

土壤重金属污染植物修复及基因技术的应用

武正华, 张宇峰, 王晓蓉, 胡 忻

(污染控制与资源化国家重点实验室, 南京大学环境学院, 江苏 南京 210008, ekxr@nera.nju.edu.cn)

摘 要: 叙述了植物修复基本内容, 重点介绍了基因技术在植物修复中的应用。文章认为, 与传统的修复技术相比, 污染土壤植物修复技术由于具有成本低、不破坏环境、保护人类健康和易为大众接受等优点而引起了人们极大的关注, 但是, 应用于修复的植物往往植株矮小、生长速度慢, 近年来, 国外出现了将基因技术应用到植物修复中的研究, 能有效地克服上述缺点。将基因技术应用于植物修复将是今后该领域研究的一个重要方向。

关键词: 重金属污染; 植物修复; 基因技术

中图分类号: X53 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000 – 0267(2002)01 – 0084 – 03

Application of Gene Technology in Phytoremediation for Contaminated Soil by Heavy Metals

WU Zheng-hua, ZHANG Yu-feng, WANG Xiao-rong, HU Xin

(State Key Laboratory of Pollution Control and Resources Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, P. R. China, ekxr@nera.nju.edu.cn)

Abstract: Soil pollution by heavy metals has become a global problem and urgently needs to be solved. Compared with traditional technology for recovery of polluted soil by heavy metals, phytoremediation technology exhibits such advantages as lower cost, protecting environment and easy acceptance to public, facilitating much attention from scientific field. The present paper describes in detail about phytoremediation of type, mechanism of the technology, advantage and disadvantage, application of gene technology in improving remediation ability and so on. It may be suggested that applying gene technology be an important aspect of phytoremediation.

Keywords: heavy metals; phytoremediation; gene engineering

土壤重金属污染对环境产生危害主要有下列途径: ①土壤中的重金属通过雨水淋溶作用向下渗透, 可能导致地下水的污染; ②受污染的土壤直接暴露环境中, 通过土壤颗粒物等形式能直接或间接地为人或动物所吸收; ③外界环境条件的变化如酸雨、施加某些土壤添加剂等因素提高了土壤中重金属的生物可利用性, 使得重金属较容易为植物吸收利用而进入食物链, 对食物链上的生物产生毒害。与有机污染物不同的是, 由于土壤中的重金属具有生物不可降解性和相对的稳定性, 使得重金属污染土壤的修复比较困难。

传统的污染土壤修复方法有客土法、化学冲洗法、电化学等。近年来, 在国外出现了利用植物来原位修复污染土壤的方法, 与传统的土壤修复方法相比, 该方法具有成本低、不破坏生态环境和易为大众接受等优点。并给这种技术取了一个专门的名词——植物修复(phytoremediation)。

1 植物修复技术

根据 Cunningham^[1]等人的定义, 植物修复是利用绿色植物

来转移、容纳或转化污染物使其对环境无害。植物修复的对象是重金属、有机物或放射性元素污染的土壤及水体。

土壤重金属的植物修复主要分为下面几种: ①植物提取(phytoextraction): 重金属富集能力较高的植物通过吸收和转运过程, 将重金属富集在可收割的部位; 能应用于植物提取的植物往往是一些超累积植物(hyperaccumulator); ②植物转化(phytotransformation): 在植物的根部或其它部位通过新陈代谢作用将重金属转为无害的形态^[2]; ③植物挥发(phytovolatilization): 利用一些植物的生理活动来促使重金属转变为可挥发的形态, 继而从土壤和植物表面逸出; ④植物固定(phytostabilization): 利用植物活动来降低重金属的活动性, 使其不能为生物所利用, 如植物枝叶分解物、根系分泌物对重金属的固定作用、腐殖质对金属离子的螯合作用等过程^[3]; ⑤植物促进(phytostimulation): 植物本身不能吸收重金属, 但植物的根系分泌物如氨基酸、糖、酶等物质可促进根系周围土壤的微生物的活性和生化反应, 有利于重金属的释放和微生物的吸收^[4]。

为了提高植物的修复效果, 可以采用如下措施: ①从大量的植物中筛选出针对某种污染物有明显修复能力的植物; ②改进农业措施, 如添加肥料、有机配体(如 EDTA、柠檬酸盐)等, 提高土壤中重金属的生物可利用性和植物的吸收能力; ③通过生物技术, 提高控制植物吸收、转化的重金属限速酶(rate – limiting

收稿日期: 2001 – 03 – 23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(296770060)

作者简介: 武正华(1971—), 男, 讲师, 在读博士, 现主要从事污染土壤的修复研究

联系人: 王晓蓉。

enzymes)的表达水平;或者,引入新基因,培育出应用于植物修复的全新品种。

2 基因技术的应用

2.1 原因

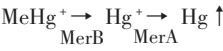
超累积植物对重金属的富集能力比普通植物高出几十倍到几百倍,到目前为止,在美国、澳大利亚、新西兰等地发现了 500 多种超累积植物。随着研究的深入,人们发现超累积植物往往植株矮小,生长速度慢,再加上受气候、土壤环境的限制,这些超累积植物很难具有实际应用价值,而生长速度快、生物量大的植物往往对重金属忍耐力低,组织中富集量不高。为了解决这个矛盾,使得普通植物具有超累积植物的优良性能,国外已有将基因技术应用于植物修复的研究。H. M. Chen(2000)等人认为将基因技术应用于植物修复将成为今后该领域研究的一个重要方向,有可能导致植物修复的革命性的突破。

2.2 方法

首先识别出对重金属耐性强或累积性高的生物,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。最后,要将转基因植物进行田间实验,确定是否达到目的^[5]。

2.3 引入金属吸入相关酶的基因

研究发现,具有汞离子还原酶基因(merA)的细菌不仅能还原 Hg^{2+} , 对 Au^{3+} 和 Ag^{+} 也有一定的还原能力。Rugh (1998) 将 merA 引入到 *Arabidopsis thaliana*, 发现转基因的植物抗汞能力提高了 3—4 倍,并提高了对汞的吸收能力;这种植物对 Au^{3+} 抗性也得到提高^[6]。另一项研究发现,将 merB 基因引入 *Arabidopsis thaliana*, 转基因植物能有效地将甲基汞和其它形式的有机汞转化为无机汞,前者的毒性是后者的 100 倍^[7]。进一步对上述两种转基因植物进行杂交,通过对汞在植物体内转化的定量分析,认为在植物体内发生如下过程:



其中 $MeHg^{+}$: 有机汞; MerB: 有机汞裂解酶; MerA: 汞离子还原酶。发现仅 MerB 的合成与汞挥发速率呈正相关,由此推断有机汞的裂解是限速步骤,决定了整个反应的速率^[8]。

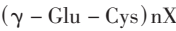
Varvara P. Grichko 等 (2000) 将细菌中的 1-氨基环丙烷-1-羧酸 (ACC) 脱氨基酶基因引入到番茄 *Lycopersicon esculentum* 后,分别在启动子 35S(来源于花椰菜同源嵌合体病毒)、rolD(来源于 *Agrobacterium rhizogenes*) 和 PRB-1b(来源于番茄)的控制下,番茄具有了对 Cd、Co、Cu、Ni、Pb 和 Zn 的耐性并分别不同程度地提高了这些重金属在植物组织中富集,尤其是在 PRB-1b 启动子的控制下,与对照组相比,对 Cd、Cu 富集能力分别提高了 5 倍、3 倍,在叶子中浓度分别达到 $35\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $53\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (湿重)^[9]。ACC 酶能将 ACC 转变为 α -丁酮酸盐和氨,降低植物体内乙烯的合成,植物中的乙烯能促进植物早熟。ACC 脱氨基酶基因的表达能促进植物的持续生长,从而提高对重金属的吸收,在某些情况下,能提高重金属在茎/叶中的比例。

2.4 调控植物体内有机配体的合成,影响植物对重金属的吸收、运转

植物体内存在大量的有机配体如柠檬酸、金属硫蛋白 (MTs)、植络素 (phytochelatin)、谷胱甘肽 (glutathione)、组氨酸等,这些物质能与重金属形成配合物,影响或参与了重金属的吸收、转运、累积等过程。

柠檬酸能与多种金属配合,尤其是与 Al^{3+} 配合,某些对铝有抗性的植物能持续分泌柠檬酸到根际土壤,从而有效地抑制 Al^{3+} 对植物的毒害。柠檬酸合成酶是 Krebs 循环中的一种酶,能将乙酰基与草酰乙酸合成柠檬酸。番木瓜和番茄引入细菌柠檬酸合成酶基因,能有效提高植物中柠檬酸的含量,抑制 Al^{3+} 的吸收和毒害^[10]。

长期以来一直认为植物对金属的耐性、累积性与植物中两种富含半胱氨酸的多肽有关: 金属硫蛋白 (MTs)、植络素 (PCs), 它们中的巯基 ($-SH$) 能与多种重金属键合。金属硫蛋白 (MTs) 除了具有多种生物功能,还能降低重金属对植物的伤害和促进植物对重金属的吸收。金属硫蛋白基因可以从人、小白鼠、中国仓鼠、酵母等获得。许多研究表明,番茄等植物引入 MTs 基因后,可以提高植物组织中金属硫蛋白的含量,能明显提高植物对 Cd、Cu 等的耐性或增加对它们的吸收, *A. thaliana* 经转基因后对 Cu 的吸收能力提高了 7 倍^[11-13]。植络素 (PCs) 是非核糖体合成的多肽,具有如下结构:



其中 n 为 2—11; Glu 为谷胱甘肽; Cys 为半胱氨酸; X 通常为 Gly(甘氨酸)。植络素能与营养元素和有毒金属形成配合物,促进这些元素向液泡中运输。近年来,许多动物、植物和真菌中植络素合成酶基因已被鉴别,引入这些基因的转基因植物能合成含量较高的植络素,并提高了植物对 Cd 的耐性和累积^[14]。

Kramer 等 (1996) 在《Nature》上首次报导了组氨酸对于重金属运输、累积的作用,发现 Ni 的超累积植物 *Alyssum* 植物伤流液中组氨酸与镍含量成正相关,组氨酸在植物体内与 Ni^{2+} 配位,能提高植物对 Ni^{2+} 的耐受性并促进 Ni^{2+} 在植物中的运输;对于非累积植物,添加外源组氨酸成百倍地提高了伤流液中 Ni^{2+} 的输出量^[15]。可以预测,如果能找到控制组氨酸合成基因,提高植物中组氨酸的含量,就有可能提高植物对 Ni 的吸收。

2.5 其它潜在的研究领域

超累积植物也是提供有修复价值基因的一个重要来源,但前提是必须详细了解这些植物的超累积机理和对控制基因的鉴别。表 1 列举了一些重金属的超累积植物,这些植物能提供丰富的基因资源。

为了提高植物修复的效果,往往人工添加一些化学配体如 EDTA 等来提高重金属生物可利用性,但 EDTA 的加入会提高修复成本并可能对环境产生影响,如对土壤微生物的毒害、污染物迁移等;植物修复的深度也受植物根系长度的限制。如果通过基因技术,促进植物根系生长和有机酸的分泌,就能够避免由于人工添加配体所带来的负面效应。

3 展望

植物修复研究尽管起步较晚,但由于成本低、有益于环境

表 1 一些重金属的超累积植物		
Table1 List of the plants capable of over – accumulation on some heavy metals		
重金属	超累积植物	浓度 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (干物质)
Cu	<i>Ipomoea alpina</i>	12 300(茎) ^[16]
Cd	<i>Thlaspi caerulenscens</i>	1 800(茎) ^[16]
Pb	<i>T. rotundifolium</i>	8 200(茎) ^[16]
Zn	<i>Thlaspi caerulenscens</i>	51 600(茎) ^[16]
Mn	<i>Macadamia neurophylla</i>	51 800(茎) ^[16]
Co	<i>Haumaniastrum robertii</i>	10 200(茎) ^[16]
Ni	<i>Berkheya coddii</i>	7 880(地上部分) ^[17]
Re	铁芒萁(<i>Dicranopteris dichodoma</i>)	3 000(地上部分) ^[17]

等优点而备受欢迎并得到迅速发展,可广泛地应用于矿山恢复、改良重金属污染的土壤等。但是,植物修复技术本身还有待进一步的发展,将植物修复应用到实际中去还有许多问题需要解决,需要生物学、土壤学、植物学、基因技术、环境化学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)继续对超累积植物的寻找和及超累积机理的研究

目前发现的 500 多种超累积植物主要集中在北美洲、大洋洲和欧洲等发达的国家。中国物种资源丰富,但发现的超累积植物比较少。鉴别超累积植物的一个简单而有效的方法是到矿区采集各种植物进行分析,如在稀土矿区、铜矿区发现了各自的超累积植物^[16、17]。但这样做的缺点是工作量大和可能失去许多潜在的有价值的超累积植物,利用根毛(hairy root)在实验室内确定植物对重金属的生物吸收能力和长期累积能力的新方法正在被建立^[18],该方法能克服自然条件的限制,加快对超累积植物的筛选速度。多种重金属超累积植物的寻找是一项有意义的基础性工作,是超累积机理研究的前提并为转基因研究提供丰富的基因资源。

(2)转基因技术的进一步研究

已有研究结果足以表明,无论从市场角度还是科研角度,基因技术领域研究很有价值。尽管如此,进行基因技术研究也会面临一些问题,如转基因植物可能会对当地生物群落产生威胁,或者,由于转基因植物与野生植物杂交,使后代失去转基因植物的某些特征;公众对转基因植物的态度是影响该领域研究的一个关键因素。该领域的研究包括有价值基因的筛选、扩大目标植物的范围、转基因植物对环境的影响、转基因植物遗传性能的研究、相关立法等研究。

(3)植物-微生物体系修复的研究

将适合某种污染的真菌接种在超累积植物,就有可能促进植物的修复作用。植物-微生物体系修复的研究内容包括:针对特定污染的最合适微生物的筛选、土壤性质对微生物生长的影响和植物-微生物相互作用机理等研究内容^[19]。

(4)植物修复与传统的化学、物理方法相结合的综合技术的研究。

有研究表明,将电化学、土壤淋洗法和植物提取法综合应用到土壤修复中,比使用任何单一方法效果要好,这是由于电流能有效地将吸附的重金属从土壤颗粒中释放出来,含配体的溶液能提高土壤溶液中重金属的浓度,植物利用根系巨大

的表面积将溶液中金属离子或金属配位离子进行吸附、吸收和进一步转运。Scott Cunningham(1996)认为,综合技术可以弥补单一技术的缺陷,有利于在短时间内推上市场,综合技术的研究跨越多种学科,将丰富土壤修复的研究内容^[19]。

参考文献:

[1] Cunningham S D, et al. Remediation of contaminated soil with green plants: an overview[J]. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1993, 29: 207 – 212.

[2] Cunningham S D, et al. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants[J]. *Adv Agron*, 1996, 56: 55 – 114.

[3] Marcia Pletsch, et al. Novel biotechnology approaches in environmental remediation research: Biotechnological approaches in environmental research[J]. *Biotechnology Advances*, 1999, 17: 679 – 687.

[4] Blaylock M J, et al. Enhanced accumulation of lead in Indian Mustard by soil – applied chelating agents[J]. *Environ Sci Technol*, 1997, 31: 860 – 865.

[5] NEDELKOSK T V, et al. Characteristic of heavy metal uptake by plant species with potential for phytoremediation[J]. *Minerals Engineering*, 2000, 13(5): 549 – 561.

[6] Bizily S P, et al. phytoremediation of methylmercury pollution : merB expression in *Arbidopsis thaliana* confers resistance to organomercurials [J] . *Proe Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96: 6 808 – 6 813.

[7] Varvara P Grichko, et al. Increased ability of transgenic plants expressing the bacterial enzyme ACC deaminase to accumulate Cd, Co, Cu, Ni, Pb and Zn[J]. *Journal of Biotechnology*, 2000, 81: 45 – 53.

[8] Elizabeth Pilon – Smiths and Marinus Pilon. Breeding mercury – breathing plants for environmental cleanup[J]. *Trends in plant science*, 2000, 5(6): 235 – 236.

[9] Murphy, et al. A Comparison of metallothionein gene expression and nonprotein thiols in ten Arabidopsis ecotypes[J]. *Plant Physiology*, 1995, 109: 945 – 954.

[10] de la Fuente J M, et al. Aluminum tolerance in transgenic plant by alteration of citrate synthesis[J]. *Science*, 1997, 276: 1 566 – 1 568.

[11] Hasegawa I, et al. Genetic improvement of heavy metal tolerance in plants by transfer of the yeast metallothionein gene(CUP)[J]. *Plant and Soil*, 1997, 196: 277 – 281.

[12] Karenlampi S, et al. Genetic engineering in the improvement of plants for phytoremediation of metal polluted soil[J]. *Environmental Pollution*, 2000, 107: 225 – 231.

[13] Goto F, et al. Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene[J]. *Nature Biotechnology*, 1999, 17: 282 – 286.

[14] Richard B Meager. Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants[J]. *Current Opinion in Plant Biotechnology*, 2000, 3: 153 – 162.

[15] 沈 同,王镜岩. 生物化学[M]. 北京:高等教育出版社,1991. 470.

[16] Baker A J M, Walker P L. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metal elements—a review of their discovery of their distribution, ecology, and phytochemistry[J]. *Biodiscovery*, 1990, 1: 81 – 126.

[17] Robinson B H, et al. The potential of the high – biomass Nickel hyperaccumulator *Berkheya coddii* for phytomining and phytoremediation [J]. *Journal of Geochemical Exploration*, 1997, 60: 115 – 126.

[18] NEDELKOSK T V, et al. Characteristic of heavy metal uptake by plant species with potential for phytoremediation[J]. *Minerals Engineering*, 2000, 13(5): 549 – 561.

[19] Noyd R K, et al. Field responses to added organic matter, arbuscular mycorrhizal fungi, and fertilizer in reclamation of torbonite iron ore tailing[J]. *Plant Soil*, 1996, 179: 89 – 97.