

# 微生物细胞传感器在环境监测中应用进展

窦敏娜

(咸阳职业技术学院, 陕西 咸阳 712000)

**摘要:** 本文主要阐述了微生物细胞传感器的概念、特点、原理、应用领域及发展方向。特别是在环境监测中所起的重大作用, 其中重点介绍了微生物传感器在重金属污染检测中的应用。

**关键词:** 微生物细胞传感器; 报道基因; 环境监测; 重金属

**中图分类号:** X830

**文献标识码:** A

**文章编号:** 94047-(2018)01-043-04

近年来, 随着工业化程度的加剧, 重金属越来越多地暴露于人类生存的环境中, 特别是土壤环境中重金属污染尤为严重, 这些重金属在影响土壤微生物群落结构的同时, 被植物摄取最终通过食物链对人体造成毒害<sup>[1]</sup>。因此, 土壤重金属污染检测已成为当前环境监测与治理的主要内容之一。目前检测重金属主要有两种方法: 一是物理化学分析法。其准确度和灵敏度都很高, 但需要成套昂贵的精密分析仪器和专业化实验室, 并且这种方法不能实际反映重金属对生命体的毒害和其生物利用度。另一种方法是直接利用模式生命体本身对重金属进行检测。

由于微生物广泛存在于各种生境中, 其群落大、生长快、成本低、易保藏。因此, 在现有的利用生命体对重金属进行检测的方法中, 以微生物监测系统的利用最为广泛。本文主要论述微生物细胞传感器的原理、构建及其在重金属污染环境监测中的应用。

## 1 微生物细胞传感器

生物传感器是指能识别物理、化学变化的生物感应装置, 通过偶联一个换能元件, 便可产生一可测信号。能在极低浓度下, 快速、灵敏、准确监测存在于生物流体、水、空气、土壤以及其他环境中的各种检测物。这些检测反应都是基于监测系统和被检测物之间存在着专一性识别作用, 如酶和底物、抗原和抗体、特定分子和受体等<sup>[2]</sup>。

用一个活的有功能的稳定的微生物细胞作为监测系统, 便是微生物细胞传感器。此系统最大好处是作为单细胞传感器, 可直接最大面积与检测物接触, 并能快速真实地反映生物利用度和污染物对细胞的毒害。

### 1.1 微生物细胞传感器原理

微生物细胞传感器是通过基因融合将与特定检测物相关启动子元件和报道基因构建于质粒或染色体DNA上, 并在宿主菌中表达。当环境中存在目标分析物时, 与该分析物相关的启动子开启, 继而使报道基因表达。用于识别分析物的复合物可以是酶、受体及抗体等。

微生物细胞传感器主要由感应元件和报道基因组成。感应元件通常由与被检测物相关的特异识别蛋白基因和启动子元件构成。感应元件决定了该系统的专一性, 即特异识别能力。而报道基因不需要特异识别, 只要融合在被检测物诱导的启动子后就可表达, 报道基因的表达量和强度反映了该系统的灵敏度和检测阈值。

### 1.2 启动子元件

1.2.1 特异性感受系统 在微生物传感器启动子元件中, 特异性最强的便是受各种重金属诱导的启动子。当环境中存在某种重金属时, 与其相关的特异性启动子才能被诱导而开启, 如受砷和镉诱导的ars基因启动子, 受铜诱导的cup基因启动子, 受镉和铅诱导的cad基因启动子<sup>[1]</sup>, 受铬诱导的chr基因启动子以及受汞诱导的mer基因启动子<sup>[2]</sup>。

收稿日期: 2017-12-17

作者简介: 窦敏娜(1987—), 女, 微生物学硕士研究生。讲师, 主要从事环境微生物研究工作。

1.2.2 非特异性感受系统 微生物传感器中,有一些是特异性较低的,常称非特异性感受系统。被广泛报道和应用的主要是热激蛋白(Heat-shock)基因启动子和SOS基因(rec)启动子系统,这些系统主要用于检测环境中有毒物质污染。有毒物质可选择压力使热激蛋白(Heat-shock)基因表达,应用于此响应的基因启动子如:hsp70(dank)、hsp60(groEL)、grpE、lon以及应用最广泛的压力启动子uspA<sup>[3]</sup>。

SOS是细胞中遗传物质修复系统,当DNA受损时此系统可被激活。它可直接修复受损DNA,或允许细胞在受损期间承受损害压力,直到修复开始。因此,可利用SOS基因(rec)启动子与报道基因相融合,可对细胞遗传物质损害进行报道,来检测对遗传物质造成损害的毒性物质。Amelita J.Dartolome等就报道了将绿色荧光蛋白(GFP)基因与SOS(recA)启动子融合的质粒转化到大肠杆菌来检测破坏细胞遗传物质的毒性物质萘啶酸。Fron sagi 等也成功地将GFP、lux基因分别与SOS(recA)、Heat-shock(grpE)基因启动子融合来检测对细胞有毒害的物质<sup>[4]</sup>。

### 1.3 报道基因

本文主要介绍几种重要、普遍应用的发光报道基因,他们与诱导型启动子融合均能产生可测荧光信号。一种是间接发光,如Lux(细菌荧光素酶),Luc(萤火虫荧光素酶), $\beta$ -Gal( $\beta$ -半乳糖苷酶),它们都是通过催化外加底物而发光。另一种是直接发光,现在研究和应用最多的是水母绿色荧光蛋白(GFP),因为它不需外加任何底物自身就能直接发光,使报道过程更加简洁、快捷、准确,已受到广泛关注<sup>[5]</sup>。

但它们作为报道基因都要具备一些基本特性:

(1)报道基因的表达量和活性应该是易分析的;  
(2)能相应地反映被分析物的量和浓度;(3)细胞内不存在与报道基因产物相似的内源蛋白或酶,或量极少。

1.3.1  $\beta$ -gal  $\beta$ -gal是应用最早报道基因,最早是从大肠杆菌中获得,它是通过水解含有 $\beta$ -半乳糖苷键的不同底物,产生各种可测荧光或电化学信号。

1.3.2 Lux与Luc Lux(细菌荧光素酶)基因是应用

最为成熟的报道基因, Luc(萤火虫荧光素酶)是从萤火虫体内提取的一种荧光素酶。他们都是通过催化、氧化底物而产生荧光,但Luc比Lux灵敏度高,约是Lux的10倍<sup>[6]</sup>。

1.3.3 GFP GFP是从水母中提取的一种发光蛋白,其优点是自动发光,不用再外加源底物或辅助因子促其发光。近两年,GFP已成为研究热点,特别是对其结构进行优化已获得许多更为高效的绿色荧光蛋白。Haidong Shi等人将GFP与LPP-ompA的羧基端连接,使其在大肠杆菌细胞外能正常发光,可用于研究多肽链、免疫学、信号转导以及构建微生物传感器等。<sup>[7]</sup>

## 2 微生物细胞传感器在重金属检测中的应用

由于水系统、土壤环境已经受到重金属的严重污染,对人的生存和发展造成威胁,所以对人类生存环境中的重金属进行评估、检测已经显得极为重要;加之微生物细胞传感器特异性强、灵敏度高、应用简单、快捷、可进行低水平检测,并能真实反映重金属的生物利用度和对细胞的毒害,因此,目前已被广泛研究和应用于各种重金属的检测。在此仅阐述几种被广泛报道的重金属微生物传感器。

### 2.1 砷和镉

砷和镉以砷酸盐和镉酸盐的形式广泛存在于自然界中。将砷酸盐诱导型操纵子ars与没有启动子的细菌荧光素酶基因(lux)融合构建在特定质粒上,导入宿主菌,便构建了用以检测砷和镉污染的微生物传感器。(即当砷酸盐进入宿主细胞便诱导lux基因的表达,水解外加底物便可产生一可测发光信号。)Ramanathan等人组建了pRLux质粒,并让其在E.coli中表达,可在极其低浓度下检测砷酸盐的存在<sup>[2]</sup>。Helen C.Flynn等也用Lux构建了E.coli.CM1166PC200传感器来检测砷和镉。<sup>[8]</sup>F.Raberto等报道用GFP(绿色荧光蛋白)报道基因检测砷和镉酸盐<sup>[9]</sup>。

### 2.2 铜

铜是一种重要的催化共用因子,可激活许多蛋白酶。但铜只是必须的微量元素,浓度过高对核酸、蛋白质等生物大分子有破坏作用。铜常以杀菌剂、猪生长促进因子形式进入环境。将与铜代谢相关的cup1基因启动子与无启动子的报道基因融合可

以低浓度、快捷方便监测环境中的铜污染。如用在大肠杆菌中表达的质粒pCuGFP (cup-gfp) 来检测铜离子。<sup>[2]</sup>Tom-Peterson 和Stoanov等将Lux基因分别构建于假单胞杆菌和大肠杆菌中检测土壤中铜和银污染<sup>[8]</sup>。

### 2.3 镉

Tauriainen等构建了一个由隔诱导操纵子cad和萤火虫荧光素酶基因(Luc)的融合质粒pTOO24, 让其在葡萄球菌和枯草杆菌中表达。发现其对隔离子有极强特异性, 同时对铅和镉也有检测作用<sup>[7]</sup>。

### 2.4 铬

铬一般以CrO<sub>4</sub><sup>2-</sup>和Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>2-</sup>形式存在于环境中。据报道将与铬代谢有关的chr基因同Lux基因融合的质粒pEB2141导入对铬有抗性的菌株中, 已建立了通过检测荧光素酶活性而测定铬浓度的感应系统。

### 2.5 汞

汞具有极高毒性且以各种形式存在于环境中, 也是现在研究最多的毒性物质之一。Virta等将汞诱导的调节蛋白基因merR和mer启动子同Luc基因融合构建了质粒pTOOIT, 并将其转化到E.coliMC1061进行表达, 此系统对汞有极高敏感性和特异性<sup>[2]</sup>。Rasmussen和Bontidean<sup>[20]</sup>等也分别构建了mer-Lux质粒, 用大肠杆菌发光系统来检测土壤中可被生物利用的活性汞组分。Hestbjerg Hanson等成功地应用三种报道基因: LuxCDABE、gfp、lacZYA(乳糖操纵子)分别与来自T21的汞诱导启动子Pmer和merR调节基因融合构建质粒, 并转化到革兰氏阴性细菌中来检测土壤中的汞污染<sup>[8]</sup>。

## 3 微生物传感器的发展方向

### 3.1 双发光检测

利用两种不同的发光微生物细胞传感器同时检测两种不同物质, 可研究物质之间的相互作用。如用E.coli.HB101PuCD607 和假单胞菌10586PD607来检测铜和锌、镉和锌同时存在时, 它们之间毒性影响以及生物利用度。<sup>[3]</sup>Suresh Shrestha 等将SD909 (lac::bfp2) 和PBAD-GFPuv) araC::gfpuv) 分别转入不同的大肠杆菌构建了两个微生物传感器, 用于同时检测样品中存在的分析物β-半乳糖和L-阿拉伯糖, 此系统对这两种分析物的检测具有极高的选择性。

### 3.2 双标记检测

在同一个细胞内用两种不同诱导型启动子分别和两种不同报道基因融合, 可用一个传感器同时检测两种不同分析物。如Heat-shock (grpE::ds red) 和SOS (recA::gfp), recA启动子是SOS修复系统的一部分, 可被DNA损伤(遗传物质损伤)激活, GrpE是Heat-shock蛋白, 其启动子可由造成细胞普通损害(非遗传物质损伤)的化学物质诱导, 能很好反映细胞所受毒性压力。这种微生物传感器能同时检测对细胞遗传物质有毒性的物质和一般毒性物质。

### 3.3 微生物细胞传感器固定化

将微生物细胞固定化经历了只限于实验室使用到野外实时、实地使用的过程。最早是将微生物细胞固定于固体培养基中, 但对气体检测效果不是太好, 因毒气不易扩散进入培养基与微生物细胞直接接触。为改善对气体检测, 提高灵敏度, Geuncheol Gil 等将培养基变薄并加入透明玻璃珠, 发现检测极限、灵敏度都明显提高。<sup>[22]</sup>Suk tai chang 等在应用发光细菌GC2 (lac: : LuxCDABE) 来测定土壤中菲(用于合成燃料和农药)生物利用度时, 将其固定于含透明玻璃珠的琼脂和鼠李糖培养基中, 发现减小玻璃珠的直径可增强传感器的灵敏度和检测极限<sup>[9]</sup>。

固定化进一步发展就是将细胞包埋于藻酸盐珠中, Merav Tauber 等就将发光微生物细胞包埋于藻酸盐珠中, 成功地用于实地检测卤代有机酸, 并证明该菌可在4℃保存40多天而活性没有明显变化。也有报道将大肠杆菌包埋于藻酸钠而固定化的<sup>[10]</sup>。

现在将微生物传感器固定于各种膜上, 使实地检测更加方便, 已经得到广泛应用。如R.S.Dubey将假单胞菌生物传感器固定于醋酸纤维膜<sup>[11]</sup>; J.Jrogl等将荧光假单胞菌HK44固定于1mm厚硅胶薄膜上, 用荧光计检测发光来测萘; Jim C.philp 等将对数生长期末期的假单胞菌BS556 (LuxCDABE) 与PVA(聚乙烯醇)混合制成薄膜, 用于野外检测含酚醛树脂的污水; 也有将红色细菌NCIMB40757固定于二甲基化硅树脂片上(1mm厚), 检测水中丙烯腈, 且在2-50mM呈线性变化。<sup>[12]</sup>

### 3.4 便携式自动化微生物传感器

Jeseoph J.Pancrazio等首次提出便携式微生物传感器, 将被激活的微生物细胞贴附排列于镀金电极

上; Micheal L.Simpson 等将发光细菌固定于各种有机物、无机物上, 配以光电换能元件, 通过集成电路将信号传输给计算机进行自动化检测。Isreal Brian 等将发光大肠杆菌高密度固定排列于光学玻璃纤维上, 经光信号传导, 进一步将光信号转化为计算机内数字信号来检测汞污染; 也有类似于此法将细胞包埋于藻酸钠内用光纤来检测<sup>[13]</sup>。

Saylor<sup>[14]</sup>和Erick.Bolton<sup>[14]</sup>等用CMOS(互补金属氧化物半导体)微生物照度计作为生物发光报道集成电路一部分来测低水平微生物发光, 使自动化微生物传感器得到改进。De Busschere<sup>[15]</sup>等也已应用COMS硅芯片作为便携式传感器集成电路一部分进行现场测量<sup>[15]</sup>。微生物传感器向自动化方向发展是一个漫长、复杂的过程, 需不断尝试、改进, 相信随着科技的发展其一定会更加完善。

## 结语

近年来微生物细胞传感器应用取得了极大进展, 由于其能提供灵敏、快捷、简洁、特异性、低水平检测, 已经被广泛应用于检测各种毒性物质, 特别是在环境监测中, 对目标物进行跟踪报道。但大多都处于小试阶段, 相信随着生物学及其相关学科、工程学科发展, 将能更加真实、在线反映检测物情况, 若与电脑相连提供数据处理, 将进一步促进微生物传感器广泛应用。

现在应用的微生物细胞传感器宿主菌基本上都是大肠杆菌, 这就限制了其在特殊条件下应用。如在环境污染的废物监测中, 找到对毒物具有抗性的菌株作为宿主; 在工业上, 以嗜热菌作为发酵罐以及其他高温环境中的微生物传感器; 嗜冷菌(抗寒蛋白)生物传感器在低温储存条件下进行食品监测; 以及嗜盐耐酸等极端环境微生物的开发应用, 将会使微生物传感器的应用领域更加广阔。

## 参考文献

- [1]Sisko Tauriainen,Matti Karp,Wei Chang and Marko Virta: Luminescent bacterial sensor for cadmium and lead Biosensors and Bioelectronics,1998,13(9):931-938.
- [2]Francisco F.Roberto,Joni M.Evaluation of a GFP reporter gene construct for environmental arsenic detection. Talanta,2002,58(1):181-188 .
- [3]S. F. D'Souza:Microbial biosensors. Biosensors and Bioelectronics.2001,16(6):337-353.
- [4]Eran Sagi.Fluorescence and bioluminescence reporter functions in genetically modified bacterial sensor strains Sensors and Actuators B:Chemical,2003, 90(1-3):2-8 .
- [5]Johan H.J.Leveau and Steven E. Lindow.Bioreporters in microbial ecology Current Opinion in Microbiology, 2002,5(3):259-265.
- [6]Suk Tai Chang,Hyun Joo Lee and Man Bock Gu: Enhancement in the sensitivity of an immobilized cell-based soil biosensor for monitoring PAH toxicity. Sensors and Actuators B: Chemical,2004,97(2-3):272-276.
- [7]Huidong Shi and Wei Wen Su:Display of green fluorescent protein on Escherichia coli cell surface. Enzyme and Microbial Technology,2001,28(1):25-34 .
- [8]Andreas Tom-Petersen. Identification of copper-induced genes in Pseudomonas fluorescens and use of a reporter strain to monitor bioavailable copper in soil FEMS Microbiology Ecology,2001,38(1): 59-67.
- [9]Celine Chouteau:Development of novel conductometric biosensors based on immobilized whole cell Chlorella vulgaris microalgae.Biosensors and Bioelectronics, 2004,19(9):1089-1096.
- [10]Boris Polyak.Bioluminescent whole cell optical fiber sensor to genotoxicants:system optimization.Sensors and actuators B:Chemical,2003,74(1-3):18-26.
- [11]R.S.Dubey and S.N.Upadhyay Microbial corrosion monitoring by an amperometric microbial biosensor developed using whole cell of Pseudomonas sp. Biosensors and Bioelectronics,2001,16(9-12):995-1000.
- [12]Jim C.Philp,Séverine Balmand.Whole cell immobilised biosensors for toxicity assessment of a wastewater treatment plant treating phenolics-containing waste Analytica Chimica Acta,2003, 487(1): 61-74.
- [13]Israel Biran.Optical imaging fiber-based live bacterial cell array biosensor.Analytical Biochemistry Volume, 2003,315(1):106-113.
- [14]Eric K.Bolton: Simpson Integrated CMOS photodetectors and signal processing for very low-level chemical sensing with the bioluminescent bioreporter integrated circuit Sensors and Actuators B:Chemical,2002,85(1-2): 179-185.
- [15]B.Derek DeBusschere and Gregory T.A.Kovacs Portable cell-based biosensor system using integrated CMOS cell-cartridges Biosensors and Bioelectronics, 2001,16(7-8):543-556.

[责任编辑: 王军利]