

合成微生物的环境风险防控与检测技术研究进展

孙 韬¹, 宋 洁¹, 董姗姗³, 张振华³, 王 钰⁴, 章嫡妮³, 陈 磊², 张卫文^{1,2*}

1. 天津大学生物安全战略研究中心, 天津 300072

2. 天津大学化工学院, 天津 300072

3. 生态环境部南京环境科学研究所, 生态环境部生物多样性与生物安全重点实验室, 江苏 南京 210042

4. 中国科学院天津工业生物技术研究所, 中国科学院低碳合成工程生物学重点实验室, 国家合成生物技术创新中心, 天津 300308

摘要: 合成微生物 (基因改造、修饰和重建的微生物) 在生物制造、疾病诊疗、环境修复等领域展现出巨大应用潜力。与此同时, 合成微生物的规模化应用可能存在环境生物安全风险问题, 造成物种入侵、多样性丧失和生态系统破坏等不可预计的后果。为此, 本文总结了合成微生物环境释放后潜在的生物安全风险, 围绕合成生物学建立的环境防御与检测技术展开讨论, 并对未来如何更好地避免工程微生物的环境风险问题提出展望。经梳理发现: ①合成微生物释放引发的环境风险主要包括危害环境生物安全、水平基因转移及生态位占据和破坏等, 这主要与合成微生物改造后的特性及携带的外源片段有关。②通过营养缺陷型或环境敏感型微生物、基因线路、使用非天然元件、限制质粒异源复制等技术可避免合成微生物在环境中的存活或核酸扩散, 针对不同微生物的特性可采取相应策略。③分子标记、生物传感、快速核酸检测等针对合成微生物的特异性检测方法, 以及微生物条形码与高通量测序等通用性检测技术可用于合成微生物的环境追踪。鉴于此, 提出今后重点研究方向: 一是升级高效、稳定型生物封存策略以应对微生物的快速进化; 二是分析合成微生物的环境生存能力及分级预估其潜在风险; 三是研究合成微生物与环境生物的互作机制及其对环境生物的影响; 四是开发环境消减技术建立以确保合成微生物失控释放后的高效清除。

关键词: 合成微生物; 生物安全; 环境风险; 生物技术; 生物封存

中图分类号: X172; Q819 文章编号: 1001-6929(2024)10-2247-13

文献标志码: A

DOI: 10.13198/j.issn.1001-6929.2024.07.16

Advances in Environmental Risk Prevention, Control, and Detection Technologies for Synthetic Microorganisms

SUN Tao¹, SONG Jie¹, DONG Shanshan³, ZHANG Zhenhua³, WANG Yu⁴, ZHANG Dini³, CHEN Lei², ZHANG Weiwen^{1,2*}

1. Center for Biosafety Research and Strategy, Tianjin University, Tianjin 300072, China

2. School of Chemical Engineering & Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

3. Key Laboratory on Biodiversity and Biosafety, Nanjing Institute of Environmental Science, Ministry of Ecology and Environment, Nanjing 210042, China

4. Laboratory of Engineering Biology for Low-Carbon Manufacturing, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, National Center of Technology Innovation for Synthetic Biology, Tianjin 300308, China

Abstract: Synthetic microorganisms (genetically modified, altered, and reconstructed microorganisms) have great application potential in biological manufacturing, disease diagnosis and treatment, and environmental remediation. However, their large-scale application may pose environmental biosecurity risks and may lead to unpredictable consequences such as species invasion, loss of biodiversity, and ecosystem disruption. This paper summarizes the potential biosafety risks associated with the environmental release of synthetic microorganisms, discusses the environmental defense and detection technologies established by synthetic biology, and provides prospects

收稿日期: 2024-04-29

修订日期: 2024-07-12

作者简介: 孙韬(1990-), 男, 山东潍坊人, 副教授, 博士, 主要从事微生物合成生物学及生物安全战略研究, tsun@tju.edu.cn

* 责任作者: 张卫文(1967-), 男, 云南昆明人, 教授, 博士, 主要从事微生物合成生物学及生物安全战略研究, wwzhang8@tju.edu.cn

基金项目: 国家重点研发计划项目 (No.2019YFA0904600); 国家自然科学基金面上项目 (No.32270091)

Supported by National Key Research and Development Program of China (No.2019YFA0904600); National Natural Science Foundation of China (No.32270091)

for better mitigating the environmental risks of engineered microorganisms. The main findings are listed as follows. (1) Environmental Risks: The release of synthetic microorganisms can lead to environmental biosecurity hazards, horizontal gene transfer, niche occupation and ecosystem damage. These risks are primarily associated with the characteristics of modified synthetic microorganisms and the foreign genetic material they carry. (2) Mitigation Technologies: Technologies such as nutrient-deficient or environmentally sensitive microorganisms, gene circuits, the use of unnatural elements, and restricting the heterogeneous replication of plasmids can prevent the survival of synthetic microorganisms or the spread of nucleic acids in the environment. (3) Detection Methods: Specific detection methods for synthetic microorganisms, including molecular markers, biosensors, rapid nucleic acid detection, and general detection technologies such as microbial barcodes and high-throughput sequencing, can be utilized for environmental tracking of synthetic microorganisms. Future research directions include: (1) Biostorage Strategies: Upgrading efficient and stable biostorage strategies to cope with the rapid evolution of microorganisms. (2) Environmental Viability Analysis: Analyzing the environmental viability of synthetic microorganisms and assessing their potential risks through classification. (3) Interaction Mechanisms: Studying the interaction mechanisms between synthetic microorganisms and environmental organisms and their impact on the latter. (4) Environmental Abatement Technologies: Developing technologies to ensure the efficient removal of synthetic microorganisms after uncontrolled release.

Keywords: synthetic microorganisms; biosafety; environmental risks; biotechnology; biocontainment

合成微生物以细菌、真菌、古菌、原生动物等微生物为研究对象,基于合成生物学技术重新设计已有天然系统或创造新的生物部件、装置并建立标准化的元件库,通过对微生物的基因插入、删除及修改,对其细胞代谢和功能进行精准调控和改造,实现合成微生物的构建和多样化应用。相比传统微生物,合成微生物(基因改造、修饰和重建的微生物)具有如下特点:①产物合成能力增强——合成微生物可被改造成具有特定代谢途径和生产特定产物的能力,用于化学品的生产或增产;②代谢工程的灵活性提升——针对合成微生物代谢途径的改造和调控,使其对底物的利用效率更高,产物选择性更强,从而提高生产效率和产物纯度;③耐受性增强——合成微生物可被改造成具有耐受高温、高盐、酸碱等极端环境的能力,使其在工业生产中更加稳定和可靠;④生产过程控制简便——利用合成微生物生产化合物的过程通常更简单,更易于控制和调节,生产设备和条件要求较低,降低生产成本;⑤可持续性和环保性保障——合成微生物生产过程可采用可再生的生物原料作为底物,减少了对非可再生资源的依赖,利用合成微生物进行生物修复和污水处理等环境应用,有助于降低环境污染和资源消耗。

通过对合成微生物基因组遗传信息的编辑,合成微生物可被用于生产药物、酶类、生物燃料等化合物,或者在环境中降解有害物质、清洁污染物等,应用领域涉及生物制药、生物能源生产、环境修复、污水处理、食品加工等^[1]。例如:全世界每年感染疟疾者数以亿计,特效药青蒿素前体物质青蒿酸可在酿酒酵母中实现高效合成(25 g/L)并在 2013 年被世界卫生组织(WHO)批准作为临床药物使用^[2-3],改变了青蒿素

长期依赖从植物黄花蒿中提取的局面;长春碱和长春新碱等抗癌药物也陆续实现微生物合成,有望为药物生产注入新活力。作为不可再生资源化石燃料的替代,基于合成微生物的第三代生物炼制将 CO₂ 重新资源化利用已悄然兴起,有望发展绿色、可持续能源^[4-8]。2022 年中国北京首钢朗泽科技股份有限公司和美国西北大学的研究人员合作,利用合成生物学改造产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*),将 CO₂ 等工业废气高效转化为丙酮和异丙醇^[9],实现化学品和生物燃料在工业水平的负碳制造。据估计,2017 年全球微生物产品的产值为 53 亿美元,且在 2018—2023 年以平均约 8.6% 的速度增长^[10],毫无疑问,合成微生物的研发将为医学、能源、制造业、农业与环保等领域的进步带来巨大推动力。

与合成生物相比,以转基因植物为代表的基因修饰生物在早期即引发了人们对于生物安全问题的担忧,世界各国和地区较早出台了各类法律法规形成有效监管,如美国遵从的“实质等同原则”及中国的《农业转基因生物安全管理条例》等。随着技术的发展以及对基因修饰生物认识的逐步加深,其监管措施也日益完善。例如,美国目前基因修饰生物由食品和药品管理局、环境保护局及农业部联合监管以确保安全性,出台了《国家生物工程食品公开标准》(the National Bioengineered Food Disclosure Standard),规定到 2022 年,食品制造商、进口商和某些零售商必须对生物工程食品或含有生物工程成分的食品进行标识^[11]。欧盟则是制定了一系列法规,如“关于故意将转基因生物释放到环境中的指令 2001/18/EC”和“关于成员国限制或禁止在其领土内种植转基因生物的可能性指令(EU) 2015/412”等^[12]。随着合成生

物学等新兴生物技术的跨越式发展, 合成微生物的生物安全问题愈发受到重视。美国工业微生物的使用主要由环境保护局负责监管, 其在 1976 年通过的《有毒物质控制法》(the Toxic Substance Control Act) 基础上补充《微生物商业活动条款》(Microbial Commercial Activity Notices) 用于合成微生物商业使用监管。欧盟对于合成微生物的管理主要依托欧洲食品安全局及欧盟 2009/41 指令。美国及欧盟的监管主要通过制定微生物“白名单”来规范其商业使用^[13]。我国针对合成微生物尚未出台专门的法律法规, 但通过《农业转基因生物安全管理条例》对转基因微生物的生产、经营及进出口管理进行了规定。为了更好地促进合成微生物的合理使用, 除了坚持“硬法”治理形成监管框架外, 加强防控技术应对及“软法”建设 (如行业标准、行业自律等) 同样是避免合成微生物生物风险的重要手段。为此, 本文在总结合成微生物释放后潜在的环境风险的基础上, 讨论如下内容: ①针对合成微生物, 总结降低或避免其环境风险的防御性生物技术; ②针对环境释放或逃逸的合成微生物, 探讨可进行监测和追踪的生物技术; ③针对合成微生物的生物安全风险, 指出未来有待开发研究的新方向。本文将为合成微生物潜在环境风险的有效防控和管理决策提供新的思路。

1 合成微生物环境释放的潜在环境安全风险

如前文所述, 合成微生物除针对特定用途 (如高产化学品等) 外, 其在构建过程中通常具备各种抗生素抗性标签、异源基因、耐受力增强等特点。虽然目前鲜见由合成微生物释放导致的生物安全事件报道, 但其自身的特点导致释放后可能带来有害产物释放、基因水平转移、生态位占据等多方面的环境安全问题 (见图 1), 这些问题值得关注。

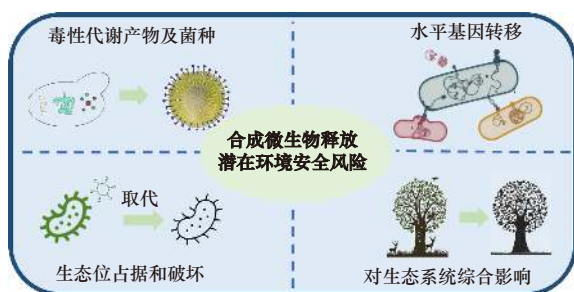


图 1 合成微生物可能引发的环境风险

Fig.1 Potential environmental risks associated with synthetic microorganisms

1.1 毒性代谢产物及菌种释放可危害环境生物安全

对于合成微生物的研究对象, 美国及欧盟制定了

GRAS(generally regarded as safe) 安全微生物目录, 如酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 等, 认为从事相关菌株的研究通常是安全的^[14]。一方面, 利用通常认为安全的微生物进行的产物生产或改造本身就有可能涉及有害的代谢产物 (如抗生素、毒素、病毒颗粒等); 另一方面, 从事病原微生物的改造研究释放后也有可能对动植物、周围环境和生态系统造成负面影响。例如, Zabala 等^[15]通过工程质粒增强链霉菌丙二酰辅酶 A 及葡萄糖代谢等, 将聚酮化合物或杂化聚酮-非核糖体肽 (如放线紫红素、可利迈仙等) 抗生素的产量提升了 20%~943%。Zheng 等^[16]通过将铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 的微囊藻毒素相关基因簇克隆入模式蓝细菌聚球藻 7942 (*Synechococcus elongatus* PCC 7942) 中, 实现了后者藻毒素的合成。链霉菌和蓝细菌分别广泛地分布于土壤及湖泊中, 具备天然的生态位。因此, 相关合成菌泄漏后有可能在自然界中存活并对生态系统造成影响, 其分泌的抗生素或毒素可能限制其他生物的生存。为促进疫苗的研发, 获取有活性的毒株十分重要, 采用合成细胞进行病毒合成具备方便、快速、大量等特点。2020 年瑞士伯尔尼大学研究人员将新型冠状病毒序列拆分成 14 个片段, 利用合成的 DNA 生成病毒亚基因组片段, 使用转化偶联重组技术将基因组维持在酵母人工染色体上, 后续利用 T7 RNA 聚合酶生产病毒 RNA, 进而可以产生活病毒^[17]。同年, 美国得克萨斯大学医学院研究人员将跨越 SARS-CoV-2 基因组的 7 个 cDNA 片段组装成一个全基因组并在体外将其转录成为有感染性的病毒 RNA, 将 RNA 导入细胞后具有高度感染性, 产生大量病毒体^[18]。虽然人工合成病毒技术为疫苗的开发起到了一定的推动作用, 其泄漏带来的风险同样值得关注, 特别是在当前全球公共卫生体系面临挑战的背景下更需要高度重视。

1.2 水平基因转移 (horizontal gene transfer) 可导致人工核酸片段在环境生物的意外富集

合成微生物释放后, 其携带的外源基因或遗传信息可能通过水平基因转移与自然环境中的其他微生物相互传递, 产生基因流动。基因流动途径包括多种 (如转化、转导、接合等), 这可能导致野生微生物的遗传特性发生变化, 影响环境中微生物群落的稳定性和功能。虽然水平基因转移的频率和效率受到环境因素 (如温度、湿度、土壤 pH 等) 的影响, 合成微生物释放到环境中后, 可能会受到环境的选择压力,

促进其与自然微生物之间的基因交换;此外, DNA 通常具有较高的稳定性, 据估计, 由于微生物的自然裂解, 每克土壤、水样中约含 0.08~25.6 μg 核酸; 胞外 DNA 可稳定存在一周至数月时间^[19]。对自然界的诸多微生物〔如聚球藻属、霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)、枯草芽孢杆菌等^[20]〕具备自然转化即天然吸收外源 DNA 的能力。以枯草芽孢杆菌为例, 其可以在 7 h 以内完成对外源 DNA 的摄取及表达^[21], 因此由合成微生物泄漏的核酸存在被上述微生物获取后整合至自身基因组的可能。除基因组整合外, 广宿主质粒的使用也使得合成微生物中的外源核酸可直接通过质粒的形式进入其他宿主中。例如, 质粒复制元件 RSF1010 最早于大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中发现, 但其在集胞藻属 (*Synechocystis* sp.)、希瓦氏菌属 (*Shewanella*)、嗜盐单胞菌属 (*Halomonas*)、念珠藻属 (*Nostoc* sp.) 下的多个物种中均可游离存在^[22-23]。因此广宿主质粒的使用加大了非天然核酸在自然界微生物之间传播的可能性。例如, Nguyen 等^[24]发现含有乙醇合成基因的相关质粒可以在液体共培养两天后从嗜热聚球藻 (*Thermosynechococcus elongatus* BP1) 水平转移到野生型大肠杆菌。另外, 在合成微生物的构建过程中, 抗生素抗性基因标签是最常用的筛选方法, 广泛用于阳性菌的筛选; 在多步人工改造过程中, 甚至涉及多种抗性基因的联用, 使得人工细胞获取了对多种抗生素的耐受能力。这些与抗生素耐受性相关的基因有可能会被某些致病菌获得并不断富集, 形成“超级细菌”, 带来危害。

1.3 耐受型合成微生物可导致生态位占据和破坏风险

为适应工业化和规模化应用, 某些合成微生物具备环境胁迫抗逆性 (如高温、酸碱、重金属等) 及其他非天然功能 (抗噬菌体侵染等), 因此合成微生物释放后, 由于具备更强的环境适应性, 占据原有微生物的生态位 (尤其释放后环境状态恰好相伴改变), 进而改变原有生态系统的结构和功能。例如, 经由实验室定向进化, 酿酒酵母对酸的耐受能力可降至 $\text{pH}=3.5$ ^[25], 对温度的耐受能力提升至 40 $^{\circ}\text{C}$ ^[26]; 聚球藻 7942 可同时获得对高光 [$1\ 000\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 以光子计] 和高温 (42 $^{\circ}\text{C}$) 的耐受能力^[27]。相比天然微生物, 这些进化的合成菌可在环境发生突然改变时具备更强的适应能力。噬菌体通过影响微生物群落的组成、遗传交换、代谢和环境适应, 在生态系统功能中起着至关重要的作用。例如, 噬藻体可侵染蓝细菌, 对自然界水圈中水华蓝细菌的丰度控制具有重要作用^[28]。

Robertson 等通过在人工合成的密码子简并后的大肠杆菌基因组中敲除相关密码子 TCG、TGA、TAG 的 tRNAs 和释放因子, 使得噬菌体侵染后无法正确合成自身蛋白质从而无法完成侵染^[29]; 相比天然菌, 这些合成菌释放到环境后缺乏依赖噬菌体的菌群丰度调控机制, 有可能占据原有菌的生态位。此外, 合成微生物可通过改变其生长特性或代谢途径, 更有效地利用环境中的资源, 与自然微生物进行资源竞争。例如: 天然情况下酿酒酵母通常仅利用葡萄糖进行生长, 改造后其可利用木糖等五碳糖^[30]甚至 CO_2 进行生长^[31]。天然聚球藻 7942 仅能利用 CO_2 作为碳源, 改造后其可利用葡萄糖^[32]、木糖^[33]等进行生长。这可能导致释放后的合成微生物增强资源获取能力, 从而降低自然微生物的生存空间和占据原本属于其他微生物的生态位。同时, 合成微生物这些新的代谢功能或生长特性, 使其能够在原有生态位以外的环境条件下生存和繁殖, 改变原有的生态系统结构和功能。一旦合成微生物在环境中成功占据了生态位, 可能会对原有的生态系统产生不可逆的影响, 导致环境中微生物群落的结构和功能发生长期性的改变。

1.4 合成微生物可对生态系统产生综合影响

生态系统的稳定是维持生态平衡、提供生态服务、防范自然灾害及调节气候等不可或缺的前提, 对地球上的生物和人类社会都至关重要。生态多样性是维持生态系统稳定的基本条件, 可赋予生态系统多样化的功能并提升其抗干扰能力。如 1.1 节和 1.3 节所述, 合成微生物释放可能通过占据环境微生物生态位、释放毒性产物等对其生物多样性造成不利影响。此外, 合成微生物释放后还可能与环境中的自然微生物相互作用, 导致生态系统中微生物群落的组成和结构发生变化。进而, 土壤中的氮循环、有机物降解、植物与土壤微生物互动等生态过程可由于生态多样性的破坏并受到影响, 影响生态系统的稳定性和健康状态, 导致生态系统中关键的生态功能 (如能量流动和物质循环) 受到影响或紊乱, 破坏生态系统中的复杂生态网络 (如食物网、营养链等), 对整个生态系统的稳定性和功能产生影响。目前, 合成微生物与环境微生物的互作机制虽然鲜有研究, 但其他转基因生物的释放例子可作为参考。例如, 蚊子作为公认的害虫之一, 可诱发包括疟疾、登革热等在内的多种虫媒传染病。其中, 2017 年全球疟疾感染人数超过 2 亿且夺走了超过 40 万人的生命。为控制蚊子的数量, 巴西在 2013—2015 年期间从英国 Oxitec 公司购买了名为 OX513A 的转基因蚊子, 并释放到巴伊亚州某

城市(连续 27 个月,每周释放约 45 万只)^[34]。一方面,蚊子充当着昆虫捕食者的食物源,其消失最终可能会导致以蚊子为食的物种灭亡;其生态位的缺失极有可能被其他昆虫(如螨、蚋和跳蚤等)替代,这类昆虫同样会给人类生活带来不良影响。另一方面的风险则来源于目标物种和近缘物种之间的杂交,2019 年的一项研究^[34]显示, Oxitec 公司在巴西释放的转基因蚊子并没有在自然界消失,而是与野生蚊子产生了杂合后代。这显然不符合预期结果,并且新物种的产生也带来了新的隐患。

2 合成微生物主动防御技术

合成微生物如果仅能在特定环境下生存或发挥功能,在泄漏或逃逸后触发程序性凋亡或失活机制,将保证其规模化使用的生物安全性。随着政策法规、行业自律对生物安全的指导、管控或规范,科研人员逐步认识到发展合成微生物主动防御技术、构建可控细胞的重要性,推动了生物封存技术的建立和不断完善。生物封存技术利用自然界中不存在的营养元素或条件(温度、酸碱度等)、诱发微生物启动自杀机制的诱导信号,阻止合成微生物在自然界中存活、复制及扩散,或合成细胞中的非天然基因受基因线路或信号控制无法在自然界中扩散及水平转移(见图 2)。基因线路、基因组编辑和基因表达调控等新兴的合成生物学技术的出现极大地促进了生物封存技术的发展。

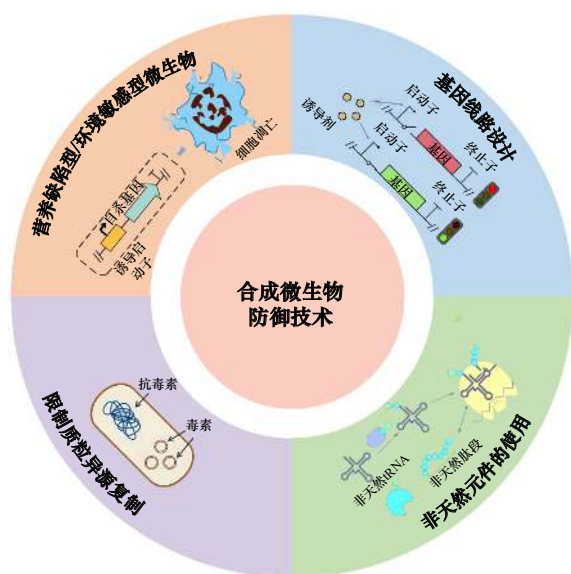


图 2 合成微生物防御技术示意

Fig.2 Schematic of the defense technology to synthetic microorganisms

2.1 构建营养缺陷型或环境敏感型合成微生物使其释放后自发死亡

通过改造使合成微生物的生长和生存依赖环境不存在或不易获得的外源性代谢物供应,构建营养缺陷型菌株是最常见的生物封存策略之一,该策略通常适用于有明确营养源依赖的微生物。例如,通过分别删除尿嘧啶、L-组氨酸、L-亮氨酸、L-色氨酸或 L-蛋氨酸从头合成的必需基因 *URA3*、*HIS3*、*LEU2*、*TRP1* 或 *MET15*,可构建不同的营养缺陷型酿酒酵母菌株,其自身无法合成上述物质因,且存活必须依赖外源相应营养物质的添加^[35]。此外,磷源是微生物生存必不可少的营养元素之一,自然界中几乎所有的磷都是以五价形式存在,亚磷酸盐在自然界中的存在量极少;通常微生物仅能利用磷酸盐而非亚磷酸盐。以此为基础,研究人员可在合成微生物中删除原有与磷酸盐代谢相关的基因并赋予其亚磷酸盐利用的能力;在此前提下,合成微生物环境释放后由于缺乏磷源可导致细胞死亡。该策略陆续在多个微生物如大肠杆菌^[36]、恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*)^[37] 及聚球藻 7942^[38] 中得以实现,取得了较好的生物封存效果。

即便如此,这种构建营养缺陷型个体的策略并不是万无一失的,一方面这些生物可通过获得其他生物产生的代谢产物在自然环境中生存;另一方面,合成生物可通过水平基因转移重新获得缺失的必要基因^[39]或进化新的代谢通路突破营养缺陷的限制,使得生物封存系统失效。因此,开发环境因素触发的细胞程序性凋亡策略将更为稳妥,这一策略通常适用于实验室培养与环境条件有差异且微生物对此差异可产生响应的情况。同时,区别于营养缺陷型标记,环境敏感型菌株的构建通常不会影响合成菌株的正常生长和代谢。例如, Yoo 等^[40]利用自然界水环境氟含量较高这一特点,构建对氟离子敏感的酿酒酵母菌株,确保了在氟化物丰富地区对这些转基因生物的有效封控(5 mmol/L NaF 条件下,逃逸率低于 10^{-9})。此外, Zhou 等^[41]则利用自然界中铁离子浓度较低这一特点,以聚球藻 7942 为对象,开发出了利用铁离子诱导型启动子 *PisiAB* 驱动毒素/抗毒素元件 (*sepA1/sepT1* 和 *sepA2/sepT2*) 构建的生物封存系统;所得封存系统在缺铁条件下,3 天内菌株逃逸率低于 10^{-9} (低于美国国立卫生院指导性文件中低于 10^{-8} 的标准)。

2.2 设计基因线路调控外源基因使其无法在自然环境中表达

即便通过上述降低合成微生物在环境中的适应度的策略,仍存在细胞死亡后核酸泄漏的风险。因此,对合成微生物中的改造基因进行严格控制,避免其水平转移至其他微生物后具备生物活性同样重要,这一

策略通常适用于必需基因研究明确且存在诱导表达系统的微生物。事实上,早在 20 世纪 90 年代末,基因限制技术将种子发育基因置于化学诱导启动子的控制下,控制转基因作物的无意传播。当转基因作物在自然环境中生长时,由于缺乏诱导化学物直接导致不育种子的形成^[42]。对合成微生物而言,各种化学分子诱导的开关系统(如启动子、核糖开关等)已被广泛用于外源基因的表达控制,在缺乏诱导剂的情况下受控基因通常不表达或表达量较低。例如,糖类虽然是生物体能量代谢的主要来源,其在自然界(如水和土壤)中很少以单糖的形式出现。分别受木糖、鼠李糖、阿拉伯糖等单糖分子诱导表达的启动子 P_{xyI} ^[43]、 P_{rhaBAD} ^[44]、 P_{ara} ^[45] 等已广泛用于微生物外源基因表达的控制。此外,受茶碱、香草酸等非天然分子诱导的核糖开关、启动子等^[46] 同样可避免外源基因在自然界的表达。在此基础上,可设计基因线路如将诱导型启动子与核糖开关串联组成“与门”联合控制外源基因表达^[47],受控基因需同时满足两种诱导条件才可最终表达,进一步降低其意外泄漏的可能性。为设计更加灵敏和稳定的基因线路用于生物封存(更多策略可见文献[48-49]),Chan 等^[50] 开发了分别名为“Deadman”及“Passcode”的自杀开关系统,在前者中,毒素基因受到两级调控,细胞的死亡可分别由添加乳糖或乳糖类似物(主动杀灭)或不添加四环素(环境杀灭)触发;在后者中,整个系统更为复杂,细胞的存活需要满足三个条件即同时存在两种诱导剂且不存在第三种诱导剂。除传统的化学诱导外,群体效应原本指细菌通过分泌种内特异性的诱导剂(通常为高丝氨酸内酯类)及种间特异性诱导剂(通常为呋喃酰硼酸二酯类)来调控自身及周围细菌行为的特殊现象;群体效应物质随细菌丰度的增大而增加,达到阈值后激活相关基因表达^[51]。利用这一特性,将外源基因与群体效应偶联,可使其仅能在合成微生物丰度较高时才会启动且仅能在同种微生物中表达^[52]。

2.3 使用非天然元件可避免外源基因被异源生物宿主识别

非标准氨基酸是指除了自然界中通常编码的 20 种标准氨基酸之外的氨基酸。合成微生物含有的外源基因通常需要翻译为蛋白质才可发挥作用,在合成微生物中通过引入非标准氨基酸的编码及识别系统,可避免其基因水平转移至其他微生物后的意外表达,这一策略依赖于在不同微生物中建立非标准氨基酸表达系统。对于非标准氨基酸编码的引入形式,通常分为两种,包括将原有 3 种终止密码子简并为 2 种

或 1 种并引入可识别终止密码子的 tRNA、引入四联体密码子及配套 tRNA。自然界生物利用 64 个密码子对应 20 种氨基酸(另包含 3 种不编码氨基酸的终止密码子),人工染色体的合成使得基因组密码子简并成为可能,科学家先后合成了仅具备 61 种^[53] 及 57 种^[54] 密码子的人工大肠杆菌。在此基础上空余的 3~7 个空白密码子可被用来引入编码非标准的氨基酸。例如:Tian 等^[55] 在大肠杆菌中利用非标准氨基酸进行 N-乙酰神经氨酸的合成,既平衡了细胞代谢压力提升了产量又避免了其泄漏后在其他微生物的表达。此外,Jia 等^[56] 利用正交核糖体将特定环境信号的响应机理同基因线路结合,构建了由激活线路(与门)和降解线路(非门)组成的正交核糖体生物防火墙系统;其中,正交核糖体可以特异性地翻译菌株体内的正交 mRNA,不会同内源核糖体交叉;根据环境信号产生 I-SceI 内切酶的降解回路可有条件地切割正交核糖体基因,显著降低了自发突变导致的意外增殖风险。相比上述简并密码子需要对宿主基因组进行改造,四联体密码子表采用四个碱基对应一个氨基酸,理论上可提供总共 256 个“空白”密码子,这些密码子可用于编码多个不同的非天然氨基酸,且无法在天然微生物中进行正确表达。在之前的研究中,Debenedictis 等^[57] 利用定向进化的方式优化了可识别四联体密码子的系列 tRNA,并成功获得了较好的四联体密码子-tRNA 配对组合,为将来利用该技术避免基因外泄打下了基础。

2.4 限制质粒异源复制可阻止基因水平转移

考虑到多数情况下,质粒是外源基因的载体,因此限制其在异源宿主中的复制(尤其针对广宿主质粒)也是阻止基因水平转移的重要策略,该技术对毒素-抗毒素系统适用的微生物较为有效。事实上,在病毒基因工程中,早已使用复制缺陷或受控的病毒作为载体向细胞递送外源基因,以避免其过量或失控复制^[58]。毒素-抗毒素系统由通常由紧密连锁的基因编码的“毒素”和相应的“抗毒素”组成。毒素通常是蛋白质,抗毒素可以是蛋白质或 RNA,该系统广泛分布在原核生物中。利用该系统表达外源基因时,将一个毒素基因整合到质粒中,质粒的宿主必须表达适当的抗毒素。因此,质粒即便泄漏至其他宿主也会由于缺乏抗毒素并将新宿主杀死。例如,Wright 等^[59] 联合上述基因分离策略及毒素抗毒素系统,首先将质粒复制依赖的元件置于宿主基因组,限制了质粒的异源复制;随后在质粒及宿主中分别引入毒素及抗毒素基因,进一步避免了质粒逃逸至其他宿主。进一步地,

Liao 等^[60] 构建了 3 种合成大肠杆菌菌株, 每一种都含有特定的不配对的毒素、抗毒素模块且形成“石头-剪刀-布”的关系 (每种菌株可解除另一菌株的毒素同时自身的毒素依赖另一菌株的抗毒素); 因此, 在 3 种菌形成的复合群体中, 它们均可稳定存在, 任何一个菌的单独逃逸均无法存活, 任一菌携带的质粒逃逸至其他微生物也无法单独存活。

3 合成微生物检测技术

除上述针对合成微生物的防御技术外, 在其泄漏至自然界后, 建立相应的检测、追踪及监测技术同样

重要。基于生物技术开发的合成微生物检测技术主要用于识别和监测合成微生物在环境中的存在和行为, 以及评估其对环境和生物系统的影响。一方面, 传统的微生物检测方法仍适用于合成微生物; 另一方面, 可依据合成微生物的特点开发特异性检测方法。依照不同技术原理, 合成微生物检测技术包括分子标记技术、生物传感技术、快速核酸检测技术、高通量鉴定技术等 (见图 3)。目前针对合成微生物的环境释放及检测研究相对较少, 但相关技术报道可作为储备为合成微生物后续的环境检测提供策略指导。

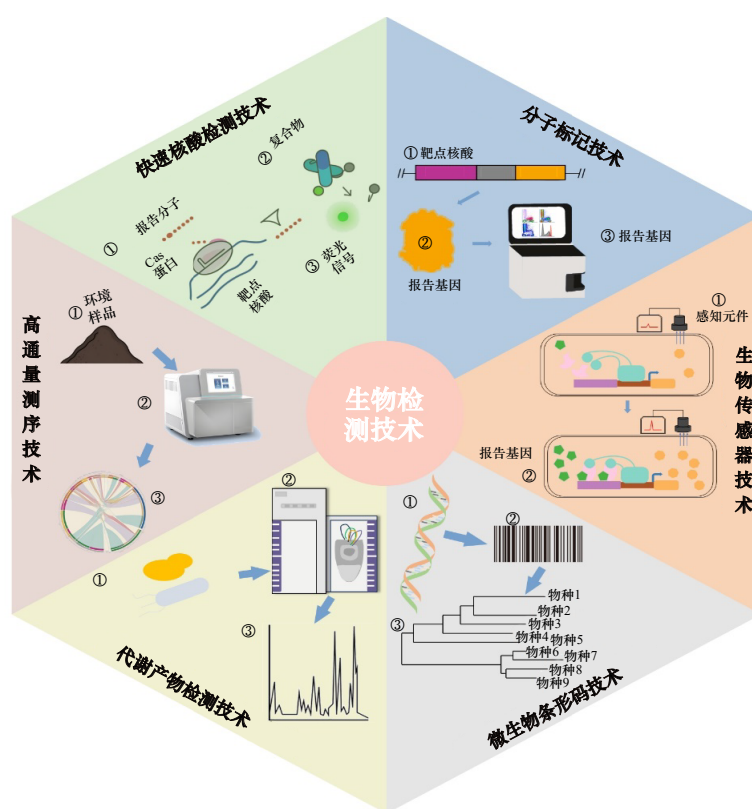


图 3 微生物检测技术原理示意

Fig.3 Schematic of the detection technology to microorganisms

3.1 针对合成微生物的专用性检测技术

3.1.1 分子标记技术

通过在合成微生物中事先引入特定的分子遗传标记如荧光蛋白 (绿色、红色及黄色荧光蛋白等)、报告基因 (荧光素酶基因等) 等, 这些标记可通过荧光显微镜或流式细胞仪等设备进行观察和分析, 用于直接检测合成微生物的存在和定位, 推断其在释放环境中的分布及丰度。早在 1999 年, Firth^[61] 就已制定了在环境中通过报告基因追踪微生物的实验方案, 包括最佳报告基因 (如荧光蛋白、催化底物发色基因等) 的选择以及报告基因在微生物中的具体构建和监测

方法, 为微生物环境追踪提供了重要参考。此后, 随着研究的不断深入, 相关标记方法及应用场景得到不断拓展, 微生物追踪的效果得到进一步提升^[62-63]。为开发新型标记策略, 2024 年 Zhang 等围绕蓝细菌的四型菌毛系统, 通过在合成菌中将菌毛编码基因特定位置的丝氨酸突变为半胱氨酸, 实现了菌毛的特异性染色并实现其变化规律表征^[64], 同时可用于菌株的时空追踪, 相关技术也为其他具备四型菌毛的微生物在环境中的活细胞追踪提供了有效策略。

3.1.2 生物传感技术

微生物中普遍存在感知与响应系统, 如双组分系

统、对营养源(不同碳源、微量元素等)及代谢物(肌醇、唾液酸等)的感应系统等^[65],这些系统主要由可与底物或信号结合的蛋白(负责感知)及其受控的启动子(负责响应)组合而成^[66]。通过在合成微生物中构建能够感知特定物质或环境条件的生物传感器,同时传感器控制特定的报告基因,可使其在环境中释放后可被检测。相比上述的分子标记技术中某些报告基因可能在环境微生物中天然存在,该技术报告基因需要感知特定检测底物或信号后才可表达。为提升检测的快速性及准确性,改良生物传感器的灵敏度、检测限、信噪比等十分重要。对此,Jung 等优化了可针对四环素、柚皮素、金属离子(Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cd^{2+})的感知系统,建立了其与荧光报告基因之间的线性关系^[67],该研究不仅为合成微生物检测提供了各类工具,同时也为通过报告基因直接预估合成微生物丰度奠定基础。此外,Doong 等^[68]在大肠杆菌中建立和优化了针对肌醇的感知响应系统,实现了荧光蛋白基因对其的线性响应。

3.1.3 快速核酸检测技术

为摆脱对特殊仪器的需求并提升检测速度,近年来快速核酸检测技术应运而生^[69-70]。2014 年,Green 等^[71]开发了称之为“Toehold switches”的系列可正交使用的核糖开关,该系统通过在报告基因前面设计“YUNR”序列(crRNA)掩蔽其 RBS 的二级结构来控制报告基因的表达,该二级结构在与结合能更低的激活 RNA(taRNA)结合后可发生构象变化并启动报告基因的翻译。该系统具备较好的灵活性,crRNA 和 taRNA 可根据具体应用需求进行人工设计。例如,Pardee 等^[72]将该系统应用到寨卡病毒的快速检测中,以寨卡病毒本身的特异性核酸序列作为 taRNA 设计其对应的 crRNA 用于控制报告基因,依靠简单的显色反应即可完成对病毒核酸的检测。CRISPR/Cas 技术的发展进一步丰富了核酸检测手段并推动了核酸检测的可视化、便携化应用。其中,Cas13(如 C2c2 等)是一种 RNA 指导的 RNA 内切酶;CRISPR/Cas13 系统与 crRNA、底物结合形成三元复合体后,Cas13 蛋白被激活,此时 Cas13 蛋白不仅能切割底物 RNA,还能反式切割环境内的任意单链 RNA。在此原理下,通过在反应体系中加入一端连有荧光基团同时另一端连有猝灭基团的信号分子(正常情况不发荧光),当 Cas13 蛋白-crRNA 二元复合体识别底物 RNA 后,Cas13 蛋白被激活而切割环境内的报告分子使其释放信号^[73]。利用该原理进行的核酸检测在 2017 年率先被 Gootenberg 等报道并以“SHERLOCK”命名^[74]。

类似地,2018 年 Li 等^[75]发现了 Cas12a 蛋白-crRNA 复合体识别靶 DNA 后,可被激活对单链 DNA 的反式切割并以此为基础开发了基于 CRISPR/Cas12a 的核酸检测技术“HOLMES”。两种技术相辅相成可分别针对 RNA 及 DNA 进行检测且时间最短可至 5 min^[76],为合成微生物的快速检测提供了有效策略。

3.2 微生物的通用性检测技术

3.2.1 微生物条形码与高通量测序技术

自 1977 年 Sanger 测序(第一代测序技术)报道以来,高通量测序技术发展突飞猛进,第二代(Illumina 平台等)及第三代(纳米孔测序等)测序技术可在短时间内获取大量测序数据且成本不断降低^[77]。微生物条形码是一种基于特定核酸序列的标记,用于区分和鉴定不同的微生物物种。一方面,天然的微生物条形码常见序列包括 16S rRNA 基因(对于细菌和古细菌)和 18S rRNA 基因(对于真菌)^[78]。通过对这些标记序列的高通量测序和比对,可以快速准确地鉴定样品中的微生物组成。目前,针对宏基因组中 16S rRNA 高通量的测序为合成微生物的环境检测提供了高效手段。另一方面,也可通过引入特定的标记基因或 DNA 条形码,这些标记既可通过高通量测序技术又可直接利用上述核酸检测技术进行检测和分析,确定合成微生物的存在和传播路径。对此,Bernhardt 等开发了生物信息学工具“barCoder”^[79],可针对特定微生物创建唯一可识别的条形码。该条形码设计基于目标菌株的基因组序列和一组指定的 PCR 参数来生成一个建议的条形码“模块”列表,该列表可满足最佳的 PCR 扩增条件及特异性微生物鉴定。该工具的报道可同时满足实时荧光定量 PCR 检测高效性,又避免了与其他微生物可能存在的同源序列导致的错误鉴定。

3.2.2 代谢物高通量测定技术

该技术被广泛地用于分析生物体中的小分子化合物,可同时定量检测生物样本中数百至数千种代谢物。通过检测合成微生物产生的特定代谢产物^[80],如酶、蛋白质、有机物等,可间接确认合成微生物的存在和活性水平。近年来,为进一步提升代谢物测定的特异性和灵敏性,针对单细胞代谢物测定的系列技术得以开发,且更加适合合成微生物释放后的检测。其中,Meng 等^[81]主要依托傅里叶变换离子回旋共振质谱仪建立“RespectM”技术,可在单细胞水平完成对 600 余种代谢物的测定。单细胞拉曼光谱技术则是结合拉曼光谱和单细胞分析技术,可以非破坏性地获取单个细胞的化学成分信息如细胞内代谢产物的组

成和变化。例如, Ge 等^[82] 开发了高通量拉曼散射-双光子荧光原位杂交平台“SRS-FISH”, 实现了对超过 30 000 个单细胞的代谢响应测定。这些高通量的代谢组学技术为合成微生物的鉴定、检测提供了有效策略。

4 未来研究方向

目前, 虽然已有一些技术为合成微生物的防御和检测提供了有效策略, 但风险评估的复杂性和多样性要求采用更为全面和系统的方法。未来的研究方向之一是加强合成微生物在环境中的应用研究, 包括在更广泛的环境条件下评估合成微生物的稳定性和安全性, 以及分类评价不同合成微生物的潜在风险。此外, 还需要深入研究合成微生物与环境生物的互作机制, 以更好地理解它们对生态系统的影响。随着合成生物学技术的不断进步, 未来还有可能出现更多的创新应用, 如利用合成微生物生产生物燃料、生产特定化学物质等。对此, 需要建立一套全面、系统、科学的评估体系并建议相应的防御技术, 包括对环境、生态、经济、社会等多个方面的综合评估, 利用先进的监测和检测技术对合成微生物的潜在风险进行实时监测和预警以及针对已泄漏合成微生物开发相应的环境消减技术等。同时必须认识到, 随着合成生物学发展, 同步和系统的风险评估也需要与时俱进而不会是一劳永逸的。

4.1 升级高效、稳定型生物封存策略以应对微生物的快速进化

微生物通常的突变速率在 $10^{-5} \sim 10^{-8}$ 之间^[83], 但考虑到较快的生长速度, 其通过自然进化脱离生物封存控制的可能性大大增加。因此在生物封存领域, 需要关注如何增强封存策略的效率和稳定性。为此, 首先需要深入研究合成微生物的遗传特性和代谢机制, 理解其适应环境和进化变化的机制, 以优化封存策略。为提升封存策略的稳定性, 需要开发更为通用的生物封存平台, 以适应不同种类和特性的微生物; 这需要跨学科的合作, 结合生物信息学、计算机科学等领域的知识和技术, 共同推动生物封存策略的创新和发展。同时, 在策略的实施过程中, 需要关注其在实际应用中的可行性和长期稳定性。通过模拟实验和实地测试, 评估不同生物封存策略的效果和性能, 并不断优化和改进。

4.2 分析合成微生物的环境生存能力及分级预估其潜在风险

到目前为止, 还没有发现生物危害事件与合成微生物有关: 一方面, 这可能与失去筛选压力后, 合成

微生物中的质粒随着时间的推移其存活率会显著降低; 另一方面, 与非工程亲本株相比, 合成微生物的环境生存能力有待研究。因此, 围绕合成微生物尤其是本就具备天然生态位的底盘(如霉菌、蓝细菌、酵母菌及放线菌等), 未来研究可着重构建具备生态位竞争能力的不同底盘, 并在模拟环境、可控环境中对其存活能力、周期进行追踪, 为其生物安全评估提供科学支撑。同时, 需要注意到不同合成微生物释放到环境中, 其对生态环境和人体健康的影响程度却千差万别, 因此需要建立一个分级评定系统, 评估每一类别合成微生物对环境和人体的潜在影响。在评估过程中, 需要综合考虑多个因素, 如合成微生物的生存能力、传播范围、对环境的适应性, 还需要关注这些微生物在环境中的长期影响, 以及它们与其他生物和环境的相互作用。这些等级可以用于指导对不同合成微生物的管理和使用, 以最大限度地降低其对环境和人体的风险。同时, 这也有助于更好地理解和控制合成生物学技术的潜在影响, 推动该领域的可持续发展。

4.3 研究合成微生物与环境生物的互作机制及其对环境生物的影响

当前, 有关同种微生物工程化后对原有未改造微生物的多样性的影响, 合成微生物对其他生物的多样性的影响及其携带的核酸片段、质粒等通过水平基因转移至其他环境生物的概率等问题的研究仍较为匮乏。除了传统的系统生物学研究技术(如转录组学、代谢组学等)以外, Hi-C 技术(High-throughput chromosome conformation capture)作为新一代宏基因组测序, 可在新的维度揭示微生物之间的相互作用, 为研究复杂的菌群之间相互作用提供了新的技术方法^[84]。揭示合成微生物与环境微生物的相互作用将与上述内容形成互补。同时, 以代表性微生物在充分了解其环境生存能力、与环境生物互作机制的基础上, 可发展系统生物学方法, 对合成微生物在环境中的生态行为进行建模和预测, 评估其对生态系统和生物多样性的影响, 为风险评估和管理提供科学依据。为此, 发展更加精准和全面的风险评估方法, 尤其是建立通用性的生态学模型, 将帮助更好地了解合成微生物对生态系统结构和功能的影响。

4.4 开发环境消减技术建立以确保合成微生物失控释放后的高效清除

即便进行了充分的研究, 微生物对象的不同及其功能差异, 提升了发生环境风险发生的可能性, 开发相应的环境消减技术可作为风险防控的重要技术储

备。传统的物理及化学消减策略通常不具备特异性,无差别地杀灭环境中的全部微生物。噬菌体是可感染细菌的病毒,通常具备专一性宿主侵染特性^[85];因此,可通过噬菌体工程开发针对特定合成微生物的高效噬菌体,对其在环境中的存活进行有效遏制。另外,也可利用天然的控制机制,通过微生物、酶或化合物的拮抗作用来抑制目标微生物的生长和繁殖。例如,某些微生物分泌的化感物质、杀藻细菌等可特异性控制水华蓝藻的生长^[86]。此外,随着基因驱动技术的兴起^[87],利用 CRISPR/Cas9 等基因编辑工具设计能够传播破坏目标合成微生物基因组的基因驱动器,可导致其种群迅速衰退或灭绝。未来通过以上研究,可形成对合成微生物环境风险防控的全链条技术支持。

5 结论

a) 合成微生物释放到环境后可能带来相关风险,包括毒性代谢产物及菌种释放的潜在风险、水平基因转移带来的风险及耐受型合成微生物导致的生态位占据和破坏风险等,其中水平基因转移风险已有广泛研究,值得关注。

b) 通过构建营养缺陷型或环境敏感型合成微生物、设计基因线路调控外源基因的表达、使用非天然元件避免外源基因异源识别及限制质粒异源复制以阻止基因水平转移等策略可阻止合成微生物在自然界的存活或传播。

c) 针对合成微生物,分子标记、生物传感、快速核酸检测及微生物条形码与高通量测序等技术有望实现对其有效追踪及检测。

d) 为最大程度地减少合成微生物释放可能带来的环境安全风险,需要在合成微生物研究、开发和应用过程中,严格遵循生物安全原则和规范,进行充分的风险评估和管理,制定合适的监测和应对措施。

参考文献 (References):

- [1] 张晓龙,王晨芸,刘延峰,等.基于合成生物技术构建高效生物制造系统的研究进展[J].合成生物学,2021,2(6):863-875.
ZHANG X L,WANG C Y,LIU Y F,et al.Research progress of constructing efficient biomanufacturing system based on synthetic biotechnology[J].Synthetic Biology Journal,2021,2(6):863-875.
- [2] MARTIN V J J,PITERA D J,WITHERS S T,et al.Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids[J].Nature Biotechnology,2003,21:796-802.
- [3] PADDON C J,WESTFALL P J,PITERA D J,et al.High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin[J].Nature,2013,496:528-532.
- [4] ATSUMI S,HIGASHIDE W,LIAO J C.Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde[J].Nature Biotechnology,2009,27:1177-1180.
- [5] CHEN F Y H,JUNG H W,TSUEI C Y,et al.Converting *Escherichia coli* to a synthetic methylotroph growing solely on methanol[J].Cell,2020,182(4):933-946.
- [6] GLEIZER S,BEN-NISSAN R,BAR-ON Y M,et al.Conversion of *Escherichia coli* to generate all biomass carbon from CO₂[J].Cell,2019,179(6):1255-1263.
- [7] ANTONOVSKY N,GLEIZER S,NOOR E,et al.Sugar synthesis from CO₂ in *Escherichia coli*[J].Cell,2016,166(1):115-125.
- [8] LIU Z H,WANG K,CHEN Y,et al.Third-generation biorefineries as the means to produce fuels and chemicals from CO₂[J].Nature Catalysis,2020,3:274-288.
- [9] LIEW F E,NOGLE R,ABDALLA T,et al.Carbon-negative production of acetone and isopropanol by gas fermentation at industrial pilot scale[J].Nature Biotechnology,2022,40:335-344.
- [10] JANNATHULLA R,SRIVANTHI O,MOOMEEN S,et al.Microbial products in terms of isolates,whole-cell biomass,and live organisms as aquafeed ingredients:production,nutritional values,and market potential:a review[J].Aquaculture International,2021,29(2):623-650.
- [11] MCFADDEN B R,LUSK J L.Effects of the national bioengineered food disclosure standard:willingness to pay for labels that communicate the presence or absence of genetic modification[J].Applied Economic Perspectives and Policy,2018,40(2):259-275.
- [12] VAQUÉ L G.Directive (EU) 2015/412 in the EU Acquis:its scope and significance[M].Wageningen,the Netherlands:Wageningen Academic Publishers;2016:47-59.
- [13] 魏笑莲,钱智玲,陈巧巧,等.遗传改造微生物制造食品和饲料的监管要求及欧盟授权案例分析[J].合成生物学,2021,2(1):121-133.
WEI X L,QIAN Z L,CHEN Q Q,et al.Regulatory requirements for food and feed produced with genetically modified microorganisms and case studies for EU authorization[J].Synthetic Biology Journal,2021,2(1):121-133.
- [14] VOEIKOVA T A,ZHURAVLIOVA O A,DEBABOV V G.Comparative analysis of legal regulation of industrial use of genetic-engineering-modified microorganisms in the United States, European union,and Russian federation[J].Molecular Genetics, Microbiology and Virology,2020,35(2):69-77.
- [15] ZABALA D,BRAÑA A F,SALAS J A,et al.Increasing antibiotic production yields by favoring the biosynthesis of precursor metabolites glucose-1-phosphate and/or malonyl-CoA in *Streptomyces* producer strains[J].The Journal of Antibiotics,2016,69(3):179-182.
- [16] ZHENG Y L,XUE C L,CHEN H,et al.Reconstitution and expression of *mcy* gene cluster in the model cyanobacterium *Synechococcus* 7942 reveals a role of MC-LR in cell division[J].The New Phytologist,2023,238(3):1101-1114.
- [17] THI NHU THAO T,LABROUSSA F,EBERT N,et al.Rapid reconstruction of SARS-CoV-2 using a synthetic genomics platform[J].Nature,2020,582:561-565.

- [18] XIE X P, MURUATO A, LOKUGAMAGE K G, et al. An infectious cDNA clone of SARS-CoV-2[J]. *Cell Host & Microbe*, 2020, 27(5):841-848.
- [19] BAIROLIYA S, XIANG J K Z, CAO B. Extracellular DNA in environmental samples: occurrence, extraction, quantification, and impact on microbial biodiversity assessment[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2022, 88(3):e0184521.
- [20] JOHNSBORG O, ELDHOLM V, HÅVARSTEIN L S. Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function[J]. *Research in Microbiology*, 2007, 158(10):767-778.
- [21] CHENG Y Y, CHEN Z Y, CAO X Y, et al. Programming bacteria for multiplexed DNA detection[J]. *Nature Communications*, 2023, 14:2001.
- [22] TATON A, UNGLAUB F, WRIGHT N E, et al. Broad-host-range vector system for synthetic biology and biotechnology in cyanobacteria[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(17):e136.
- [23] GILBERT C, BRUMWELL S L, CRITS-CHRISTOPH A, et al. A scalable framework for high-throughput identification of functional origins of replication in non-model bacteria[J]. *bioRxiv*, 2023. doi:<https://doi.org/10.1101/2023.05.19.541510>.
- [24] NGUYEN T H, BARNES C L, AGOLA J P, et al. Demonstration of horizontal gene transfer from genetically engineered *Thermosynechococcus elongatus* BP1 to wild-type *E. coli* DH5 α [J]. *Gene*, 2019, 704:49-58.
- [25] PEREIRA R, MOHAMED E T, RADİ M S, et al. Elucidating aromatic acid tolerance at low pH in *Saccharomyces cerevisiae* using adaptive laboratory evolution[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(45):27954-27961.
- [26] CASPETA L, CHEN Y, GHIACI P, et al. Altered sterol composition renders yeast thermotolerant[J]. *Science*, 2014, 346(6205):75-78.
- [27] SUN H L, LUAN G D, MA Y F, et al. Engineered hypermutation adapts cyanobacterial photosynthesis to combined high light and high temperature stress[J]. *Nature Communications*, 2023, 14:1238.
- [28] ARANDA Y N, BHATT P, ATEŞ N, et al. Cyanophage-cyanobacterial interactions for sustainable aquatic environment[J]. *Environmental Research*, 2023, 229:115728.
- [29] ROBERTSON W E, FUNKE L F H, deLa TORRE D, et al. Sense codon reassignment enables viral resistance and encoded polymer synthesis[J]. *Science*, 2021, 372(6546):1057-1062.
- [30] SHIN J, LIAO S Q, KUANYISHEV N, et al. Compositional and temporal division of labor modulates mixed sugar fermentation by an engineered yeast consortium[J]. *Nature Communications*, 2024, 15:781.
- [31] QIN N, LI L Y, WAN X Z, et al. Increased CO₂ fixation enables high carbon-yield production of 3-hydroxypropionic acid in yeast[J]. *Nature Communications*, 2024, 15:1591.
- [32] KANNO M, CARROLL A L, ATSUMI S. Global metabolic rewiring for improved CO₂ fixation and chemical production in cyanobacteria[J]. *Nature Communications*, 2017, 8:14724.
- [33] GONZALES J N, TREECE T R, MAYFIELD S P, et al. Utilization of lignocellulosic hydrolysates for photomixotrophic chemical production in *Synechococcus elongatus* PCC 7942[J]. *Communications Biology*, 2023, 6:1022.
- [34] EVANS B R, KOTSAKIOZI P, COSTA-DA-SILVA A L, et al. Transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes transfer genes into a natural population[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9:13047.
- [35] PAVÃO G, SFALCIN I, BONATTO D. Biocontainment techniques and applications for yeast biotechnology[J]. *Fermentation*, 2023, 9(4):341.
- [36] HIROTA R, ABE K, KATSUURA Z I, et al. A novel biocontainment strategy makes bacterial growth and survival dependent on phosphite[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7:44748.
- [37] ASIN-GARCIA E, BATIANIS C, LI Y S, et al. Phosphite synthetic auxotrophy as an effective biocontainment strategy for the industrial chassis *Pseudomonas putida*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2022, 21(1):156.
- [38] GONZÁLEZ-MORALES S I, PACHECO-GUTIÉRREZ N B, RAMÍREZ-RODRÍGUEZ C A, et al. Metabolic engineering of phosphite metabolism in *Synechococcus elongatus* PCC 7942 as an effective measure to control biological contaminants in outdoor raceway ponds[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2020, 13:119.
- [39] GOYAL A. Horizontal gene transfer drives the evolution of dependencies in bacteria[J]. *iScience*, 2022, 25(5):104312.
- [40] YOO J I, SEPPÄLÄ S, O'MALLEY M A. Engineered fluoride sensitivity enables biocontainment and selection of genetically-modified yeasts[J]. *Nature Communications*, 2020, 11:5459.
- [41] ZHOU Y, SUN T, CHEN Z, et al. Development of a new biocontainment strategy in model cyanobacterium *Synechococcus* Strains[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(11):2576-2584.
- [42] LOMBARDO L. Genetic use restriction technologies: a review[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2014, 12(8):995-1005.
- [43] G C B, ZHOU P, NAHA A, et al. Development of a xylose-inducible promoter and riboswitch combination system for manipulating gene expression in *Fusobacterium nucleatum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2023, 89(9):e0066723.
- [44] KELLY C L, TAYLOR G M, HITCHCOCK A, et al. A rhamnose-inducible system for precise and temporal control of gene expression in cyanobacteria[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(4):1056-1066.
- [45] NASERI G, RAASCH H, CHARPENTIER E, et al. A versatile regulatory toolkit of arabinose-inducible artificial transcription factors for Enterobacteriaceae[J]. *Communications Biology*, 2023, 6:1005.
- [46] BEHLE A, SAAKE P, GERMANN A T, et al. Comparative dose-response analysis of inducible promoters in cyanobacteria[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(4):843-855.
- [47] SENGUPTA A, BANDYOPADHYAY A, SARKAR D, et al. Genome streamlining to improve performance of a fast-growing *Cyanobacterium Synechococcus elongatus* UTEX 2973[J]. *mbio*, 2024, 15(3):e0353023.
- [48] MA Y, MANNA A, MOON T S. Advances in engineering genetic

- circuits for microbial biocontainment[J]. *Current Opinion in Systems Biology*, 2023, 36: 100483.
- [49] TORRES L, KRÜGER A, CSIBRA E, et al. Synthetic biology approaches to biological containment: pre-emptively tackling potential risks[J]. *Essays in Biochemistry*, 2016, 60(4): 393-410.
- [50] CHAN C T Y, LEE J W, CAMERON D E, et al. 'Deadman' and 'Passcode' microbial kill switches for bacterial containment[J]. *Nature Chemical Biology*, 2016, 12: 82-86.
- [51] MUKHERJEE S, BASSLER B L. Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17: 371-382.
- [52] STEPHENS K, BENTLEY W E. Synthetic biology for manipulating quorum sensing in microbial consortia[J]. *Trends in Microbiology*, 2020, 28(8): 633-643.
- [53] FREDENS J, WANG K H, de la TORRE D, et al. Total synthesis of *Escherichia coli* with a recoded genome[J]. *Nature*, 2019, 569: 514-518.
- [54] OSTROV N, LANDON M, GUELL M, et al. Design, synthesis, and testing toward a 57-codon genome[J]. *Science*, 2016, 353(6301): 819-822.
- [55] TIAN R Z, LIU Y F, CAO Y T, et al. Titrating bacterial growth and chemical biosynthesis for efficient N-acetylglucosamine and N-acetylneuraminic acid bioproduction[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 5078.
- [56] JIA B, QI H, LI B Z, et al. Orthogonal ribosome biofirewall[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2017, 6(11): 2108-2117.
- [57] DEBENEDICTIS E A, CARVER G D, CHUNG C Z, et al. Multiplex suppression of four quadruplet codons via tRNA directed evolution[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 5706.
- [58] BURNS J C, FRIEDMANN T, DRIEVER W, et al. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, 90(17): 8033-8037.
- [59] WRIGHT O, DELMANS M, STAN G B, et al. GeneGuard: a modular plasmid system designed for biosafety[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2015, 4(3): 307-316.
- [60] LIAO M J, DIN M O, TSIMRING L, et al. Rock-paper-scissors: Engineered population dynamics increase genetic stability[J]. *Science*, 2019, 365(6457): 1045-1049.
- [61] FIRTH J R. Reporter gene expression for monitoring microorganisms in the environment[M]. New Jersey: Humana Press, 2003: 187-200.
- [62] CAMPBELL-VALOIS F X, SANSONETTI P J. Tracking bacterial pathogens with genetically-encoded reporters[J]. *FEBS Letters*, 2014, 588(15): 2428-2436.
- [63] DIPLOCK E E, ALHADRAMI H A, PATON G I. Application of microbial bioreporters in environmental microbiology and bioremediation[J]. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, 2010, 118: 189-209.
- [64] ZHANG J C, LI S B, SUN T, et al. Oscillation of type IV pili regulated by the circadian clock in *Cyanobacterium Synechococcus elongatus* PCC7942[J]. *Science Advances*, 2024, 10(4): eadd9485.
- [65] SU L, JIA W Z, HOU C J, et al. Microbial biosensors: a review[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2011, 26(5): 1788-1799.
- [66] 赵静宇, 张健, 祁庆生, 等. 基于细菌双组分系统的生物传感器的研究进展[J]. *合成生物学*, 2024, 5(1): 38-52.
- ZHAO J Y, ZHANG J, QI Q S, et al. Research progress in biosensors based on bacterial two-component systems[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2024, 5(1): 38-52.
- [67] JUNG J K, ALAM K K, VEROSLOFF M S, et al. Cell-free biosensors for rapid detection of water contaminants[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38: 1451-1459.
- [68] DOONG S J, GUPTA A, PRATHER K L J. Layered dynamic regulation for improving metabolic pathway productivity in *Escherichia coli*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(12): 2964-2969.
- [69] 邓冈, 李露, 宋康. 水环境中致病菌快速检测技术及应用研究进展[J]. *环境科学研究*, 2023, 36(10): 1835-1844.
- DENG M, LI L, SONG K. Rapid molecular biology detection and risk assessment of waterborne pathogens: a review[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2023, 36(10): 1835-1844.
- [70] 谢润欣, 张崇森, 王晓昌, 等. 城市污水中病原性大肠埃希氏菌毒力基因 *eaeA* 和 *rfbE* 的实时荧光定量 PCR 检测[J]. *环境科学研究*, 2012, 25(8): 922-926.
- XIE R X, ZHANG C M, WANG X C, et al. Quantitative detection of virulence genes *eaeA* and *rfbE* of pathogenic *Escherichia coli* in municipal wastewater by real-time PCR[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2012, 25(8): 922-926.
- [71] GREEN A A, SILVER P A, COLLINS J J, et al. Toehold switches: de-novo-designed regulators of gene expression[J]. *Cell*, 2014, 159(4): 925-939.
- [72] PARDEE K, GREEN A A, TAKAHASHI M K, et al. Rapid, low-cost detection of Zika virus using programmable biomolecular components[J]. *Cell*, 2016, 165(5): 1255-1266.
- [73] 杜瑶, 高宏丹, 刘家坤, 等. CRISPR-Cas 系统在病原核酸检测中的研究进展[J]. *合成生物学*, 2024, 5(1): 202-216.
- DU Y, GAO H D, LIU J K, et al. Research progress of the CRISPR-Cas system in the detecting pathogen nucleic acids[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2024, 5(1): 202-216.
- [74] GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, LEE J W, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2[J]. *Science*, 2017, 356(6336): 438-442.
- [75] LI S Y, CHENG Q X, WANG J M, et al. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection[J]. *Cell Discovery*, 2018, 4: 20.
- [76] HOGAN C A, SAHOO M K, HUANG C H, et al. Five-minute point-of-care testing for SARS-CoV-2: not there yet[J]. *Journal of Clinical Virology: the Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 2020, 128: 104410.

- [77] PERVEZ M T,HASNAIN M J U,ABBAS S H,et al.A comprehensive review of performance of next-generation sequencing platforms[J].*BioMed Research International*,2022,2022:3457806.
- [78] 郭金,蒋娟,龙云川,等.基于 eDNA 宏基因组的草海湖泊硅藻群落及多样性分析 [J].*环境科学研究*,2024,37(5):1027-1036.
GUO J,JIANG J,LONG Y C,et al.Study on biodiversity and community of diatom in Caohai Lake based on eDNA metagenomics[J].*Research of Environmental Sciences*,2024,37(5):1027-1036.
- [79] BERNHARDS C B,LUX M W,KATOSKI S E,et al.barCoder:a tool to generate unique,orthogonal genetic tags for qPCR detection [J].*BMC Bioinformatics*,2021,22(1):98.
- [80] 卫涛,冯小刚,袁春伟,等.水中痕量微囊藻毒素的检测 [J].*环境科学研究*,2005,18(5):15-17.
WEI T,FENG X G,YUAN C W,et al.Determination of trace level microcystins in water[J].*Research of Environmental Sciences*,2005,18(5):15-17.
- [81] MENG X L,XU P,TAO F.RespectM revealed metabolic heterogeneity powers deep learning for reshaping the DBTL cycle [J].*iScience*,2023,26(7):107069.
- [82] GE X W,PEREIRA F C,MITTEREGGER M,et al.SRS-FISH:a high-throughput platform linking microbiome metabolism to identity at the single-cell level[J].*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,2022,119(26):e2203519119.
- [83] WATFORD S,WARRINGTON S J.Bacterial DNA mutations [M]. Florida:StatPearls Publishing LLC.,2024.
- [84] WU R N,DAVISON M R,NELSON W C,et al.Hi-C metagenome sequencing reveals soil phage-host interactions[J].*Nature Communications*,2023,14:7666.
- [85] KOSKELLA B,MEADEN S.Understanding bacteriophage specificity in natural microbial communities[J].*Viruses*,2013,5(3):806-823.
- [86] SUN R,SUN P F,ZHANG J H,et al.Microorganisms-based methods for harmful algal blooms control:a review[J]. *Bioresource Technology*,2018,248:12-20.
- [87] BIER E.Gene drives Gaining speed[J].*Nature Reviews Genetics*,2022,23:5-22.

(责任编辑:周巧富)