

微生物细胞传感器在环境监测中的应用研究进展*

陈 高^{1,2,3} 董元华^{1,2,3†}

(1 中国科学院南京土壤研究所土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 南京 210008)

(2 中国科学院南京土壤研究所-香港浸会大学土壤与环境联合开放实验室, 南京 210008)

(3 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘 要 微生物细胞传感器是以微生物细胞作为生物敏感元件,可以感应环境中的总毒性以及各类污染物,从而实现快速监测的目的。关于该领域的研究报道越来越多,随着研究的不断发展,该项技术日趋成熟,从开始的仅仅在环境总毒性监测方面的应用,发展到能够特异性地检测多种污染物,如重金属类(Hg、Cd、As、Pb、Cu、Ag、Ni等)、有机污染物类(苯系物质、PAHs、酚类物质等)、抗生素类(四环素、-内酰胺等)以及N、P类营养元素等等。由于微生物细胞自身的一些特点,使得其在环境监测领域具有非常显著的特点和优势,特别是在检测污染物的生物有效性方面,同时该技术可以满足环境监测中原位、快速、低耗的需要,所以其在环境监测领域必将得到越来越广泛的应用。本文重点综述了微生物细胞传感器在环境监测中的一些应用研究进展,并展望了其未来的发展趋势。

关键词 微生物细胞传感器;环境监测;生物有效性

中图分类号 X835 **文献标识码** A

微生物细胞传感器是指通过一定的固定化方法将生物敏感元件——对毒性环境或特定污染物有感应能力的微生物菌株和具有信号转换功能的介质相连,并借助一定的设备将信号放大输出。该装置可以对环境中的毒效应起感应作用,而新发展的特异性微生物细胞传感器已经可以检测某一类污染物。由于该设备的核心部分是具有报告功能的微生物细胞,而微生物无论在大小、数量、繁殖、遗传改造等方面均具有独特的优势,因此该类型的传感器可以满足环境监测中简单、快速、原位、低成本的要求,同时由于细胞是一个具有生物活性的个体,因此利用该方法所监测的毒物量均为生物有效性的,而这是一般的化学分析手段所不能达到的。所以微生物细胞传感器技术在环境监测中,有着非常广阔的应用前景。

关于微生物细胞传感器的概念、发展以及构建等方面的内容另文做了详细的综述。本文将重点介绍其在环境监测中的应用研究进展。

1 环境监测中的应用

最初形式的微生物细胞传感器是一些发光菌,由于在毒性环境下其生理代谢功能下降,导致发光信号也下降,可以据此来监测环境的总毒性;而后来随着分子生物学的发展,人们通过各种基因工程手段,利用对污染物有响应的多种调控元件来调控报告基因的表达,制成了半特异性以及特异性的微生物细胞传感器工程菌株,它们在特异性上有了较大的提高,可以用来监测多种毒性效应或某一种毒物。表1是目前已经报道过的部分微生物细胞传感器菌株及其报告基因系统与检测对象。

1.1 环境总毒性的监测

微生物细胞传感器报告菌株最早被应用于监测环境中总的毒性效应。早在1981年,Bulich等^[1]就第一次利用发光细菌 *Photobacterium phosphoreum* 这种非特异性的生物传感器,简单而快速地监测水样

*国家“十一五”科技支撑计划(2006BAD10B05)、中国科学院知识创新工程方向项目(KZCX3-SW-435、KSCX2-YW-N-51-02)、江苏省自然科学基金前期预研项目(BK2004219)和国家自然科学基金项目(40671093)资助

† 通讯作者, E-mail: yhdong@issas.ac.cn

作者简介:陈 高(1982~),男,江苏兴化人,硕士研究生,主要从事抗生素药物的环境生物监测研究;E-mail:gchen@issas.ac.cn

收稿日期:2007-01-15;收到修改稿日期:2007-04-04

表 1 目前已经报道的部分微生物细胞传感器菌株

Table 1 Some microbial strains reported as cell-based biosensor

污染物/胁迫 Pollutants/ Stress	调节基因/启动子系统 Regulate gene/ Promoter	报告基因 Reporter gene	参考文献 References
Hg()	<i>merR/ Pmer</i>	<i>luxCDABE, lacZYA, gfp</i>	[9 ~ 11]
Cu	<i>CueR/ PcopA</i>	<i>luxCDABE</i>	[12]
硝酸盐、亚硝酸盐 Arsenate, Arsenite	<i>arsR/ Pars</i>	<i>gfp</i>	[13]
Cd(), Pb(), Sb()	<i>cadC/ Pcad</i>	<i>gfp</i>	[14 ~ 15]
As	<i>arsB</i>	<i>luxAB</i>	[17]
As, Hg	<i>PmerTPAD, Pars</i>	<i>luc</i>	[18]
Ni	<i>celF</i>	<i>luxAB</i>	[19]
萘、水杨酸 Naphthalene, Salicylate	<i>nah operon</i>	<i>luxCDABE</i>	[20 ~ 21]
苯、甲苯、己苯、二甲苯 Benzene, Toluene, Ethylbenzene, Xylene	<i>tod operon</i>	<i>luxCDABE</i>	[22]
苯、甲苯、己苯、三氯乙烯 Benzene, Toluene, Ethylbenzene, Trichloroethylene	<i>Tbut/ PtbuA1</i>	<i>gfp</i>	[23]
苯、甲苯及其衍生物 Benzene, Toluene, and their derivations	<i>xylR/ Pu</i>	<i>luc</i>	[24 ~ 25]
C ₆ ~ C ₁₁ 烷烃 Middle-chain Alkanes	<i>alkS/ PalkB</i>	<i>luxAB</i>	[26]
萘 Naphthalene	<i>Psal</i>	<i>luxAB</i>	[27]
菲 Phenanthrene	<i>phn operon</i>	<i>gfp</i>	[28]
酚类物质 Phenols	<i>Pdmp</i>	<i>lacZ</i>	[30]
四环素 Tetracycline	<i>tetR/ PretA</i>	<i>luxCDABE, lacZYA, gfp</i>	[33 ~ 40]
-内酰胺 -lactams	<i>ampR/ ampC</i>	<i>luxCDABE</i>	[41]
氮 Nitrate	<i>ghnA, nblA</i>	<i>luxCDABE</i>	[42 ~ 43]
磷 Phosphorus	<i>phaA</i>	<i>luxCDABE</i>	[44]
DNA 损伤胁迫 DNA damage	<i>umuC</i>	<i>lacZ, gfp</i>	[45 ~ 46]
DNA 损伤胁迫 DNA damage	<i>sulA</i>	<i>lacZ</i>	[47]
DNA 损伤胁迫 DNA damage	<i>cda</i>	<i>luxCDABE</i>	[48]
氧化胁迫 Oxidative stress	<i>oxyR/ katG</i>	<i>luxCDABE</i>	[49]
辐射 Radiation	<i>recA, grpE, katG</i>	<i>luxCDABE</i>	[50]
UV 辐射 Ultraviolet Radiation	<i>recA</i>	<i>luxCDABE</i>	[51 ~ 52]

中总的毒物效应。这种微生物细胞传感器技术最早被 Microtox[®] 公司商业化开发利用,已经被广泛应用于环境监测的各个方面^[2]。我国在该方面也有过研究,1983年顾宗濂等筛选出一株明亮发光杆菌,用来测定污染水体中的生物毒性^[3]以及监测重金属污染土壤的总生物毒性^[4],并研制出了生物毒性(污染)测定仪。与传统的鱼、蚤和其他水生生物作为生物检测方法相比,发光细菌法具有简便、快速、灵敏、适应性强、重复性好、精度高、费用低、用途广等优点,凡有毒化合物、废水、废弃物的生物毒性均可测定。

目前,人们正努力筛选和构建生命力更旺盛,检测更准确和灵敏的微生物菌株来对环境进行监测。2002年 Ulitzur 等^[5]构建了布鲁氏菌(*Photobacterium leiognathi*)菌株用于水环境的监测;2003年 Wiles 等^[6]从污水中分离获得一株发光假单胞菌;2004年 Cho 等^[7]构建重组的 *Janthinobacterium lividum* 菌株并用于地下水的监测;同年 Gu 等^[8]将报告基因 *lac::luxCDABE* 融合,构建出非特异性的生物传感工程菌 *Escherichia coli*, GC2,并以固体琼脂培养基为介质将菌株固定在透明的玻璃小珠上,用于污染土壤中 PAHs 类毒物的生物有效性的监测。

1.2 重金属的监测

已经有大量文献报导通过构建不同的特异性微生物细胞传感器报告菌株检测各种重金属,特别是对污染环境中重金属生物有效性的评价。在1993年 Selifonova 等^[9]就报道,将和汞抗性相关的调控元 *merR/ Pmer* 与发光基因 *luxCDABE* 融合构建传感器,监测水样中的 Hg(II)。2000年 Sorensen 等^[10]利用相同的方法构建出可以检测汞的传感器菌株,最低检测浓度可以达到 0.2 ng g^{-1} ;而在同年 Sorensen^[11]又报道将该菌株用于测定土壤中汞的生物有效性。2002年 Leth 等^[12]将 *luxCDABE* 插入到可受铜诱导的调节基因/启动子 *CueR/ PcopA* 的下游构建出 *Alcaligenes eutrophus* AE1239 菌株,对铜有检测效果,最低检测浓度为 $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ 。同年 Robert 等^[13]利用绿色荧光蛋白(GFP),通过基因转录研制出一种细菌荧光素酶生物传感器,利用该生物传感器可检测亚微克水平的亚砷酸盐和砷酸盐,对砷污染地区能进行在线、长期的环境监测,效果显著且费用较低。2006年 Lian 等^[14]报道,利用 *cad* 启动子和 *cadC* 基因调控 *gfp* 基因的表达,构建工程菌 *E. coli* DH5 (pVLCD1),用于野外污染土壤和沉积物中重金属生物有效性的测定,可以检测到 0.1 nmol L^{-1} 的 Cd(),Sb()以及 10 nmol L^{-1} 的 Pb()。关于铬、铅、锌、铜、镉等其他重金属的监测还有许多相关的报道^[15~19],不再一一列举。

1.3 有机污染物监测

利用特异性微生物细胞传感器检测各种有机污染物的研究也有大量的报道。1990年 Sayler^[20]和他的合作者利用萘降解代谢途径中的 *nah* 操纵元和发光基因 *lux* 融合,构建了对萘有特异检测效果的微生物传感器。1994年 Sayler^[21]又利用 *nahG* 基因和 *luxCDABE* 融合改进了上面的报告菌株,并将构建成功的新菌株用于对污染河流中萘和水杨酸类物质的生物有效性进行连续在线的监测。1998年 Sayler^[22]又报道将 *tod* 操纵元和 *luxCDABE* 融合,转化到 *Pseudomonas putida* F1 菌株中,获得了一个对苯、甲苯、乙苯和二甲苯等苯系物有检测效应的生物传感器菌株 TVA8。而在2002年 Halverson^[23]也有过类似的研究报道,只是他们选用的是可以激活苯-甲苯利用途径的 *tbu* 基因,而报告基因选用的是绿色荧光蛋白基因 *gfp*。早在1998年,调控苯系物质降解的操纵元 *xylR* 就被应用于构建该类物质的报告菌株中,Willardson 等^[24]将该操纵元的启动子 *Pu* 克隆出来,与发光基因 *lux* 融合,然后转化到大肠杆

菌中,经改造的菌株可以检测污染水体和土壤中的苯、甲苯及其类似物。而2003年 Ikeno 等^[25]也有相似的报告,只是将报告基因 *lux* 换成了 *gfp*。

1997年 Sticher 等^[26]通过 *alkS/ PalkB :: luxAB* 融合构建的菌株可以用来检测地下污水样品中烷烃类污染物的生物有效性,利用辛烷标准样品做线性分析时,在 $24 \sim 100 \text{ nmol L}^{-1}$ 浓度范围内得到了相关性非常好的线性关系。2004年 van der Meer 等^[27]利用 *Psal* 启动子和 *luxAB* 基因融合构建的菌株,首次报道可以直接监测气态物质中的有机污染物,可以检测到 50 nmol L^{-1} 水平的萘类物质。2006年 van der Meer 等^[28]又将对菲有降解作用的菌株 *Burkholderia* sp. RP007 的基因启动子 (*phnS* putative promoter/operator region) 克隆出来,并将其与 *gfp* 连接,构建出新的菌株 *Burkholderia* sp. RP037,对菲一类的污染物有检测效果。同年,Paton 等^[29]又报道将 *luxCDABE* 导入到 *Pseudomonas fluorescens* 10586r pUCD607 菌株中,用来对土壤中有有机金属二苯锡的降解和毒性进行监测。而 Wise 等^[30]在2000年报道了可以监测酚类污染物的一株报告菌株。

我国的王平等^[31]研究了土壤中以及液体培养下,在反应底物癸醛的作用后,经发光酶基因 *luxAB* 标记的荧光假单胞菌 X16L2 的发光情况。在2001年,张志仁等^[32]也有相关的报道,他们构建了一个质粒,将萤火虫荧光素酶报告基因 (*luc*) 插到二恶英反应增强子的下游从而受其调控,然后将该质粒转入细胞,成功构建了一个含重组质粒的稳定细胞株,该菌株可用于二恶英类物质的检测。该方法的灵敏度是普通方法的3倍,线性范围更宽,监测时间更短。

1.4 抗生素的监测

抗生素作为一种新型的污染物质近年来日益得到关注,已有不少利用微生物细胞传感器技术来监测该类污染物质的报道。如,Chopra 等^[33]在1990年就报道,pSC101 质粒上的四环素抗性基因 *tetA*,受编码阻遏蛋白的 *tetR* 基因调控,在有四环素类抗生素存在的情况下会诱导 *tetA* 的表达。因此,在 *tetA* 基因的下游连接报告基因 *lacZ*,根据 *lacZ* 表达产生的 -半乳糖苷酶的情况可以检测环境中四环素族类抗生素的存在,最低的检测浓度可以达到 0.1 ng ml^{-1} ,并利用标准样品在 $1 \sim 12.5 \text{ ng ml}^{-1}$ 的浓度范围内获得了相关系数 0.992 的线性关系。2000年 Hansen 和 Sorensen^[34]改造小型 Tn5 质粒,该质粒包含可由四环素诱导的启动子 *Ptet* 和调节基因 *tetR*,将这两个基因组成的操纵元和一种报告基因系

统(*lacZYA*, *luxCDABE* 或 *gfp*)融合,从而改造成三种新的小型转座 Tn5 质粒。含有三种不同报告基因的质粒载体均被成功地转化到革兰氏阴性菌 *E. coli* 中,构建出可检测四环素类抗生素的生物传感器 MT102-PIR 菌株。这些报告菌株在四环素的诱导下可以表达 β -半乳糖苷酶、生物可见光或绿色荧光,通过检测表达信号的情况达到检测和半定量环境中四环素类抗生素的效果。2001 年 Sorensen^[35]又改进了上面的方法在启动子 *Ptet* 的上游增加了和高效转录起始相关的基因 *atpE*,构建了菌株 *E. coli* MC4100/pTGFP2,并利用该菌株检测土壤中土霉素的产生情况。在 2004 年 Sorenson 等^[36]又将上述传感器菌株应用在鼠肠道内定量检测四环素的存在,其检测的数量级为 $1\mu\text{g ml}^{-1}$ 。2005 年 Sorenson^[37]又进一步利用编码四环素抗性的基因 *tet(M)* 改造上面的菌株,构建 *E. coli* MC4100/pTGM,该菌株对四环素的抗性更强,通过一些对比实验发现其在实际应用中的优势。还有其他的一些报道,同样是利用 *tetR/Ptet* 调控系统构建微生物细胞传感器检测四环素类抗生素^[38~40]。

而在其他抗生素的检测方面,Valtonen 等^[41]在 2002 年报道将发光基因 *luxCDABE* 和对 β -内酰胺类抗生素有感应作用的启动子 *ampR/ampC* 融合构建成载体质粒 pBlaLux1,将其转化入大肠杆菌中,构建出对 β -内酰胺类抗生素有检测作用的工程菌 *E. coli* SNO301/pBlaLux1,该工程菌在有 β -内酰胺类抗生素存在时会产生光信号,并有较好的剂量效应曲线,可以依据此来测定 β -内酰胺类抗生素残留,当然对不同的抗生素有不同的测量范围:氨苄西林, $0.05 \sim 1.0 \mu\text{g ml}^{-1}$;哌拉西林, $0.0025 \sim 25\mu\text{g ml}^{-1}$;亚胺培南, $0.0025 \sim 0.25\mu\text{g ml}^{-1}$;头孢西丁, $0.0025 \sim 1.5\mu\text{g ml}^{-1}$;苯唑西林, $25 \sim 500\mu\text{g ml}^{-1}$ 。

1.5 N、P 等营养元素生物有效性的监测

微生物细胞传感器在环境监测中,另一个让人比较感兴趣的方面是它们可以用来监测营养元素的生物有效性。已经有许多实验室成功利用蓝藻菌(*cyanobacterium*)构建报告菌株,对 N、P 等营养元素的生物有效性进行监测。如, Mbeunkui 等^[42]和 Gllor 等^[43]分别报道了利用 *glnA::lux* 以及 *nblA::lux* 融合构建 *Synechococcus* sp. 和 *Synechocystis* sp. 菌株,这两个菌株均可以灵敏地监测有效性的氮。*Synechococcus* 中的 *glnA* 基因可以对 NH_4^+ 、 NO_3^- 、 NO_2^- 以及有机态氮进行响应;而 *Synechocystis* 中的 *nblA* 基因则主要被用来检测 NO_3^- 。2002 年 Gllor 等^[44]

报道了一个对磷的生物有效性高度敏感的生物传感器菌株,该菌株是将 *phoA::lux* 的融合基因导入 *Synechococcus*,利用该菌株测量到的淡水湖中的生物有效性磷的含量尚不到利用化学方法测得的总磷量的 1%。

1.6 环境中各种污染胁迫的监测

随着环境污染的加剧,多种毒物共同存在于环境中,对其中生物的生长会产生胁迫,造成如 DNA 损伤、蛋白质变性等。微生物细胞传感器技术提供了一种有效的途径来监测环境中的有关胁迫。该类微生物报告菌株一般是根据生物体对胁迫产生响应的机制而构建的,如生物体在遇到 DNA 损伤时会诱导其体内的 SOS 系统,在蛋白质受到损伤时产生热激反应等。已经有大量的文献报道了微生物细胞传感器用于监测环境中的各种胁迫,如 DNA 损伤胁迫^[45~48]、氧化胁迫^[49]、辐射^[51]、UV 辐射^[52, 53]等。

2 研究展望

由于微生物细胞传感器具有快速、在线、连续检测的优点,适应现代环境分析监测的需要。可以预见,在不久的将来,该技术必将在环境分析监测领域大放异彩。但是目前仍然有许多因素限制着该技术的应用,因此今后的研究工作也将主要围绕着这些挑战进行。

1) 实际检测过程中的响应时间。它是研究导入微生物细胞的强启动子对特异污染物响应的有效性以及报告基因启动表达效率的问题,它是限制传感器细胞灵敏度、精确性以及响应时间的关键。为了解决这一难点需要更深入地研究细菌基因表达调控网络方面的知识,将对微生物的转录分析和后基因组学的信息结合起来,这样可以寻找到对不同污染物更加特异和有效的新调控元件^[53~54]。另外,随着各种新的污染物不断出现,污染物的数量越来越多,也要求寻找到更多的对不同污染物响应的调控元件,以适用于不同的环境条件。

2) 信号的转换以及便携式传感器设备的研制是发展该技术的关键。由于在实际检测中要求能够原位、快速、准确,因此要求可以找到更灵敏的信号转换介质,将微生物细胞表达产生的信号精确、快速地转换放大为可以测量的信号。同时为了更方便地应用于实际环境监测,需要研制出以该技术为核心的一些传感器设备和仪器,这就需要将生物传感器报告菌株固定于生物芯片中,使得信号的感应、转

化、放大和监测集成在一个芯片上,可以迅速地完成。

3) 传感器细胞生物稳定性和一致性的问题。由于该类传感器使用微生物活体作为敏感元件,因此在应用于实际毒性环境检测时要求其具有稳定性、长期性和一致性。已经有一些文章涉及到微生物菌体活性保持的问题,如 Jansson 等^[55]描述了利用冷冻干燥、真空干燥、继代培养以及固定技术(制成生物芯片或固定在特殊的纤维上)等方法来保持菌体活性的方法。

4) 在实际应用中会产生假阴性问题,导致得出错误的结果。由于细胞的生长受到许多因素的影响,如营养状况、温度、含氧量等,而随着污染物组分越来越复杂,毒物浓度也越来越高,很容易使得细胞丧失活力死亡,检测不到信号,这样使得测量结果出现偏差,产生假阴性的结果。为了避免这种错误结果的产生,目前一般可以采用两种方法^[56]:第一种方法是利用细胞数量(一般是测定 OD₆₀₀)来指示其生长环境的总毒性,而报告基因的表达信号指示特定的毒物或胁迫;第二种方法就是采用双报告基因系统,可以导入一些在细胞内是恒量的、低水平表达的基因如 *recA*^[56-57],可以将该基因的表达情况作为基线来监测环境中总的毒性情况,而另外一个报告基因系统则指示目标毒物或胁迫压力。

尽管目前生物传感器技术的广泛应用仍面临着许多困难,但是随着新材料技术、新信号转换手段和强大的计算机软件技术的发展,将这些技术和微生物细胞传感器技术结合必将发挥该类传感器巨大的优势和潜力,在环境监测、食品卫生控制、国防安全等方面必将得到广泛的应用。

参考文献

- [1] Bulich A A, Isenberg D L. Use of the luminescent bacterial system for the rapid assessment of aquatic toxicity. *Isa Transactions*, 1981, 20(1): 29 ~ 33
- [2] Nunes-Halldorson V D, Duran N L. Bioluminescent bacteria: *lux* genes as environmental biosensors. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2003, 34: 91 ~ 96
- [3] 顾宗濂, 谢思琴, 吴留松, 等. 用生物发光计测定污染水体生物毒性. *环境科学*, 1983, 4(5): 30 ~ 34. Gu Z L, Xie S Q, Wu L S, *et al.* Measuring the bio-toxicity of polluted water by photobioluminometer (In Chinese). *Environmental Science*, 1983, 4(5): 30 ~ 34
- [4] 吴留松, 顾宗濂, 谢思琴. 应用发光细菌监测重金属污染土壤和底泥的总体生物毒性. *土壤*, 1987, 19(3): 145 ~ 147. Wu L S, Gu Z L, Xie S Q. Assessment of the total bio-toxicity in metal-contaminated soils and sediments using bioluminescent bacterial (In Chinese). *Soils*, 1987, 19(3): 145 ~ 147
- [5] Ulitzur S, Lahav T, Ulitzur N. A novel and sensitive test for rapid determination of water toxicity. *Environmental Toxicology*, 2002, 17: 291 ~ 296
- [6] Wiles S, Whiteley A S, Philp J C, *et al.* Development of bespoke bioluminescent reporters with the potential for *in situ* deployment within a phenolic-remediating waste water treatment system. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 55: 667 ~ 677
- [7] Cho J C, Park K J, Ihm H S, *et al.* A novel continuous toxicity test system using a luminously modified freshwater bacterium. *Biosensors & Bioelectronics*, 2004, 20: 338 ~ 344
- [8] Chang S T, Lee H J, Gu M B. Enhancement in the sensitivity of an immobilized cell-based soil biosensor for monitoring PAH toxicity. *Sensors and Actuators B*, 2004, 97: 272 ~ 276
- [9] Selifonova O, Burlage R, Barkay T. Bioluminescent sensors for detection of bioavailable Hg(II) in the environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(9): 3083 ~ 3090
- [10] Hansen L H, Sorensen S J. Versatile biosensor vectors for detection and quantification of mercury. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, 193: 123 ~ 127
- [11] Rasmussen L D, Sorensen S J, Turner R R, *et al.* Application of a *mer-lux* biosensor for estimating bioavailable mercury in soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 2000, 32: 639 ~ 646
- [12] Leth S, Maltoni S, Simkus R, *et al.* Engineered bacteria based biosensors for monitoring bioavailable heavy metals. *Electroanalysis*, 2002, 14(1): 35 ~ 42
- [13] Roberto F F, Barnes J M, Bruhn D F. Evaluation of a GFP reporter gene construct for environmental arsenic detection. *Talanta*, 2002, 58(1): 181 ~ 188
- [14] Lian V H, Chien M T, Ou K L, *et al.* Assessment of heavy metal bioavailability in contaminated sediments and soils using green fluorescent protein-based bacterial biosensors. *Environmental Pollution*, 2006, 142(1): 17 ~ 23
- [15] Tauriainen S, Karp M T, Chang W, *et al.* Luminescent bacterial sensor for cadmium and lead. *Biosensor and Bioelectronics*, 1998, 13(9): 931 ~ 938
- [16] Peltola P, Ivask A, Astroma M, *et al.* Lead and Cu in contaminated urban soils: Extraction with chemical reagents and bioluminescent bacteria and yeast. *Science of the Total Environment*, 2005, 350: 194 ~ 203
- [17] Cai J, DuBow M S. Use of a luminescent bacterial biosensor for biomonitoring and characterization of arsenic toxicity of chromated copper arsenate (CCA). *Biodegradation*, 1997, 8(2): 105 ~ 111
- [18] Tauriainen S, Virta M, Karp M T, *et al.* Measurement of firefly luciferase reporter gene activity from cells and lysates using *Escherichia coli* arsenite and mercury sensors. *Analytical Biochemistry*, 1999, 272(2): 191 ~ 198
- [19] Guzzo A, DuBow M S. A *luxAB* transcriptional fusion to the cryptic *celF* gene of *Escherichia coli* displays increased luminescence in the presence of nickel. *Molecular and General Genetics*, 1994, 242(4): 455 ~ 460

- [20] Burlage R S, Saylor G S, Larimer F. Monitoring of Naphthalene catabolism by bioluminescence with *nah-lux* transcription fusions. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172: 4749 ~ 4757
- [21] Saylor G S, Armin H, Malachowsky K, *et al.* Optical biosensor for environmental on-line monitoring of Naphthalene and Salicylate bioavailability with an immobilized bioluminescent catabolic reporter bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(5): 1487 ~ 1494
- [22] Applegate B M, Kehrmeier S R, Saylor G S. A chromosomally based *tot-luxCDABE* whole-cell reporter for benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) sensing. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(7): 2730 ~ 2735
- [23] Stiner L, Halverson L J. Development and characterization of a green fluorescent protein-based bacterial biosensor for bioavailable toluene and related compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(4): 1962 ~ 1971
- [24] Willardson B M, Wilkins J F, Rand T A, *et al.* Development and testing of a bacterial biosensor for toluene-based environmental contaminants. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(3): 1006 ~ 1012
- [25] Ikono S, Ogino C, Ito T, *et al.* Detection of benzene derivatives by recombinant *E. coli* with Ps promoter and GFP as a reporter protein. *Biochemical Engineering Journal*, 2003, 15: 193 ~ 197
- [26] Sicher P, Jaspers M C M, Stemmler K, *et al.* Development and characterization of a whole-cell bioluminescent sensor for bioavailable middle-chain alkanes in contaminated groundwater samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(10): 4053 ~ 4060
- [27] Werlen C, Jaspers M C M, van der Meer J R. Measurement of biologically available naphthalene in gas and aqueous phases by use of a *Pseudomonas putida* biosensor. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(1): 43 ~ 51
- [28] Tecon R, Wells M, van der Meer J R. A new green fluorescent protein-based bacterial biosensor for analysing phenanthrene fluxes. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(4): 697 ~ 708
- [29] Paton G I, Cheewasedtham W, Marr I L, *et al.* Degradation and toxicity of phenyltin compounds in soil. *Environmental Pollution*, 2006, 144(3): 746 ~ 751
- [30] Wise A A, Kuske C R. Generation of novel bacterial regulatory proteins that detect priority pollutant phenols. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(1): 163 ~ 169
- [31] 王平, 王绩, 胡正嘉, 等. 发光酶基因标记荧光假单胞菌 X16L2 的发光研究. *土壤学报*, 1998, 35(4): 545 ~ 552. Wang P, Wang J, Hu Z J, *et al.* Bioluminescence of *luxAB*-genes-marked *Pseudomonas fluorescens* X16L2 (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 1998, 35(4): 545 ~ 552
- [32] 张志仁, 徐顺清, 周宜开, 等. 虫荧光素酶报告基因用于二噁英类化学物质的检测. *分析化学*, 2001, 29(7): 825 ~ 827. Zhang Z R, Xu S Q, Zhou Y K, *et al.* Detection of dioxin and its derivations by *luc* reporter gene (In Chinese). *Analytical Chemistry*, 2001, 29(7): 825 ~ 827
- [33] Chopra I, Hacker K, Misulovin Z, *et al.* Sensitive biological detection method for tetracyclines using a *tetA-lacZ* fusion system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1990, 34(1): 111 ~ 116
- [34] Hansen L H, Sorensen S J. Detection and quantification of tetracyclines by whole cell biosensors. *FEMS Microbiology Letters* 2000, 190(2): 273 ~ 278
- [35] Hansen L H, Ferrari B, Sorensen S J, *et al.* Detection of oxytetracycline production by *Streptomyces rimosus* in soil microcosms by combining whole-cell biosensors and flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(1): 239 ~ 244
- [36] Bahl M I, Hansen L H, Sorensen S J, *et al.* In vivo detection and quantification of tetracycline by use of a whole-cell biosensor in the rat intestine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004, 48(4): 1112 ~ 1117
- [37] Bahl M I, Hansen L H, Sorensen S J. Construction of an extended range whole-cell tetracycline biosensor by use of the tet(M) resistance gene. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 253(2): 201
- [38] Korpela M T, Kurittu J S, Karp M T, *et al.* A recombinant *Escherichia coli* sensor strain for the detection of tetracyclines. *Anal. Chem.*, 1998, 70(21): 4457 ~ 4462
- [39] Anko M L, Kurittu J, Karp M T. An *Escherichia coli* biosensor strain for amplified and high throughput detection of antimicrobial agents. *Journal of Biomolecular Screening*, 2002, 7(2): 119 ~ 125
- [40] Karp M T, Galluzzi L. Amplified detection of transcriptional and translational inhibitors in bioluminescent *Escherichia coli* K-12. *Journal of Biomolecular Screening*, 2003, 8(3): 340 ~ 346
- [41] Valtonen S J, Kurittu J S, Karp M T. A luminescent *Escherichia coli* biosensor for the high throughput detection of β -lactams. *Journal of Biomolecular Screening*, 2002, 7(2): 127 ~ 134
- [42] Mbeunkui F, Richaud C, Etienne A L, *et al.* Bioavailable nitrate detection in water by an immobilized luminescent cyanobacterial reporter strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 60(3): 306 ~ 312
- [43] Gillor O, Harush A, Belkin S, *et al.* A *Synechococcus PglmA:luc* fusion for estimation of nitrogen bioavailability to freshwater Cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(3): 1465 ~ 1474
- [44] Gillor O, Hadas O, Belkin S, *et al.* Phosphorus bioavailability monitoring by a luminescent cyanobacterial sensor strain. *Journal of Phycology*, 2002, 38: 107 ~ 115
- [45] Nakamura S I, Oda Y, Shimada T, *et al.* SOS-inducing activity of chemical carcinogens and mutagens in *Salmonella typhimurium* TA1535/pSKI002: Examination with 151 chemicals. *Mutat. Res.*, 1987, 192(4): 239 ~ 246
- [46] Justus T, Thomas S M. Evaluation of transcriptional fusions with green fluorescent protein versus luciferase as reporters in bacterial mutagenicity tests. *Mutagenesis*, 1999, 14(4): 351 ~ 356
- [47] Quillardet P, Huisman O, D'ari R, *et al.* SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K12 to measure genotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, 79(19): 5971 ~ 5975
- [48] Pittslyn L R, Horneck G, Komova O, *et al.* A biosensor for environmental genotoxin screening based on an SOS *lux* assay in recombinant *Escherichia coli* cells. *Applied and Environmental Microbiology*,

- 1997, 63(11): 4377 ~ 4384
- [49] Belkin S, Smulski D R, Vollmer A C, *et al.* Oxidative stress detection with *Escherichia coli* harboring a *katG*'::*lux* fusion. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(7): 2252 ~ 2256
- [50] Min J, Lee C W, Gu M B, *et al.* Detection of radiation effects using recombinant bioluminescent *Escherichia coli* strains. *Radiation and Environmental Biophysics*, 2000, 39(1): 41 ~ 45
- [51] Elasi M O, Miller R V. A *Pseudomonas aeruginosa* biosensor responds to exposure to ultraviolet radiation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1998, 50(4): 455 ~ 458
- [52] Elasi M O, Miller R V. Study of the response of a biofilm bacterial community to UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(5): 2025 ~ 2031
- [53] Dreier J, Breitmaier E B, Gocke E, *et al.* Direct influence of S9 liver homogenate on fluorescence signals: Impact on practical applications in a bacterial genotoxicity assay. *Mutation Research- Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2002, 513: 169 ~ 182
- [54] Zhang X X, Cheng S P, Zhu C J, *et al.* Microbial PAH-degradation in soil: Degradation pathways and contributing factors. *Pedosphere*, 2006, 16(5): 555 ~ 565
- [55] Bjerketorp J, Hakansson S, Jansson J K, *et al.* Advances in preservation methods: Keeping biosensor microorganisms alive and active. *Current Opinion in Biotechnology*, 2006, 17: 43 ~ 49
- [56] Sorensen S J, Burmole M, Hansen L H. Making bio-sense of toxicity: New developments in whole-cell biosensors. *Current Opinion in Biotechnology*, 2006, 17(1): 11 ~ 16
- [57] Voller A C, Belkin S, Smulski D R, *et al.* Detection of DNA damage by use of *Escherichia coli* carrying *recA*'::*lux*, *uvrA*'::*lux*, or *alkA*'::*lux* reporter plasmids. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(7): 2566 ~ 2571

APPLICATION OF MICROBIAL CELL-BASED BIOSENSORS IN ENVIRONMENTAL MONITORING

Chen Cao^{1,2,3} Dong Yuanhua^{1,2,3†}

(1 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

(2 Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences and Hong Kong Baptist University (ISSAS-HKBU) Joint Laboratory on Soil and Environment, Nanjing 210008, China)

(3 Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Microbial cell-based biosensors take microorganism cells for biological sense organs, which are capable of quickly sensing and/or detecting total toxicity and various kinds of pollutants in the environment. More and more reports in this field have been published. With the rapid progress of the research, this technique has become more and more mature. At first, it could only monitor total toxicity of the environment with the aid of bioluminescent bacteria, and now it can be used to detect specifically various kinds of pollutants, including heavy metals (such as Hg, Cd, As, Pb, Cu, Ag, and Ni), organic pollutants (such as benzene, toluene, and PAHs), antibiotics (such as tetracycline, -lactams), and even nutrient elements (such as nitrogen, phosphorus). Because of the characteristics of microorganism cells, this technology shows significant advantages and remarkable potentiality in the field of environmental monitoring, especially in detecting the bioavailability of pollutants. It can be used as an effective tool in *in-situ* environmental monitoring, quick and low in cost. So it can be expected that the technology will find more extensive application in environmental monitoring. A review of advancements in application of Microbial cell-based biosensors to environmental monitoring is presented and its future trends are also discussed.

Key words Microbial cell-based biosensors; Environmental monitoring; Bioavailability