

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第34卷 第3期

Vol.34 No.3

2013

中国科学院生态环境研究中心 主办
科学出版社 出版



目次

BP网络框架下MODIS气溶胶光学厚度产品估算中国东部PM _{2.5}	郭建平, 吴业荣, 张小曳, 李小文(817)
北京市近地层颗粒物浓度与气溶胶光学厚度相关性分析研究	林海峰, 辛金元, 张文煜, 王跃思, 刘子锐, 陈传雷(826)
气象因素对长三角背景地区甲烷浓度的影响分析	浦静姣, 徐宏辉, 顾骏强, 马千里, 方双喜, 周凌晔(835)
密闭化填埋作业条件下的场内恶臭污染分布情况与分析	路鹏, 吴世新, 戴志锋, 张晓辉, 苏昭辉, 周小飞, 代占国, 卢旭飞, 郑斌, 沈凯, 卫潘明(842)
冬季中国东海海水中挥发性卤代烃的分布特征和海-气通量	何真, 陆小兰, 杨桂朋(849)
2000~2010年大鹏湾颗粒有机物的年变化和年际变化	李绪录, 周毅频, 夏华永(857)
渤海湾浮游植物与环境因子关系的多元分析	周然, 彭士涛, 覃雪波, 石洪华, 丁德文(864)
青藏高原淡水湖泊水化学组成特征及其演化	王鹏, 尚英男, 沈立成, 伍坤宇, 肖琼(874)
漳卫南运河流域非点源污染负荷估算及最佳管理措施优选	徐华山, 徐宗学, 刘品(882)
面向对象的湖泊污染控制智能工程设计方法	邹锐, 周璟, 刘永, 朱翔, 赵磊, 阳平坚, 郭怀成(892)
九龙江口湿地植物凋落物对沉积物有机质赋存的贡献	罗专溪, 邱昭政, 王振红, 颜昌宙(900)
修复达标土壤回填对地下水环境影响的层次化评估方法应用研究	钟茂生, 姜林, 姚珏君, 樊艳玲, 夏天翔, 李婷婷, 田美影(907)
去除地下水中硝酸盐的渗透性反应墙研究	李秀利, 杨君君, 卢晓霞, 张姝, 侯珍(914)
北京城区雨水管道沉积物污染负荷研究	李海燕, 徐波平, 徐尚玲, 崔爽(919)
城市污水处理厂及其受纳水体中5种典型PPCPs的赋存特征和生态风险	温智皓, 段艳平, 孟祥周, 陈玲(927)
城市景观娱乐水体微生物风险评价	孙傅, 沙婧, 张一帆, 刘彦华(933)
模拟曝气生物滤池去除邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯试验研究	李伟, 赵晶, 余健, 任文辉(943)
膜生物反应器处理工业废水中膜污染及膜过滤特性研究	范举红, 余素林, 张培帅, 兰亚琼, 刘锐, 陈吕军(950)
γ -Al ₂ O ₃ 负载磷钨酸催化强化电化学法处理水中酸性大红3R的研究	岳琳, 王开红, 郭建博, 杨景亮, 刘宝友, 廉静, 王涛(955)
活性炭催化过硫酸钠降解金橙G动力学	杨梅梅, 周少奇, 刘琳, 郑可(962)
ABR反应器处理碱减量印染废水的启动研究	杨波, 钟启俊, 李方, 田晴(968)
O ₃ -BAF深度处理制革废水中沿程污染物降解规律	余彬, 刘锐, 程家迪, 范举红, 李昌湖, 冉坤, 曹国华, 陈吕军(974)
规模化猪场养殖废水UASB-SFSBR-MAP处理工艺中试研究	王亮, 陈重军, 陈英旭, 吴伟祥(979)
连续流态下以城市污水培养好氧颗粒污泥及颗粒特性研究	牛姝, 段百川, 张祚薰, 刘士峰, 张家铭, 王聪, 周丹丹(986)
乙酸/丙酸作为EBPR碳源的动力学模型研究(Ⅰ)——模型的建立	张超, 陈银广(993)
乙酸/丙酸作为EBPR碳源的动力学模型研究(Ⅱ)——动力学模拟	张超, 陈银广(998)
乙酸/丙酸作为EBPR碳源的动力学模型研究(Ⅲ)——模型的应用	张超, 陈银广(1004)
三峡水库两条支流水-气界面CO ₂ 、CH ₄ 通量比较初探	李哲, 白镭, 郭劲松, 方芳, 蒋滔(1008)
不同土地利用方式下土壤呼吸空间变异的影响因素	陈书涛, 刘巧辉, 胡正华, 刘艳, 任景全, 谢薇(1017)
黄土区农田和草地生态系统土壤呼吸差异及其影响因素	周小刚, 张彦军, 南雅芳, 刘庆芳, 郭胜利(1026)
层次化健康风险评估方法在苯污染场地的应用及效益评估	姜林, 钟茂生, 梁竞, 姚珏君, 夏天翔, 樊艳玲, 李敬东, 唐振强(1034)
海州湾潮滩重金属污染的历史记录	张瑞, 张帆, 刘付程, 尹福军, 丁迎军, 高金荣, 陈晶, 邵威(1044)
草海典型高原湿地表层沉积物重金属的积累、分布与污染评价	张清海, 林昌虎, 谭红, 林绍霞, 杨鸿波(1055)
大金山岛土壤重金属污染评价及相关性分析	程芳, 程金平, 桑恒春, 于金莲, 席磊, 皮帅帅(1062)
典型有色金属矿山城市小河流沉积物重金属形态分布及风险评估	李如忠, 姜艳敏, 潘成荣, 陈婧, 徐晶晶(1067)
典型有色金属矿业城市零星菜地蔬菜重金属污染及健康风险评估	李如忠, 潘成荣, 徐晶晶, 陈婧, 姜艳敏(1076)
城市表层土壤磁化率与重金属含量分布的相关性研究	陈秀端, 卢新卫, 杨光(1086)
典型热带林地土壤团聚体颗粒中重金属的分布特征及其环境意义	龚仓, 徐殿斗, 成杭新, 任雅阁, 刘志明, 刘应汉, 刘飞, 聂海峰, 郑祥, 马玲玲(1094)
生态沟渠底泥属性与磷吸附特性研究	张树楠, 贾兆月, 肖润林, 杨凤飞, 余红兵, 刘锋, 吴金水(1101)
三峡库区澎溪河底泥及消落区土壤磷的形态及吸附特性研究	孙文彬, 杜斌, 赵秀兰, 何丙辉(1107)
Triton X-100在黄土上的吸附行为及影响因素	钟金魁, 赵保卫, 朱琨, 钱小龙, 张杰西(1114)
新疆哈密地区有机氯农药大气、土壤残留特征、气-土交换及潜在生态风险	马子龙, 毛蒲萱, 丁中原, 高宏, 黄韬, 田慧, 郭强(1120)
青海省西宁市与天峻县大气中得克隆与十溴联苯醚的水平与来源	何畅, 金军, 马召辉, 王英, 扎西卓玛, 马丽花(1129)
太湖沉积物中多溴联苯醚和类二噁英多氯联苯的水平垂直分布	马召辉, 金军, 亢学奎, 王英, 姜霞, 何松洁, 李明圆(1136)
典型电器工业区河涌沉积物中有机污染物特征分析	刘近, 邓代永, 许玫英, 孙国萍(1142)
柴油轿车颗粒多环芳烃的排放特性	谭丕强, 周舟, 胡志远, 楼狄明(1150)
机械炼焦过程生成飞灰中多环芳烃分布特征研究	牟玲, 彭林, 刘效峰, 白慧玲, 张建强(1156)
污泥干化床与芦苇床稳定化污泥中多环芳烃的含量比较	崔玉波, 孙红杰, 冉春秋, 李金凤, 谢瑶(1161)
固体添加剂对污泥焚烧过程中重金属迁移行为的影响	刘敬勇, 孙水裕, 陈涛(1166)
铸造废砂的环境毒性研究	张海凤, 王玉珏, 王劲磷, 黄天佑, 熊鹰(1174)
Cr ⁶⁺ 生物可利用度检测的微生物全细胞传感器CB10的构建及其响应特征	侯启会, 马安周, 庄绪亮, 庄国强(1181)
反硝化脱硫工艺中微生物群落结构及动态分析	于皓, 王爱杰, 陈川(1190)
农业废物好氧堆肥中环境因子对nirK、nirS和nosZ数量的影响	胡春晓, 陈耀宁, 张嘉超, 唐聪, 曾光明(1196)
蚯蚓体内过氧化物还原蛋白PRDX基因对土壤PAHs污染胁迫的转录响应	林康丽, 郑森林, 宋玉芳, 邱晓燕, 薛文玲(1204)
有序介孔碳载金/L-赖氨酸/纳米金修饰电极的制备及其对邻苯二酚、对苯二酚的检测响应研究	周耀渝, 汤琳, 李贞, 刘媛媛, 杨贵德, 伍梦诗, 雷晓霞, 曾光明(1211)
新建核电站风险信息沟通实证研究	贺桂珍, 吕永龙(1218)
《环境科学》征订启事(942) 《环境科学》征稿简则(992) 信息(932, 949, 1061, 1210) 专辑征稿通知(1173)	

Cr⁶⁺ 生物可利用度检测的微生物全细胞传感器 CB10 的构建及其响应特征

侯启会, 马安周*, 庄绪亮, 庄国强*

(中国科学院生态环境研究中心中科院环境生物技术重点实验室, 北京 100085)

摘要: 为实现重金属污染环境中 Cr⁶⁺ 的生物可利用度评价, 进而为 Cr⁶⁺ 的污染治理提供可靠依据, 本研究采用分子生物技术, 以重金属广谱抗性菌株 *Cupriavidus metallidurans* CH34 的 pMOL28 质粒上铬抗性调控系统的启动子和调控蛋白基因为传感器调控元件, 以北美萤火虫 *Photinus pyralis* 的萤火虫荧光素酶基因 *luc* 为报告基因构建了一种可对 Cr⁶⁺ 生物可利用度进行检测的微生物全细胞传感器 CB10, 并探究了其在不同检测条下的响应特征。结果表明, 微生物全细胞传感器 CB10 在 30 min 内即可响应一定浓度的 Cr⁶⁺; 其对 Cr⁶⁺ 的检测最低限 LOD 为 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 当 Cr⁶⁺ 的浓度为 20 ~ 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, CB10 的响应能力与 Cr⁶⁺ 浓度线性相关, 进而传感器 CB10 可对该范围内的 Cr⁶⁺ 生物可利用度进行定量分析 ($R^2 = 0.98055$); 当重金属诱导浓度为 10 ~ 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, CB10 对 Cr⁶⁺ 具有较强的响应特异性; 本研究也发现, 较高浓度的 Pb²⁺、Mn²⁺ 和 Sb²⁺ 也可以产生对 CB10 的诱导能力; 诱导温度为 30℃, pH 为 7 时, CB10 的响应效率最高; 诱导温度为 15 ~ 30℃, pH 为 4 ~ 7 时, CB10 响应能力表现稳定。CB10 具备较强的响应速率、灵敏度、特异性和稳定性, 具备对水体重金属进行快速检测和土壤重金属的生物可利用度进行评价的潜力。

关键词: Cr⁶⁺; 生物可利用度; 微生物全细胞传感器; 特异性; 温度; pH

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2013)03-1181-09

Construction and Properties of a Microbial Whole-cell Sensor CB10 for the Bioavailability Detection of Cr⁶⁺

HOU Qi-hui, MA An-zhou, ZHUANG Xu-liang, ZHUANG Guo-qiang

(Key Laboratory of Department of Environmental Biotechnology, CAS, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

Abstract: A microbial whole-cell biosensor CB10 for the bioavailability assessing of Cr⁶⁺ was constructed by molecular biotechnology. The regulatory gene and promoter of CB10 was from the chromium resistance system of plasmid pMOL28 from *Cupriavidus metallidurans* CH34, and the reporter gene of CB10 was *luc* which was derived from *Photinus pyralis*. Finally, its response characteristic was discussed under different incubation conditions e. g. pH and temperature. The results showed that a microbial whole-cell biosensor CB10 had been successfully constructed which could respond to Cr⁶⁺ within 30 min, with a LOD for Cr⁶⁺ of 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. When the incubation concentration of Cr⁶⁺ was between 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, the *luc* activity of the CB10 biosensor was in linear correlation with the concentration of Cr⁶⁺. When the concentration of heavy metal was in the range of 10-50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, the response of CB10 was relatively more specific. Moreover, high concentrations of Pb²⁺, Mn²⁺ and Sb²⁺ could also induce CB10. By analyzing the response characteristic of CB10 biosensor, we could draw the conclusion that 15-30℃ and pH 4-7 were appropriate for CB10, and 30℃ and pH 7 were the optimal conditions for the incubation of the CB10 biosensor. The microbial whole-cell biosensor CB10 for the detection of Cr⁶⁺ was fast-responding, specific, sensitive and stable under various conditions. In prospective, it could be used in the fast detection of Cr⁶⁺ in water and assessment of the bioavailability of Cr⁶⁺ in soil.

Key words: Cr⁶⁺; bioavailability; microbial whole-cell biosensor; specificity; temperature; pH

铬(Cr)在冶金、电镀、制革和化学品制造等行业被广泛应用, 铬污染主要是由于在铬矿、铬制品的生产过程中对铬废水和铬渣的不合理处理造成的^[1]。在土壤中, 铬以 Cr³⁺ 和 Cr⁶⁺ 这 2 种形态存在, 其中, Cr⁶⁺ 以阴离子的形态存在, 不易被土壤吸附, 有较强的移动性, 易对植物产生毒性, 进而通过农产品进入人体直接危害人体健康, 而 Cr³⁺ 极易被土壤胶体吸附及沉淀, 移动性差, 毒性较低^[2]。由于 Cr⁶⁺ 毒性较强, 直接决定着 Cr 的毒性大小, 因此, 对污染

环境中 Cr⁶⁺ 进行准确、合理地检测及评价是进行 Cr 污染风险评价及修复的前提。

收稿日期: 2012-06-28; 修订日期: 2012-08-16

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-YW-JS401; KSCX2-YW-G-072); 国家高技术研究发展计划(863)项目(2007AA06A407); 国家科技支撑计划项目(2012BAJ24B01)

作者简介: 侯启会(1983~), 男, 博士研究生, 主要研究方向为环境微生物, E-mail: houqihui190@163.com

* 通讯联系人, E-mail: azma@rcees.ac.cn; gqzhuang@rcees.ac.cn

目前,污染环境中 Cr^{6+} 的主要监测方法是传统的物理化学方法,如电感耦合等离子体发射光谱/质谱(ICP-AES/ICP-MS)和原子吸收光谱(ASS)等,这些方法具有检测灵敏度高,准确性强的特点,但监测相关的仪器设备昂贵,样品前处理过程复杂,最重要的一点是,传统的物理化学方法是对环境总 Cr^{6+} 进行测定,不能反映 Cr^{6+} 的生物可利用度^[3]. 生物可利用度(bioavailability)是指在给定时间内,在生物有机体周围能自由通过细胞膜的化合物量^[4]. 生物可利用度直接反映生物体对污染物的吸收以及污染物对生物体的毒性情况,是进行污染物风险评价的重要指标. 而与动植物及人体细胞相比,微生物细胞具有易操作、繁殖及生存能力强、易储存和稳定性高等特点^[5],以微生物细胞作为传感器生物感应元件和信号转换元件可简化传感器的制作过程,提高传感器的应用能力,因此,微生物全细胞传感器是评价污染物生物可利用度的有效工具. 另外,微生物全细胞传感器还具有经济、简单、快捷的特点,微生物全细胞传感器还能对重金属生物可利用度进行原位和在线监测.

特异微生物全细胞传感器的微生物细胞含有一个由特异调控蛋白基因和报告基因组成的重组质粒. 当重金属离子进入到胞内后,重组质粒或宿主染色体 DNA 编码的转录调控蛋白通过正调控或负调控被重金属离子特异激活,从而与启动子绑定或从启动子上脱落激活(“turn on”)启动子,进而调控下游报告基因表达,产生可检测的信号. 这种信号的变化强度和重金属诱导物的浓度是相关的,转录调控蛋白对重金属离子的识别能力和绑定能力决定着微生物全细胞传感器的检测特异性和灵敏度^[6].

在国内重金属相关微生物全细胞传感器的研究中,大多开展在重金属的毒性和半定量分析等领域,对重金属进行定量分析的微生物全细胞传感器的研究尚鲜见报道. 丁钰力^[7]和王学江^[8]等分别通过考察枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 和大肠杆菌 *Escherichia coli* 在不同重金属浓度下的电流抑制能力和生长情况验证了传感器的毒性分析能力,而王妍等^[9]利用镉外排蛋白 CadA 和绿色荧光蛋白 GFP 构建了针对镉进行定量分析的微生物全细胞传感器,其检测达到了 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,表现出一定的应用潜力. 为开发一种针对实际环境中 Cr^{6+} 的生物可利用度进行评价的微生物全细胞传感器,本研究以重金属广谱抗性菌株 *Cupriavidus metallidurans* CH34 pMOL28 质粒上 Cr 外排蛋白 ChrA 的调控蛋白 ChrB

为传感器的调控蛋白,以具有高灵敏度和快速响应能力的萤火虫荧光素酶基因 *luc* 为报告基因构建了一种 Cr^{6+} 特异检测的微生物全细胞传感器 CB10. 利用不同浓度的 Cr^{6+} 对构建完成的传感器 CB10 进行了诱导,制作了传感器 CB10 的响应强度随 Cr^{6+} 浓度变化的标准曲线,并确定了它的最低检测限;同时,通过多种不同重金属的诱导,更加全面地反映了以 ChrB 为调控元件的 Cr 传感器的响应检测特异性.

Corbisier^[10]和 Ivask^[11]等构建了针对 Cr 生物可利用度进行检测的微生物传感器,并对其响应能力进行了一定的研究,但未对传感器的实际应用潜力包括全面的响应特异性及重要环境条件——温度和 pH 下传感器的稳定性进行分析. 温度和 pH 既可影响微生物自身的生理代谢活性,也可影响传感器的信号检测的稳定性,是影响传感器实际应用能力的重要因素. 本研究对 CB10 响应速率和影响其检测能力的诱导条件(温度、pH)进行了分析,以期对 Cr^{6+} 的快速检测 and 实际环境的生物可利用度评价提供有力的应用工具,进而为 Cr^{6+} 污染环境的风险评价和修复提供生物学的参考依据.

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

Vent DNA 聚合酶(NEB)、E. Z. N. A. Cycle-Pure Kit (OMEGA)、限制性内切酶 *SacI* 和 *XhoI* (NEB)、E. Z. N. A. Gel Extraction Kit(OMEGA)、E. Z. N. A. Plasmid Mini Kit(OMEGA)、Luciferase Cell Culture Lysis Reagent(CCLR, Promega)、电泳仪(北京凯元信瑞仪器有限公司)、UV transillumination 成像系统(Bio-rad)、Thermo Shaker(杭州奥盛仪器有限公司)、Varioskan Flash 全波长扫描多功能酶标仪(Thermo Fisher)、GloMax[®]-Multi⁺ Detection System (Promega),实验中所用药品均为国药集团化学试剂有限公司产品,药品纯度为分析纯,使用之前未经过任何处理.

1.2 菌株和质粒

实验所用菌株、质粒材料和所构建的传感器菌株见表 1.

1.3 引物

传感器细胞构建所用引物特征见表 2,引物由奥克生物公司合成.

1.4 基础传感器细胞 BB09(pUC18-T7p-*luc*-T7t)的构建

表 1 菌株及质粒

Table 1 Strains and plasmids

菌种/质粒	相关基因型或抗生素抗性特征描述	菌种来源
DH5α	F'Φ80dlacZ Δ(lacZYA-argF)U169 recA1endA1 hsdR17(rKmK +) supE44 λ-thi-1 gyrA relA1	TIANGEN
BL21 (DE3)	hsd5, gal ⁻ clts857, ind1, sam7	TIANGEN
pGEM-luc	Amp ^r	Promega
<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	Amp ^r	实验室保存
pUC18	Cloning vector (Amp ^r , ColE1-ori)	实验室保存
pET30a	Kan ^r	实验室保存
pRSET A. B. C	Amp ^r	实验室保存
BB09 (pUC18-T7p-luc-T7t)	Amp ^r	本实验构建
CB10 (pUC18- <i>chrB</i> - <i>luc</i>)	Amp ^r	本实验构建

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequences

引物名称	Primer sequence (5'→3')	退火温度/℃	限制性酶切位点
<i>luc</i> -B	TAGGCGGATCCTTACAATTGGACTTTCCGCCCTTC	58	<i>Bam</i> H I
<i>luc</i> -X	CTCGAGTAAGGAGGTCAGATGGAAGACGCCAAAAACATAAAG	58	<i>Xho</i> I
T7-p-X	CTGACCTCCTTACTCGAGTTCTAGAGGAAACCGTTGTGGTC	60	<i>Xho</i> I
T7-p-S	CAGTGAGCTCGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATA	60	<i>Sac</i> I
pUC18-H	GATCAAGCTTCCACACAACATACGAGCCGGAAGC	65	<i>Hind</i> III
pUC18-S	CGGTGAGCTCTAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGC	65	<i>Sac</i> I
T7t-B2	CGCGGATCCTCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAG	56	<i>Bam</i> HI
T7t-H2	CCCAAGCTTCCGCTACAGGCGCGCTCCCATTCG	56	<i>Hind</i> III
<i>Pchr</i> - <i>Sac</i> I	GATCGAGCTCTTACCTTCTCTGCACTTAC	56	<i>Sac</i> I
<i>chrB</i> - <i>Xho</i> I	CCGCTCGAGTTAACTGCAAATGTTCTTACTGTCCCC	56	<i>Xho</i> I
<i>Pchr</i> - <i>Xho</i> I -F	TGAGCTCGAGCGCAGGATTGGCATCGGGG	52	<i>Xho</i> I
<i>Pchr</i> - <i>Xho</i> I -A	TGAGCTCGAG GCGCGCACTGGAGCGGGATG	52	<i>Xho</i> I

(1) T7 promoter (T7p) 和 *luc* 的连接 以 T7-p-X 和 T7-p-S 为引物,以表达载体 pRSET A. B. C 为模板,PCR 扩增 T7p 序列,PCR 反应程序为:94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s,58℃ 退火 60 s,72℃ 延伸 60 s,循环 30 次; 72℃ 充分延伸 10 min; 以 *luc*-B (含有 TAAGGAGG 的 SD 序列及 TCAG 间隔序列) 和 *luc*-X 为引物,以表达载体 pGEM-*luc* 载体为模板,PCR 扩增 *luc* 基因(反应程序参考 T7 promoter 的扩增,退火后 72℃ 延伸 1 min 40 s); 用 *E. Z. N. A.* Cycle-Pure Kit 对 *luc* 与 T7 promoter 的 PCR 产物进行纯化后,将二者等比例混合,以 T7-p-S 和 *luc*-B 为引物,以混合液为模板,PCR 扩增 T7p-*luc* 序列(反应程序参考 T7 promoter 的扩增,退火后 72℃ 延伸 2 min)。

(2) pUC18 和 T7p-*luc* 的连接 用 *E. Z. N. A.* Cycle-Pure Kit 纯化 T7p-*luc* 的 PCR 产物,然后用 *Bam*HI 和 *Sac*I 双酶切 T7p-*luc* 和 pUC18,用 *E. Z. N. A.* Gel Extraction Kit 切胶回收酶切目的片段,利用 T4 连接酶将 T7p-*luc* 连接于载体 pUC18 之上,转化 *E. coli* DH5α。

(3) pUC18-T7p-*luc* 中 *lac* promoter 的去除 以

pUC18-H 和 pUC18-S 为引物,以 pUC18 为模板,扩增不含 *lac* promoter 的 pUC18 部分序列,用 *Sac*I 和 *Hind*III 同时对 pUC18-T7p-*luc* 和不含 *lac* promoter 的 pUC18 部分序列进行双酶切,回收目的片段后用 T4 连接酶将 T7p-*luc* 连接于去除 *lac* promoter 的 pUC18 之上,转化 *E. coli* DH5α。

(4) pUC18-T7p-*luc* (去除 *lac* promoter) 与 T7 terminator (T7t) 的连接 以 T7t-B2、T7t-H2 为引物,以 pET30a 为模板,PCR 扩增 T7t 序列(反应程序参考本节(1)中,退火后 72℃ 延伸 1 min); 用 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切 T7t 和 pUC18-T7p-*luc*,连接目前片段,利用 T4 连接酶将 T7t 连接于 pUC18-T7p-*luc* 载体 *luc* 基因的下游,形成重组质粒 pUC18-T7p-*luc*-T7t,转化 *E. coli* BL21,筛选阳性克隆得到基础传感器细胞 BB09。

1.5 基础传感器细胞 BB09 的诱导表达

挑取活化后的 DH5α 传感器细胞 BB09 (pUC18-T7p-*luc*-T7t) 单菌落于新鲜 LB 液体培养基中(Amp; 100 mg·L⁻¹),在 37℃,200 r·min⁻¹ 条件下进行过夜培养; 取 200 μL 过夜培养的菌液接种到含有 19.8 mL 新鲜 LB 液体培养基的 50 mL 三角瓶

中 ($\text{Amp}: 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$); 37°C , $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养至 $D_{600} = 0.6$; 取 $50 \mu\text{L}$ 培养液于 96 孔板中 (corning 公司), 同时加入等体积 ($50 \mu\text{L}$) 的 IPTG ($2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 于 96 孔板中, 30°C , $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下诱导 2 h; 诱导完成后, 用 CCLR 细胞裂解液 (Promega) 裂解传感器细胞, 以萤火虫荧光素为底物 (Promega), 采用 Varioskan Flash 全波长扫描多功能酶标仪, 检测其发射光谱, 设置 3 组平行, 荧光表达值用相对荧光单位表示 (relative luminescence unite).

1.6 Cr^{6+} 诱导表达的传感器细胞 CB10 (pUC18-*chrB-luc*) 的构建

采用 E. Z. N. A. Plasmid Mini Kit 提取 *C. metallidurans* CH34 菌株的 pMOL28 质粒, 用引物 P_{chrA} -*Sac*I 和 *chrB*-*Xho*I PCR 扩增 pMOL28 质粒的 ATPase 型外排蛋白 *ChrA* 的调控基因 *chrB* 及启动子 P_{chr} . PCR 反应程序为: 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 30 s, 56°C 退火 60 s, 72°C 延伸 90 s, 循环 30 次; 72°C 充分延伸 10 min. *Sac*I 和 *Xho*I 分别酶切 P_{chr} -*chrB* 序列和基础传感器细胞质粒的 T7 promoter 序列. T4 连接酶连接 P_{chr} -*chrB* 到经酶切处理后的基础传感器细胞质粒, 形成重组质粒 pUC18-*chrB-luc*, 将重组质粒转化 *E. coli* DH5 α , 筛选阳性克隆得到受 Cr^{6+} 诱导表达的传感器细胞.

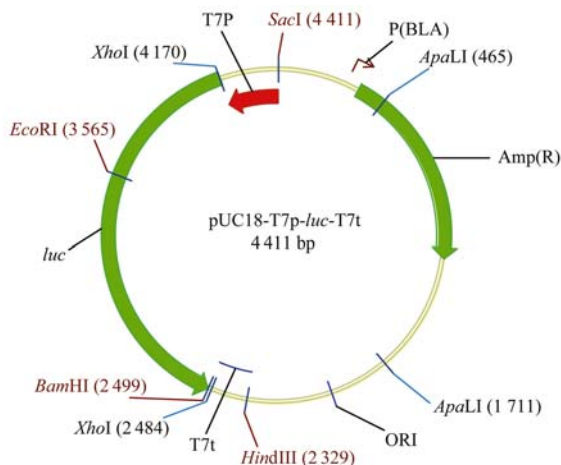


图1 基础型传感器 BB09 的重组质粒

Fig. 1 Recombinant plasmid of the basic biosensor BB09

1.7 传感器细胞 CB10 的 *luc* 诱导表达

用不同浓度的 K_2CrO_4 溶液诱导传感器细胞 CB10, 以分析其不同 K_2CrO_4 浓度下的响应趋势和一定 K_2CrO_4 浓度范围内的响应标准曲线, 诱导方法参考 1.5 节, 用 GloMax[®]-Multi⁺ Detection System 进行荧光检测, 每实验设置 3 组平行, 荧光表达结果

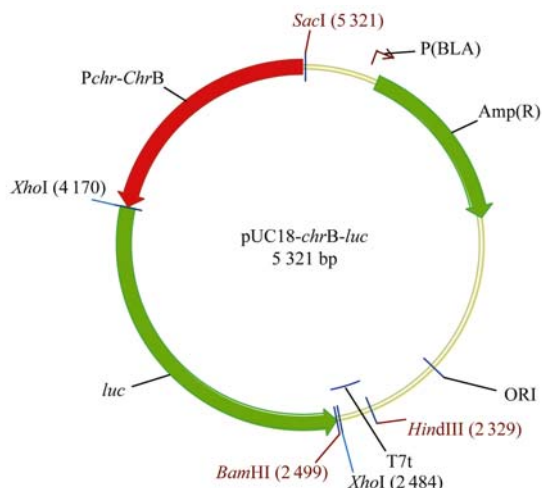


图2 铬诱导表达传感器 CB10 的重组质粒

Fig. 2 Recombinant plasmid of the inducible biosensor CB10

用诱导效率 IF (induction coefficient) 表示, 用 Origin 8.0 软件制作标准曲线:

$$\text{IF} = L_s / L_b$$

式中, L_s 为传感器细胞在不同 K_2CrO_4 浓度诱导下的荧光表达值, L_b 为传感器细胞在水溶液中的背景荧光值, 最低检测限 LOD 的确定 (the limit of determination) 见式(1)^[1].

$$\text{LOD} = \frac{2 \bar{X}_b + 3 \text{SD}}{\bar{X}_b} \quad (1)$$

式中, $\bar{X}_b$ 为 6 ~ 8 次实验的背景荧光平均值, SD 为标准偏差. 本研究设定 6 个 0 诱导的平行实验计算传感器细胞 CB10 的最低检出限 LOD.

1.8 传感器细胞 CB10 的特异性检测

用 10 、 50 、 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cr^{6+} 、 As^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Sb^{2+} 对传感器细胞 CB10 进行诱导表达, 以检测传感器细胞在不同重金属离子诱导下的特异性响应情况, 诱导、检测及数据处理方法参考 1.7 节.

1.9 温度和 PH 对传感器细胞 CB10 的影响

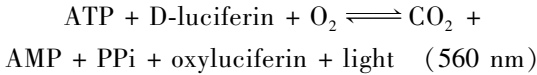
分别在 4 、 15 、 25 、 30 、 37 、 42°C 条件下对传感器细胞 CB10 进行诱导 ($\text{Cr}^{6+} = 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 以检验传感器细胞的最佳检测温度及其对温度的适应能力; 用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCL 和 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 调节诱导混合液的 pH 分别至 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、 10 , 以检验传感器细胞的最佳响应 pH 及其在不同 pH 下的稳定性, 诱导、检测及数据处理方法参考 1.7 节.

2 结果与分析

2.1 基础传感器细胞 BB09 (pUC18-T7p-*luc*-T7t)

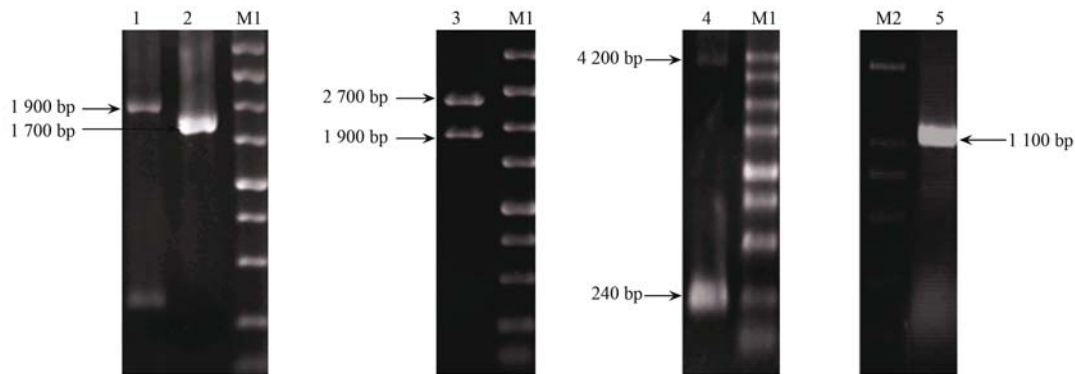
的构建与诱导

从商业质粒 pGEM-*luc* 上扩增到了1 653 bp 萤火虫荧光素酶基因 *luc* 的完整开发阅读框架(ORF) 序列,并将其转化 pUC18 质粒载体作为传感器的基础质粒载体. 萤火虫荧光素酶 Luc 是一种源于真核生物 *Photinus pyralis* 的单体蛋白,其荧光产生的化学反应式如下:



与常用的报告基因 *gfp*、*lux* 和 *lacZ* 相比,*luc* 不需经翻译后加工可直接参与以上的催化反应,其荧

光产生强度与酶活性直接相关. 因此,*luc* 作为传感器的报告基因具有高灵敏度和易检测的特点. 为验证 *luc* 可否在 pUC18 质粒上顺利表达,通过融合 PCR、酶切和连接反应,在 *luc* 上、下游分别插入了 241 bp 受 IPTG 诱导表达的启动子 T7p 和 155 bp 的 T7t 终止子序列;为消除 pUC18 上 *lac* promoter 对 *luc* 表达的影响,利用 PCR 的方法成功去除了 pUC18 上的 *lac* promoter,在去除 *lac* promoter 的 pUC18 中导入完整的 T7p-*luc*-T7t 序列后,转化 *E. coli* DH5α 得到基础传感器细胞 BB09 (构建相关的 DNA 片段的电泳结果见图 3).



1. T7p-*luc*; 2 *luc*; 3. *Sac* I 和 *Hind* III 酶切 pUC18-T7p-*luc* 结果; 4. *Sac* I 和 *Xho* I 酶切 BB09 的 T7p; 5. *Pchr*-*chrB*; M1 DL5 000 marker; M2 DL2 000 marker

图 3 传感器 CB10 构建相关 DNA 片段的电泳结果

Fig. 3 Electrophoresis results of main DNA fragments related to the construction of the biosensor CB10

传感器细胞 BB09 经1 mmol·L⁻¹ 的 IPTG 诱导后的荧光检测结果表明, BB09 在 560 nm 处有最大发射光,与萤火虫荧光素酶 *luc* 的最大发送波长一致(图 4). 因此, pUC18 上的萤火虫荧光素酶 *luc* 可被 T7p 启动表达,从而,本研究可以 pUC18 作为质粒载体进行受 Cr⁶⁺ 诱导响应的传感器构建.

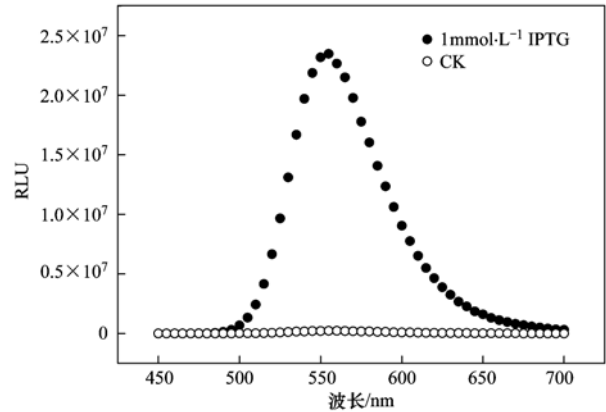


图 4 传感器细胞 BB09 对 IPTG 的响应结果

Fig. 4 Response of the basic biosensor BB09 to IPTG

2.2 传感器细胞 BC10 (pUC18-*chrB*-*luc*) 的构建与诱导

从 *C. metallidurans* CH34 的 pMOL28 质粒上成功扩增到了1 151 bp 的 Cr 抗性系统的启动子和调控基因序列 *P_{chr}*-*chrB*,将 *P_{chr}*-*chrB* 替换基础传感器细胞 BB09 的 T7p 后,转化 *E. coli* DH5α 得到受 Cr⁶⁺ 诱导表达的传感器细胞 BC10,该质粒的全长为 5 321 bp(图 3).

在不同诱导时间下 (Cr⁶⁺ = 50 μmol·L⁻¹), BC10 的 *luc* 表达结果如图 5 所示. 结果表明,经过 30 min 诱导后 *luc* 即可表达,传感器细胞 BC10 表现出了极高的响应速率. 随着诱导时间的增加,相对荧光强度逐渐增强. 其中,在 0 ~ 5 h 荧光强度的上升速度较快,这是由于在此阶段 BC10 处于对数生长期,细胞数目和活性较高,促进了荧光信号的高强度表达. 6 h 以后,BC10 的荧光表达趋于稳定,这与 BC10 在此阶段处于稳定生长期,细胞数目和活性趋于稳定有关. 从图 5 中可知,BC10 经 2 h 诱导产生的荧光信号足以区分背景荧光信号. 因此,在后续

实验中选取 2 h 为传感器细胞的诱导时间。

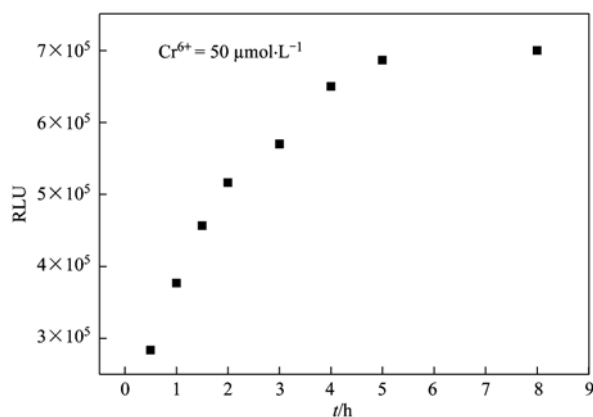


图 5 传感器细胞 CB10 在不同时间下的响应结果

Fig. 5 Response of the biosensor CB10 at different times

用不同浓度的 Cr^{6+} 诱导传感器细胞 CB10 以检测其对 Cr^{6+} 的响应变化趋势(图 6)。根据计算公式(1)可知,该传感器的最低检测限 LOD 为 $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。随着 Cr^{6+} 浓度的增加, Cr^{6+} 与调控蛋白 ChrB 的结合作用增强,更多数目的 ChrB 发生构象的变化,促进更多拷贝的 *luc* 基因得以表达,表现出 Cr^{6+} 对 CB10 的诱导效率的逐渐增加,当 Cr^{6+} 浓度 $>200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对 CB10 的诱导效率开始下降,这可能是 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cr^{6+} 的浓度过高,产生了对 CB10 的毒性,从而影响了 CB10 的正常生理代谢活动而造成的。

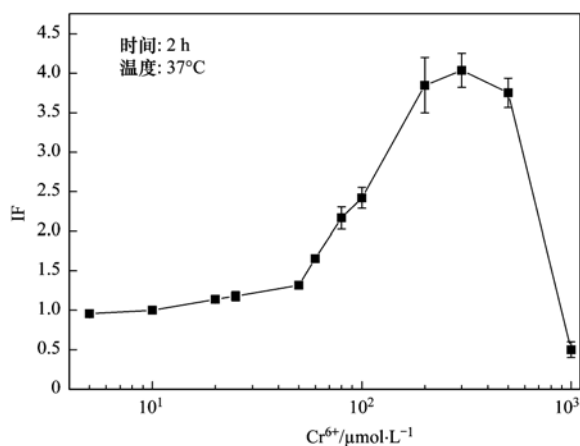


图 6 传感器细胞 CB10 在不同 Cr^{6+} 浓度下的响应结果

Fig. 6 Response of the biosensor CB10 at different concentrations of Cr^{6+}

根据 CB10 对 Cr^{6+} 的响应变化趋势,在 $20 \sim 200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cr^{6+} 诱导浓度范围内,可对 CB10 的响应效率进行线性回归,标准曲线特征见图 7 ($R^2 = 0.98055$)。根据结果可知,当待检样品 Cr^{6+} 浓度为 $20 \sim 200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,CB10 的响应能力与 Cr^{6+} 浓度

线性相关,在同样的诱导及检测条件下,可利用该标准曲线对待检样品的 Cr^{6+} 浓度进行分析计算。

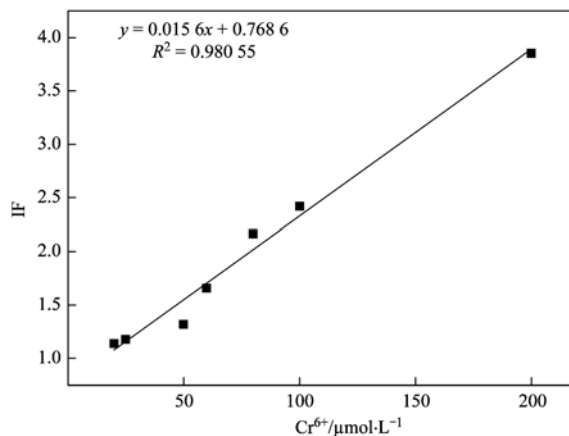


图 7 传感器细胞 CB10 在 Cr^{6+} 浓度下 *luc* 的表达标准曲线

Fig. 7 Standard curve of *luc* expression in the biosensor CB10 with different concentrations of Cr^{6+}

2.3 传感器细胞 BC10 的特异性检测

由于在特定条件下,重金属调控蛋白对重金属离子的结合对并非严格特异的,本研究通过利用 Cr^{6+} 、 As^{3+} 等 11 种重金属离子诱导传感器 CB10,全面检测了调控蛋白 ChrB 对 Cr^{6+} 的特异识别能力(图 8)。结果表明,当诱导浓度为 10 、 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,除 Cr^{6+} 之外所有重金属离子对传感器细胞 CB10 均没有明显的诱导能力。当 Cr^{6+} 浓度为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, Cr^{6+} 对传感器细胞 CB10 的诱导效率最高,为 1.8。另外,本研究表明,较高浓度($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的 Pb^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Sb^{2+} 也对 CB10 有一定的诱导能力,最高 IF 为 1.42,这表明 ChrB 的金属结合区域也可以受 Pb^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Sb^{2+} 的变构调节,这样的结果尚未见报道,具体的识别及调控机制需要进行更深入的研究以待阐明。综上,笔者认为,当 Cr^{6+} 的诱导浓度介于 $10 \sim 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,传感器细胞 CB10 对 Cr^{6+} 的响应是相对特异的。

2.4 诱导条件(温度、pH)对传感器细胞 BC10 的影响

温度和 pH 可以影响传感器细胞的诱导表达活性和荧光信号的检测结果,还可以影响重金属在实际环境中的移动性和生物可利用性。本研究对传感器细胞 BC10 的诱导温度和 pH 进行了探讨,为探索传感器细胞的最佳条件,检验传感器的环境稳定性,消除环境样品和环境条件对传感器细胞检测灵敏度的影响奠定基础。实验结果表明, 30°C 为传感器细胞 CB10 的最佳诱导温度,这可能是由于在 30°C 条

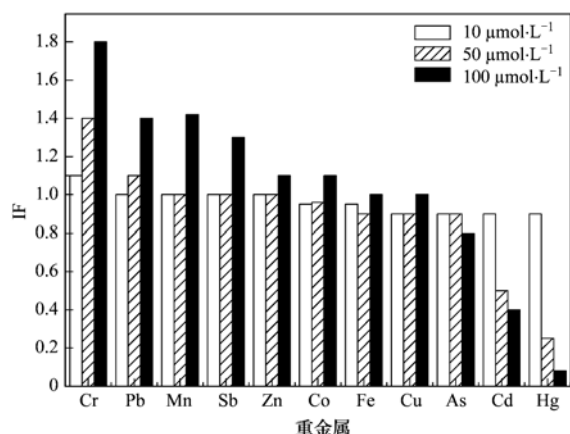


图8 传感器细胞 CB10 的特异性检测

Fig. 8 Specificity identification of *luc* expression in the biosensor CB10

件下, *Luc* 的稳定性较高, 且不影响传感器细胞 CB10 的活性. 在 37℃ 和 42℃ 条件下, 传感器细胞 CB10 的 *Luc* 活性急剧下降, 而传感器细胞自身的生长情况良好 (结果未列出), 这可能是由于 *Luc* 热稳定性较低, 造成了传感器的检测性能的下降, 这与 Fu 等^[12] 的研究结果是一致的. 当诱导温度在 15 ~ 30℃ 时, 传感器细胞的荧光表达情况稳定, 且处于最高的水平. 因此, 偏低温的环境对传感器细胞 CB10 检测灵敏度的影响不大.

pH 对传感器细胞 CB10 的 *luc* 表达影响结果见图 9, 结果表明, 当 pH 为 4 ~ 7 时, CB10 的 *luc* 表达情况稳定, 且处于最高的水平; 当 pH = 7 时, 表达量最高, pH = 7 为传感器细胞 CB10 的最佳诱导环境. 当 pH 为 8 ~ 10 时, *luc* 表达量缓慢下降; 当 pH = 3 时, *luc* 表达量急剧下降, 可能的原因是极端酸性环

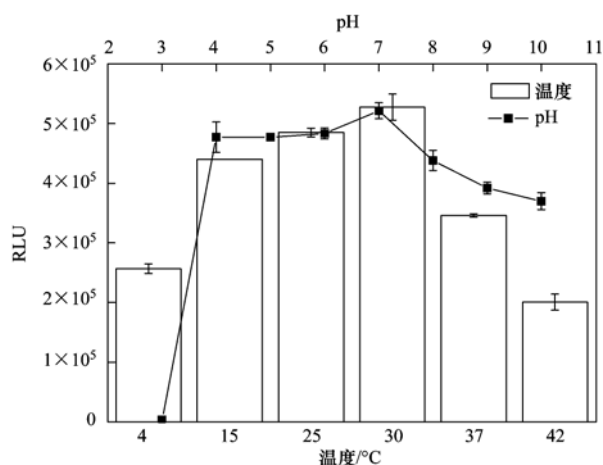


图9 诱导温度和 pH 对传感器细胞 CB10 的影响

Fig. 9 Effect of temperature and pH on *luc* expression in the biosensor CB10

境影响了 *luc* 参与的酶促反应, 也有可能是由于极端的酸性环境影响了 CB10 对 Cr^{6+} 吸收. 因此, 笔者认为传感器细胞 CB10 在弱酸性环境中的适应能力较强.

3 讨论

传感器细胞 CB10 的调控蛋白基因 *chrB* 源于 *C. metallidurans* CH34 的 pMOL28 质粒, *C. metallidurans* CH34 是 1 株最初于 1976 年在英国伯明翰的一金属加工工厂被分离出来的重金属广谱抗性菌株, 该菌株主要通过染色体组 CHR1、CHR2 和两个重要质粒 pMOL28、pMOL30 编码的功能蛋白介导的外排、络合和还原等作用产生对重金属的抗性^[13,14]. *C. metallidurans* CH34 对 Cr 的抗性是通过质粒 pMOL28 编码的膜结合蛋白 ChrA 对 Cr 的外排作用完成的, 同时, *chrA* 的表达受调控蛋白 ChrB 的负调节. 当细胞内无 Cr^{6+} 存在时, 调控蛋白 ChrB 绑定于启动子 *Pchr* 的 RNA 聚合酶结合位点之上, 阻止启动子启动; 当细胞内有 Cr^{6+} 进入后, Cr^{6+} 即作用于 ChrB 的金属结合位点, 促使其形成一个开放的结构并促进启动子的启动^[15,16].

微生物全细胞传感器的重要功能就是实现污染物的快速检测. 本研究利用 ChrB 对 *chrA* 的负调控机制构建的传感器 CB10 在 30℃ 条件下诱导 30 min 即可响应 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Cr^{6+} , 具有较强的应急检测能力, 另外, 较快的响应速率还可以对降低传感器在线监测时产生的延迟效应有积极作用. 20 ~ 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Cr^{6+} 浓度与荧光表达强度相关性较强 ($R^2 = 0.98055$). 本传感器细胞对 Cr^{6+} 的检测最低限为 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 相当于我国第 IV 类地下水水质标准 ($\leq 0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 即 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的水样品进行检测, 可应用于水体 Cr^{6+} 污染的快速检测和土壤 Cr^{6+} 的生物可利用评估.

Corbisier^[10] 和 Ivask^[11] 等研究表明, *chrA* 受铬、铬酸盐和重铬酸盐特异诱导表达, 不被其它氧化态的铬或重金属诱导, 具有较强的特异性, 并且 *chrA* 对 Cr^{6+} 的响应能力高于 Cr^{3+} , 这可能是与 Cr^{6+} 具有更强的毒性有关^[16~18]. 本研究发现, 在 $\leq 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的重金属浓度条件下, CB10 几乎只对 Cr^{6+} 有响应能力, 表现出了较强的特异性, 具有备抵抗其它金属干扰的能力, 此研究结果与 Corbisier^[10] 和 Ivask^[11] 等的研究结果一致. 然而, 本研究的研究结果也表明, 在高浓度 (100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 下, Pb^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Sb^{2+} 也可在一定程度上诱导 *Pchr* 和 ChrB

介导外源基因的表达,这可能是由调控蛋白 ChrB 的金属结合位点可以与相对高浓度的 Pb^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Sb^{2+} 作用从而产生构象变化,促使启动子形成开放的结构,从而启动外源基因的表达造成的,ChrB 与 Cr^{6+} 、 Mn^{2+} 和 Sb^{2+} 的作用机制需要从生物化学及分子生物学角度进一步阐明。

检测温度 and 不同基质的环境样品(如水、土壤水提取物、土壤悬浊液)或培养基造成的监测环境的 pH 变化是影响重金属生物可利用度的重要因素。首先,pH 的变化会影响微生物细胞对金属的摄取调控机制,从而抑制重金属在微生物细胞的积累^[19,20]。其次,pH 和温度的变化会影响传感器细胞自身的生理生化活性^[21]。另外,pH 和温度的变化会影响报告基因检测系统的活性和稳定性^[22,23]。一般情况下,微生物全细胞传感器进行重金属检测的最适 pH 为 5~7 之间的弱酸环境,本研究的传感器细胞 CB10 对 Cr^{6+} 监测的最佳 pH 为 7,在 pH 为 4~7 的范围内,其检测结果稳定,因此该传感器在实际环境检测过程中可以在一定程度上排除弱酸环境对检测结果的干扰。不同的传感器宿主细胞在不同温度下的 *luc* 的表达能力是不同的^[12,23],其机制尚不明确,但过高的温度会影响 *Luc* 的活性。在本研究中,随着诱导温度的升高,传感器细胞 CB10 的荧光表达能力增强,在 30℃ 的 *luc* 的表达活性最高,42℃ 条件下,CB10 的 *luc* 的表达能力趋于消失,这可能是由于在 42℃ 环境下,因 *Luc* 活性的丧失造成的。

Corbisier^[10] 和 Ivask^[11] 等利用 *C. metallidurans* CH34 的调控蛋白基因 *chrB* 构建了对 Cr 进行检测的传感器,对 Cr^{6+} 的检测灵敏度分别为 $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $30 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$,具有较强的响应能力。但该研究并没有对传感器的响应速率和影响传感器实际检测能力的两个重要因素 pH、温度进行研究。而利用传感器进行实际环境特别是原位检测实验时,应特别注意消除非最佳温度下传感器细胞的检测灵敏度的影响。本文对 CB10 的表达条件的研究表明,CB10 在 30 min 内即可响应 Cr^{6+} ;当诱导温度在 15~30℃ 时,传感器细胞的荧光表达情况稳定,且处于最高的水平;当 pH 为 4~7 时,CB10 的 *luc* 表达情况稳定,且处于最高的水平,表现出较强的稳定性。环境适应能力的检验为 CB10 实现快速、准确、有效的实际环境的检测应用提供了依据。

微生物全细胞传感器对重金属的检测方法反映出的是微生物细胞实际吸收的重金属离子,但是由于摄取和外排机制的不同,不同微生物细胞对重金

属的吸收能力是不同的。因此,为更好地反映实际环境的重金属生物可利用度,筛选重金属抗性能力优良的土著菌作为传感器细胞的宿主菌是十分必要的。另外,传感器质粒、传感器细胞的检测浓度等因素也会影响传感器菌株的表现能力^[12]。本研究构建的传感器细胞 CB10 对 Cr^{6+} 具有较强的响应速率、检测灵敏度、特异性和环境适应能力,可进行污染事件特别是水体污染的 Cr^{6+} 进行快速检测,也可与传统的物理化学检测方法相结合对土壤环境中的 Cr^{6+} 进行合理、准确地分析和评价。

4 结论

(1) 成功构建了 1 株可对 Cr^{6+} 生物可利用度进行检测的微生物全细胞传感器 CB10,其在 30 min 内即可响应一定浓度的 Cr^{6+} ,其对 Cr^{6+} 的检测最低限 LOD 为 $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,当 Cr^{6+} 的浓度为 $20 \sim 200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,CB10 的响应能力与 Cr^{6+} 浓度线性相关($R^2 = 0.98055$)。

(2) 当重金属诱导浓度为 $10 \sim 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,CB10 对 Cr^{6+} 具有较强的响应特异性,较高浓度($\geq 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的 Pb^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Sb^{2+} 可能也可以与调控蛋白 ChrB 的金属结合位点,产生构象变化,促使启动子形成开放的结构,从而可以产生了对 CB10 的诱导能力。

(3) 当诱导温度为 15~30℃,pH 为 4~7 时,CB10 响应能力表现稳定;当诱导温度为 30℃,pH 为 7 时,CB10 的响应效率最高。

参考文献:

- [1] Shanker A K, Cervantes C, Loza-Tavera H, et al. Chromium toxicity in plants[J]. Environment International, 2005, 31(5): 739-753.
- [2] Becquer T, Quantin C, Sicot M, et al. Chromium availability in ultramafic soils from New Caledonia[J]. Science of the Total Environment, 2003, 301(1-3): 251-261.
- [3] Magrisso S, Erel Y, Belkin S. Microbial reporters of metal bioavailability[J]. Microbial Biotechnology, 2008, 1(4): 320-330.
- [4] Semple K T, Doick K J, Jones K C, et al. Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated [J]. Environmental Science and Technology, 2004, 38(12): 228A-231A.
- [5] Byfield M P, Abuknesha R A. Biochemical aspects of biosensors [J]. Biosensors and Bioelectronics, 1994, 9(4-5): 373-400.
- [6] Borisov S M, Wolfbeis O S. Optical biosensors[J]. Chemical Reviews, 2008, 108(2): 423-461.
- [7] 丁钰力,王学江,贺莹,等. 基于枯草芽孢杆菌微生物传感器的毒性分析[J]. 中国环境科学, 2010, 30(3): 405-409.

- [8] 王学江, 王虹, 赵建夫, 等. 基于大肠杆菌的 CellSense 生物传感器毒性分析性能研究[J]. 环境科学, 2009, **30**(4): 1210-1214.
- [9] 王妍, 孙雅量. 环境镉离子生物检测工程菌株的构建及应用[J]. 中国公共卫生, 2006, **22**(7): 833-834.
- [10] Corbisier P, van der Lelie D, Borremans B, *et al.* Whole cell- and protein-based biosensors for the detection of bioavailable heavy metals in environmental samples[J]. *Analytica Chimica Acta*, 1999, **387**(3): 235-244.
- [11] Ivask A, Virta M, Kahru A. Construction and use of specific luminescent recombinant bacterial sensors for the assessment of bioavailable fraction of cadmium, zinc, mercury and chromium in the soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2002, **34**(10): 1439-1447.
- [12] Fu Y J, Chen W L, Huang Q Y. Construction of two *lux*-tagged Hg^{2+} -specific biosensors and their luminescence performance [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, **79**(3): 363-370.
- [13] Mergeay M, Houba C, Gerits J. Extrachromosomal inheritance controlling resistance to cadmium, cobalt, copper and zinc ions: evidence from curing in a *Pseudomonas* [J]. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie*, 1978, **86**(2): 440-442.
- [14] Janssen P J, Houdt R V, Moors H, *et al.* The complete genome sequence of *Cupriavidus metallidurans* strain CH34, a master survivalist in harsh and anthropogenic environments[J]. *PloS ONE*, 2010, **5**(5): e10433, doi: 10.1371/journal.pone.0010433.
- [15] Cervantes C, Silver S. Plasmid chromate resistance and chromate reduction[J]. *Plasmid*, 1992, **27**(1): 65-71.
- [16] Peitzsch N, Eberz G, Nies D H. *Alcaligenes eutrophus* as a bacterial chromate sensor [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64**(2): 453-458.
- [17] Corbisier P, van der Lelie D, Borremans B, *et al.* Whole cell- and protein-based biosensors for the detection of bioavailable heavy metals in environmental samples[J]. *Analytica Chimica Acta*, 1999, **387**(3): 235-244.
- [18] Losi M E, Amrhein C, Frankenberger W T Jr. Environmental biochemistry of chromium [J]. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 1994, **136**: 91-121.
- [19] Kelly C A, Rudd J W M, Holoka M H. Effect of pH on mercury uptake by an aquatic bacterium; implications for Hg cycling[J]. *Environmental Science and Technology*, 2003, **37**(13): 2941-2946.
- [20] Golding G R, Sparling R, Kelly C A. Effect of pH on intracellular accumulation of trace concentrations of $\text{Hg}(\text{II})$ in *Escherichia coli* under anaerobic conditions, as measured using a *mer-lux* bioreporter [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, **74**(3): 667-675.
- [21] Hynninen A, Virta M. Whole-Cell bioreporters for the detection of bioavailable metals [J]. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2010, **118**: 31-64.
- [22] Virta M, Lampinen J, Karp M. A luminescence-based mercury biosensor[J]. *Analytical Chemistry*, 1995, **67**(3): 667-669.
- [23] Petänen T, Virta M, Karp M, *et al.* Construction and use of broad host range mercury and arsenite sensor plasmids in the soil bacterium *Pseudomonas fluorescens* OS8[J]. *Microbial Ecology*, 2001, **41**(4): 360-368.

CONTENTS

Estimation of PM _{2.5} over Eastern China from MODIS Aerosol Optical Depth Using the Back Propagation Neural Network	GUO Jian-ping, WU Ye-rong, ZHANG Xiao-ye, <i>et al.</i> (817)
Comparison of Atmospheric Particulate Matter and Aerosol Optical Depth in Beijing City	LIN Hai-feng, XIN Jin-yuan, ZHANG Wen-yu, <i>et al.</i> (826)
Impacts of Meteorological Factors on Atmospheric Methane Mole Fractions in the Background Area of Yangtze River Delta	PU Jing-jiao, XU Hong-hui, GU Jun-qiang, <i>et al.</i> (835)
Dispersion and Analysis of Odor Pollution in Landfill Area Under the Enclosed Operation Condition	LU Peng, WU Shi-xing, DAI Zhi-feng, <i>et al.</i> (842)
Distribution Characteristics and Sea-Air Fluxes of Volatile Halocarbons in the East China Sea in Winter	HE Zhen, LU Xiao-lan, YANG Gui-peng (849)
Intra- and Inter-annual Variabilities of Particulate Organic Matter in the Mirs Bay from 2000 to 2010	LI Xu-lu, ZHOU Yi-pin, XIA Hua-yong (857)
Phytoplankton Assemblages and Their Relation to Environmental Factors by Multivariate Statistic Analysis in Bohai Bay	ZHOU Ran, PENG Shi-tao, QIN Xue-bo, <i>et al.</i> (864)
Characteristics and Evolution of Hydrochemical Compositions of Freshwater Lake in Tibetan Plateau	WANG Peng, SHANG Ying-nan, SHEN Li-cheng, <i>et al.</i> (874)
Estimation of Nonpoint Source Pollutant Loads and Optimization of the Best Management Practices (BMPs) in the Zhangweinan River Basin	XU Hua-shan, XU Zong-xue, LIU Pin (882)
An Object-Oriented Intelligent Engineering Design Approach for Lake Pollution Control	ZOU Rui, ZHOU Jing, LIU Yong, <i>et al.</i> (892)
Contribution of Plant Litters to Sediments Organic Matter in Jiulong River Estuary Wetland	LUO Zhuan-xi, QIU Zhao-zheng, WANG Zhen-hong, <i>et al.</i> (900)
Application of Tiered Approach to Assess the Impact of Backfilling Remediated Soil on Groundwater	ZHONG Mao-sheng, JIANG Lin, YAO Jue-jun, <i>et al.</i> (907)
Removal of Nitrate from Groundwater Using Permeable Reactive Barrier	LI Xiu-li, YANG Jun-jun, LU Xiao-xia, <i>et al.</i> (914)
Research on Pollution Load of Sediments in Storm Sewer in Beijing District	LI Hai-yan, XU Bo-ping, XU Shang-ling, <i>et al.</i> (919)
Occurrence and Risk Assessment of Five Selected PPCPs in Municipal Wastewater Treatment Plant and the Receiving Water	WEN Zhi-hao, DUAN Yan-ping, MENG Xiang-zhou, <i>et al.</i> (927)
Microbial Risk Assessment of Urban Water Bodies for Aesthetical and Recreational Uses	SUN Fu, SHA Jing, ZHANG Yi-fan, <i>et al.</i> (933)
Study on Removal of Di-(2-Ethylhexyl) Phthalate by Using of Small-Scale Biological Aerated Filter	LI Wei, ZHAO Jing, YU Jian, <i>et al.</i> (943)
Mechanism of Membrane Fouling and Filtration Characteristics in a Membrane Bioreactor for Industrial Wastewater Treatment	FAN Ju-hong, YU Su-lin, ZHANG Pei-shuai, <i>et al.</i> (950)
Enhanced Electro-Chemical Oxidation of Acid Red 3R Solution with Phosphotungstic Acid Supported on γ -Al ₂ O ₃	YUE Lin, WANG Kai-hong, GUO Jian-bo, <i>et al.</i> (955)
Degradation Kinetics of Activated Carbon Catalyzed Persulfate Oxidation Orange G	YANG Mei-mei, ZHOU Shao-qi, LIU Dan, <i>et al.</i> (962)
Study on the Start-up of the Anaerobic Baffled Reactor for Treating Alkali-dewighting and Dyeing-printing Wastewater	YANG Bo, ZHONG Qi-jun, LI Fang, <i>et al.</i> (968)
Study on the Pollutants Removal Performance Along the Advanced Treatment in Tannery Wastewater by O ₃ -BAF	YU Bin, LIU Rui, CHENG Jia-di, <i>et al.</i> (974)
Effect of Pilot UASB-SFSBR-MAP Process for the Large Scale Swine Wastewater Treatment	WANG Liang, CHEN Chong-jun, CHEN Ying-xu, <i>et al.</i> (979)
Cultivation of Aerobic Granular Sludge with Municipal Wastewater and Studies on Its Characteristics Under the Continuous Flow	NIU Shu, DUAN Bai-chuan, ZHANG Zuo-li, <i>et al.</i> (986)
Kinetic Model of Enhanced Biological Phosphorus Removal with Mixed Acetic and Propionic Acids as Carbon Sources (I) : Model Constitution	ZHANG Chao, CHEN Yin-guang (993)
Kinetic Model of Enhanced Biological Phosphorus Removal with Mixed Acetic and Propionic Acids as Carbon Sources (II) : Process Simulation	ZHANG Chao, CHEN Yin-guang (998)
Kinetic Model of Enhanced Biological Phosphorus Removal with Mixed Acetic and Propionic Acids as Carbon Sources (III) : Model Application	ZHANG Chao, CHEN Yin-guang (1004)
Comparative Study on Water-air CO ₂ , CH ₄ Flux in Two Tributaries in the Three Gorges Reservoir, China	LI Zhe, BAI Lei, GUO Jin-song, <i>et al.</i> (1008)
Factors Influencing the Spatial Variability in Soil Respiration Under Different Land Use Regimes	CHEN Shu-tao, LIU Qiao-hui, HU Zheng-hua, <i>et al.</i> (1017)
Differences in Soil Respiration Between Cropland and Grassland Ecosystems and Factors Influencing Soil Respiration on the Loess Plateau	ZHOU Xiao-gang, ZHANG Yan-jun, NAN Ya-fang, <i>et al.</i> (1026)
Application and Benefit Evaluation of Tiered Health Risk Assessment Approach on Site Contaminated by Benzene	JIANG Lin, ZHONG Mao-sheng, LIANG Jin, <i>et al.</i> (1034)
History of Heavy Metal Pollution from Tidal Flat in Haizhou Bay	ZHANG Rui, ZHANG Fan, LIU Fu-cheng, <i>et al.</i> (1044)
Accumulation, Distribution and Pollution Assessment of Heavy Metals in Surface Sediment of Caohai Plateau Wetland, Guizhou Province	ZHANG Qing-hai, LIN Chang-hu, TAN Hong, <i>et al.</i> (1055)
Assessment and Correlation Analysis of Heavy Metals Pollution in Soil of Dajinshan Island	CHENG Fang, CHENG Jin-ping, SANG Heng-chun, <i>et al.</i> (1062)
Fraction Distribution and Risk Assessment of Heavy Metals in Stream Sediments from a Typical Nonferrous Metals Mining City	LI Ru-zhong, JIANG Yan-min, PAN Cheng-rong, <i>et al.</i> (1067)
Contamination and Health Risk for Heavy Metals via Consumption of Vegetables Grown in Fragmentary Vegetable Plots from a Typical Nonferrous Metals Mine City	LI Ru-zhong, PAN Cheng-rong, XU Jing-jing, <i>et al.</i> (1076)
Correlativity Study of the Distribution of Soil Magnetic Susceptibility and the Heavy Metal Contents in Xi'an City	CHEN Xiu-duan, LU Xin-wei, YANG Guang (1086)
Distribution Characteristics and Environmental Significance of Heavy Metals in Soil Particle Size Fractions from Tropical Forests in China	GONG Cang, XU Dian-dou, CHENG Hang-xin, <i>et al.</i> (1094)
Study on Phosphorus Adsorption Characteristic of Sediments in an Ecological Ditch	ZHANG Shu-nan, JIA Zhao-yue, XIAO Run-lin, <i>et al.</i> (1101)
Fractions and Adsorption Characteristics of Phosphorus on Sediments and Soils in Water Level Fluctuating Zone of the Pengxi River, a Tributary of the Three Gorges Reservoir	SUN Wen-bin, DU Bin, ZHAO Xiu-lan, <i>et al.</i> (1107)
Sorption Behavior of Triton X-100 on Loess and Affecting Factors	ZHONG Jin-kui, ZHAO Bao-wei, ZHU Kun, <i>et al.</i> (1114)
Residual Levels in Air, Soil and Soil-Air Exchange of Organochlorine Pesticides in Hami Region of Xinjiang and Its Potential Ecological Risk	MA Zi-long, MAO Xiao-xuan, DING Zhong-yuan, <i>et al.</i> (1120)
Levels and Sources of Decabromodiphenyl Ether and Dechlorane Plus in Xining and Tianjun, Qinghai Province, China	HE Chang, JIN Jun, MA Zhao-hui, <i>et al.</i> (1129)
Vertical Distribution of PBDEs and DL-PCBs in Sediments of Taihu Lake	MA Zhao-hui, JIN Jun, QI Xue-kui, <i>et al.</i> (1136)
Characteristics of Organic Pollutants in the Sediments from a Typical Electronics Industrial Zone	LIU Jin, DENG Dai-yong, XU Mei-ying, <i>et al.</i> (1142)
Emission Characteristics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Exhaust Particles from a Diesel Car	TAN Pi-qiang, ZHOU Zhou, HU Zhi-yuan, <i>et al.</i> (1150)
Characterization of PAHs in Fly Ashes from Coke Production	MU Ling, PENG Lin, LIU Xiao-feng, <i>et al.</i> (1156)
Comparison of PAHs Distribution in Stabilized Sludge by Sludge Drying Bed and Reed Bed	CUI Yu-bo, SUN Hong-jie, RAN Chun-qiu, <i>et al.</i> (1161)
Effects of Adsorbents on Partitioning and Fixation of Heavy Metals in the Incineration Process of Sewage Sludge	LIU Jing-yong, SUN Shui-yu, CHEN Tao (1166)
Environmental Toxicity of Waste Foundry Sand	ZHANG Hai-feng, WANG Yu-jue, WANG Jin-lin, <i>et al.</i> (1174)
Construction and Properties of a Microbial Whole-cell Sensor CB10 for the Bioavailability Detection of Cr ⁶⁺	HOU Qi-hui, MA An-zhou, ZHUANG Xu-liang, <i>et al.</i> (1181)
Structure and Dynamics of Microbial Community in the Denitrifying Sulfide Removal Process	YU Hao, WANG Ai-jie, CHEN Chuan (1190)
Effects of Physico-chemical Parameters on the Abundance of the Denitrification-associated Genes <i>nirK</i> , <i>nirS</i> and <i>nosZ</i> During Agricultural Waste Composting	HU Chun-xiao, CHEN Yao-ning, ZHANG Jia-chao, <i>et al.</i> (1196)
Impact of PAHs on the Expression of PRDX in Earthworm (<i>Eisenia fetida</i>)	LIN Kang-li, ZHENG Sen-lin, SONG Yu-fang, <i>et al.</i> (1204)
Preparation of OMC-Au/L-Lysine/Au Modified Glassy Carbon Electrode and the Study on Its Detection Response to Hydroquinone and Catechol	ZHOU Yao-yu, TANG Lin, LI Zhen, <i>et al.</i> (1211)
Risk Communication in Construction of New Nuclear Power Plant	HE Gui-zhen, LÜ Yong-long (1218)

《环境科学》第6届编辑委员会

主 编: 欧阳自远

副主编: 赵景柱 郝吉明 田 刚

编 委: (按姓氏笔画排序)

万国江 王华聪 王凯军 王绪绪 田 刚 田 静 史培军
朱永官 刘志培 汤鸿霄 陈吉宁 孟 伟 周宗灿 林金明
欧阳自远 赵景柱 姜 林 郝郑平 郝吉明 聂永丰 黄 霞
黄 耀 鲍 强 潘 纲 潘 涛 魏复盛

环 境 科 学

(HUANJING KEXUE)

(月刊 1976年8月创刊)

2013年3月15日 34卷 第3期

ENVIRONMENTAL SCIENCE

(Monthly Started in 1976)

Vol. 34 No. 3 Mar. 15, 2013

主 管	中国科学院	Superintended	by	Chinese Academy of Sciences
主 办	中国科学院生态环境研究中心	Sponsored	by	Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences
协 办	(以参加先后为序) 北京市环境保护科学研究院 清华大学环境学院	Co-Sponsored	by	Beijing Municipal Research Institute of Environmental Protection School of Environment, Tsinghua University
主 编	欧阳自远	Editor-in -Chief		OUYANG Zi-yuan
编 辑	《环境科学》编辑委员会 北京市2871信箱(海淀区双清路 18号, 邮政编码:100085) 电话:010-62941102, 010-62849343 传真:010-62849343 E-mail: hjkx@ rcees. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn	Edited	by	The Editorial Board of Environmental Science (HUANJING KEXUE) P. O. Box 2871, Beijing 100085, China Tel:010-62941102, 010-62849343; Fax:010-62849343 E-mail: hjkx@ rcees. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn
出 版	科 学 出 版 社 北京东黄城根北街16号 邮政编码:100717	Published	by	Science Press 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
印 刷 装 订	北京北林印刷厂	Printed	by	Beijing Bei Lin Printing House
发 行	科 学 出 版 社 电话:010-64017032 E-mail: journal@ mail. sciencep. com	Distributed	by	Science Press Tel:010-64017032 E-mail: journal@ mail. sciencep. com
订 购 处	全国各地邮电局	Domestic		All Local Post Offices in China
国外总发行	中国国际图书贸易总公司 (北京399信箱)	Foreign		China International Book Trading Corporation (Guoji Shudian), P. O. Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号: ISSN 0250-3301
CN 11-1895/X

国内邮发代号: 2-821

国内定价: 90.00元

国外发行代号: M 205

国内外公开发行人