a laboratory-scale waste treatment facility. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987, **53**: 665–671

---

作者简介 李 慧,女,1977年生,博士,副研究员.主要从事微生物分子生态学和生物修复技术研究. E-mail: huili@iae.ac.cn

责任编辑 肖 红

---