

• 环境生物技术 •

构建全细胞生物传感器测定农田土壤中有机磷农药甲基对硫磷含量

马钊^{1,2}, 李猛^{1,2*}

1 深圳大学高等研究院 深圳大学古菌生物学研究中心, 广东 深圳 518061

2 深圳大学高等研究院 深圳市海洋微生物组工程重点实验室, 广东 深圳 518061

马钊, 李猛. 构建全细胞生物传感器测定农田土壤中有机磷农药甲基对硫磷含量[J]. 生物工程学报, 2023, 39(7): 2706-2718.

MA Zhao, LI Meng. Development of a whole-cell biosensor for detecting organophosphorus pesticide methyl parathion in the farmland soil[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(7): 2706-2718.

摘 要: 土壤中污染物的生物有效性评估对于准确评价环境污染风险至关重要, 而全细胞生物传感器是此类评估的重要工具之一。本研究旨在使用新型全细胞生物传感器建立土壤中甲基对硫磷(methyl parathion, MP)的检测方法。首先, 使用筛选出的甲基对硫磷水解酶基因(methyl parathion degrading gene, *mpd*)和 pUC19 质粒骨架以及已有的特异性诱导元件 *pobR* 为材料, 构建全细胞生物传感器。然后, 以 96 孔的酶标板为载体和以 5 种全细胞生物传感器为指示细胞, 建立了土壤提取液样品中甲基对硫磷的分析方法, 并应用于实际测试和田间土壤样品中甲基对硫磷的检测。以检测性能的最佳大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α /pMP-AmilCP 为例, 其检测限为 6.21–6.66 $\mu\text{g/L}$, 线性范围为 10–10 000 $\mu\text{g/L}$ 。 *E. coli* DH5 α /pMP-RFP 和 *E. coli* DH5 α /pMP-AmilCP 的方法用于分析土壤提取液样品中甲基对硫磷的浓度, 具有较好的检测性能。这种全细胞生物传感器方法有助于快速评估土壤中甲基对硫磷的生物有效性强弱, 从而有效判断有机磷农药甲基对硫磷对土壤的污染风险。
关键词: 全细胞生物传感器; 甲基对硫磷; *mpd* 基因; 检测; 土壤

资助项目: 国家自然科学基金(42107012, 32070108); 中国博士后基金(2021M692194); 深圳市基础研究重点项目(JCYJ20200109105010363); 广东省普通高校创新团队项目(2020KCXTD023)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (42107012, 32070108), the China Postdoctoral Science Foundation (2021M692194), the Shenzhen Science and Technology Program (JCYJ20200109105010363), and the Innovation Team Project of Universities in Guangdong Province (2020KCXTD023).

*Corresponding author. E-mail: limeng848@szu.edu.cn

Received: 2023-02-21; Accepted: 2023-03-13

Development of a whole-cell biosensor for detecting organophosphorus pesticide methyl parathion in the farmland soil

MA Zhao^{1,2}, LI Meng^{1,2*}

1 Archaeal Biology Center, Institute for Advanced Study, Shenzhen University, Shenzhen 518061, Guangdong, China

2 Shenzhen Key Laboratory of Marine Microbiome Engineering, Institute for Advanced Study, Shenzhen University, Shenzhen 518061, Guangdong, China

Abstract: The evaluation of the bioavailability of pollutants in soil is crucial to accurately assess the pollution risk, and whole-cell biosensor is one of the important tools for such evaluation. This study aimed to develop a novel whole-cell biosensor for the detection of methyl parathion in soil using. First, a whole-cell biosensor was constructed by the screened methyl parathion hydrolase *mpd* gene, the existing specific induction element *pobR*, and the pUC19 plasmid skeleton. Then, the detection method of methyl parathion in soil extracts was established using 96-well microtiter plate as carrier and five whole-cell biosensors as indicator. The method was applied in the detection of methyl parathion in tested and field soil extracts. Taking *E. coli* DH5 α /pMP-AmilCP with the best detection performance as an example, this biosensor had a detection limit of 6.21–6.66 $\mu\text{g/L}$ and a linear range of 10–10 000 $\mu\text{g/L}$ for methyl parathion in four soil extracts. *E. coli* DH5 α /pMP-RFP and *E. coli* DH5 α /pMP-AmilCP methods have good detection performance for the analysis of methyl parathion in soil extract samples. This biosensor method can help to quickly assess the bioavailability of methyl parathion in soil, and thus help to understand the risk of soil pollution caused by organophosphorus pesticide methyl parathion.

Keywords: whole-cell biosensors; methyl parathion; *mpd* gene; detection; soil

有机磷农药对土壤环境的污染是全球普遍关注的问题^[1]。筛查此类污染物并评估其在土壤中的生物有效性,对于保护公众健康至关重要,但这项研究仍然存在诸多挑战^[2]。目前,全细胞生物传感器(whole-cell biosensor)检测是评价污染物在复杂介质中生物有效性的重要手段^[3-4]。全细胞生物传感器主要以功能性质粒和模式微生物[如大肠杆菌(*Escherichia coli*)和毕赤酵母(*Pichia pastoris*)等]构成^[5-6]。功能性质粒主要是由可特异性应答化合物的浓度变化的基因调控元件和报告基因组成,已报道的基因调

控元件有 *terR* 基因(四环素类抗生素)^[7]、*cdaR* 基因(3-羟基丙酸)^[8]、*lysR* 基因(莽草酸)^[9]和 *gcdR* (戊二酸)^[10]等。由于现有的调控元件不能满足环境介质中所有潜在的污染物检测的需要,需寻找与目标污染物相关的调控基因元件,构建特异性全细胞生物传感器,应用于污染物的指示和监测^[8,11-12]。目前,直接受有机磷农药诱导的基因调控元件鲜有报道^[13]。因此,通过以上传统思路来构建有机磷农药的全细胞生物传感器将会非常艰难。

自发现有机磷农药应用于农业生产而产生

污染危害后,科学家对有机磷农药相关微生物菌种资源和降解代谢机理做了大量细致的研究工作^[14-15],为有机磷农药的全细胞生物传感器的开发提供不同的思路。目前,有机磷农药的全细胞生物传感器所含有的关键功能性质粒主要是由有机磷水解酶和基因调控元件(可被水解产物诱导)构成,如对硫磷和对氧磷可被水解酶 *opd* 水解,其水解产物可诱导 *dmpR*^[16]、*capR*^[17] 和 *phhR*^[18] 等基因元件,使基因元件控制的报告基因得以表达。已有文献报道有机磷农药甲基对硫磷(methyl parathion, MP)可被水解酶 *mpd* 蛋白降解为对硝基酚^[19-20],而用于甲基对硫磷检测的全细胞生物传感器的研究较为匮乏。本实验室前期改进可特异性响应其降解产物(对硝基酚)浓度变化的基因元件 *pobR*,构建了对硝基酚的全细胞生物传感器以及检测方法,其检测准确度高且背景值低^[21]。因此,是否可以筛选性能优异的甲基对硫磷水解酶 *mpd*,结合 *pobR* 基因元件,构建甲基对硫磷的全细胞生物传感器,并应用于土壤中甲基对硫磷的检测?这还有待进一步研究。此外,目前关于全细胞生物传感器的研究,多以红色和绿色荧光蛋白作为主要报告基因^[22-23]。土壤样品中存在的某些有机物(如腐殖质和有机酸等)的荧光吸收峰,可能与某些荧光蛋白的荧光吸收峰重叠^[24],从而影响全细胞生物传感器对土壤中有机磷农药检测的精确度,因此这这也是一个急需解决的难题。

在本研究中,为了提高生物传感器对甲基对硫磷的检测性能,对甲基对硫磷水解酶 *mpd* 基因进行筛选;使用不同类型质粒骨架(*pUC19*、*pBR322* 和 *pET21a*),比较水解酶对甲基对硫磷的水解能力上的差异。构建携带不同报告基因(红色荧光蛋白 RFP、青色荧光蛋白 CFP、黄色荧光蛋白 YFP、绿色荧光蛋白 GFP 和紫色蛋白 AmilCP)的 5 类全细胞生物传感器,

比较不同报告基因在检测不同类型的土壤中甲基对硫磷的性能优劣。使用全细胞生物传感器建立以 96 孔板为载体的土壤提取液中甲基对硫磷的检测方法,获得相应的计算公式、检出限和线性范围,并使用实际土壤样品对该方法进行验证。

1 材料与方法

1.1 试剂和培养基

氨苄青霉素、卡那霉素和甲基对硫磷购自 Sigma-Aldrich Co.。使用甲醇配制以上 2 种抗生素的母液(10 mg/mL),用无菌的 0.2 μm 过滤器过滤除菌,并在使用前用无菌 Milli-Q 水做进一步稀释。根据 OK Clon DNA Ligation Kit 无缝克隆试剂盒(Accurate Biology)的用户手册进行操作,包括 DNA 片段凝胶电泳, DNA 克隆和构建的质粒转化。将 Lysogeny broth (LB)培养基应用于全细胞生物传感器细胞培养,并在 LB 培养基中加入 15 g/L 琼脂配制成固体培养基。用 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素或 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素对 LB 固体培养基和液体培养基做适当调整,以满足特定试验的需要。

1.2 有机磷农药降解基因的筛选

从有关有机磷农药生物降解的文献报道中获得 6 个 *mpd* 功能蛋白(AAK14390、AAP06948、AAA24930、AAA98299、AAT84091 和 AAK40367),它们可将甲基对硫磷水解为对硝基酚^[14-15,25]。为了获得能特异性水解甲基对硫磷的最佳 *mpd* 基因,将 6 种 *mpd* 基因分别融合到拷贝型质粒 *pUC19* 和 *pBR322* 后转化到 *E. coli* DH5 α 细胞,也将其分别融合到表达型质粒 *pET21a* 构建的质粒转化到 *E. coli* BL21 细胞。*mpd* 基因在不同类型的质粒上表达时,比较宿主细胞水解甲基对硫磷的能力(表 1)。根据质粒的抗生素抗性,选择 LB 液体培养基(含有 50 mg/L 卡那霉素或 100 mg/L

表 1 菌种和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids

Strain or plasmid	Genotype or phenotype	Source or reference
pUC19-mpd-AAK14390	Amp ^r , <i>mpd</i> (AAK14390)	Synthesis
pUC19-mpd-AAA24930	Amp ^r , <i>mpd</i> (AAA24930)	Synthesis
pUC19-mpd-AAP06948	Amp ^r , <i>mpd</i> (AAP06948)	Synthesis
pUC19-mpd-AAA98299	Amp ^r , <i>mpd</i> (AAA98299)	Synthesis
pUC19-mpd-AAK40367	Amp ^r , <i>mpd</i> (AAK40367)	Synthesis
pUC19-mpd-AAT84091	Amp ^r , <i>mpd</i> (AAT84091)	Synthesis
pBR322-mpd-AAK14390	Kan ^r , <i>mpd</i> (AAK14390)	This study
pBR322-mpd-AAA24930	Kan ^r , <i>mpd</i> (AAA24930)	This study
pBR322-mpd-AAP06948	Kan ^r , <i>mpd</i> (AAP06948)	This study
pBR322-mpd-AAA98299	Kan ^r , <i>mpd</i> (AAA98299)	This study
pBR322-mpd-AAK40367	Kan ^r , <i>mpd</i> (AAK40367)	This study
pBR322-mpd-AAT84091	Kan ^r , <i>mpd</i> (AAT84091)	This study
pET21a-mpd-AAK14390	Amp ^r , <i>mpd</i> (AAK14390)	This study
pET21a-mpd-AAA24930	Amp ^r , <i>mpd</i> (AAA24930)	This study
pET21a-mpd-AAP06948	Amp ^r , <i>mpd</i> (AAP06948)	This study
pET21a-mpd-AAA98299	Amp ^r , <i>mpd</i> (AAA98299)	This study
pET21a-mpd-AAK40367	Amp ^r , <i>mpd</i> (AAK40367)	This study
pET21a-mpd-AAT84091	Amp ^r , <i>mpd</i> (AAT84091)	This study
pPNP-mrfp	<i>pobR</i> 1-3, <i>pobO</i> , <i>lacZ</i> , Kan ^r , <i>mpd</i> , <i>lacI</i> , T7	This study
pUC17-RFP	<i>lacZ</i> , Amp ^r , <i>rfp</i>	This study
pET28a-CFP	<i>lacZ</i> , Kan ^r , <i>cfp</i>	This study
pET28a-YFP	<i>lacZ</i> , Kan ^r , <i>yfp</i>	This study
pBR322-GFP	<i>lacZ</i> , Kan ^r , <i>gfp</i>	This study
pUC17-AmilCP	<i>lacZ</i> , Amp ^r , <i>amilCP</i>	This study
pCU19	<i>lacZ</i> , Amp ^r	Sangon Biotech (Shanghai) Co.
pMP-RFP	pCU19 plasmid skeleton, <i>pobR</i> , <i>pobO</i> , <i>rfp</i> , Amp ^r , <i>lacI</i> , T7, <i>mpd</i> (AAA24930)	This study
pMP-CFP	pCU19 plasmid skeleton, <i>pobR</i> , <i>pobO</i> , <i>cfp</i> , Amp ^r , <i>lacI</i> , T7, <i>mpd</i> (AAA24930)	This study
pMP-YFP	pCU19 plasmid skeleton, <i>pobR</i> , <i>pobO</i> , <i>yfp</i> , Amp ^r , <i>lacI</i> , T7, <i>mpd</i> (AAA24930)	This study
pMP-GFP	pCU19 plasmid skeleton, <i>pobR</i> , <i>pobO</i> , <i>gfp</i> , Amp ^r , <i>lacI</i> , T7, <i>mpd</i> (AAA24930)	This study
pMP-AmilCP	<i>pobR</i> , <i>pobO</i> , <i>amilCP</i> , Amp ^r , <i>lacI</i> , T7, <i>mpd</i> (AAA24930)	This study
<i>Escherichia coli</i> DH5α	Δ(<i>lacZYA</i> -argF) U169, <i>deoR</i> , <i>recA</i> 1, <i>endA</i> 1, <i>hsdR</i> 17 (rk-,mk)	Sangon Biotech (Shanghai) Co.
<i>Escherichia coli</i> BL21	F-, <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (rBB-Mb-), <i>gal</i> , <i>dcm</i>	Sangon Biotech (Shanghai) Co.

氨苄青霉素), 在 100 mL 的 LB 液体培养基添加 10 μL 浓度为 1 mol/L 的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(isopropyl-β-D-thiogalactoside, IPTG), 培养 24 h 后, 向培养液中加入 10 μL 甲基对硫磷

(10 mg/mL), 继续在 37 °C 条件下培养 4 h。根据文献方法^[26], 使用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)确定甲基对硫磷的残留量。

1.3 全细胞生物传感器的构建及诱导试验

使用无缝克隆技术, 将此前研究获得的 *pobR* 基因^[21]、5 种报告基因(*rfp*、*cfp*、*gfp* 和 *yfp* 荧光蛋白基因和 *amilCP* 紫色蛋白基因)和上述试验筛选获得的 *mpd* 基因与质粒骨架融合构建成新的功能型质粒。这些基因扩增产物重组为 5 个质粒, 分别命名为 pMP-RFP、pMP-CFP、pMP-GFP、pMP-YFP 和 pMP-AmilCP (表 1)。将重构的质粒转入感受态细胞 *E. coli* DH5 α , 获得 5 种全细胞生物传感器(*E. coli* DH5 α /pMP-RFP、*E. coli* DH5 α /pMP-CFP、*E. coli* DH5 α /pMP-YFP、*E. coli* DH5 α /pMP-GFP 和 *E. coli* DH5 α /pMP-AmilCP)。 *rfp*、*cfp*、*gfp* 和 *yfp* 荧光蛋白基因以及 *amilCP* 紫色蛋白基因通过表达可以产生红色、青色、绿色和黄色荧光, 以及紫色色素蛋白。所有报告基因都受到对硝基酚控制的转录调控元件(*pobR*)的严格控制, 而有机磷水解酶基因 *mpd* 受 *lacI* 转录调控基因的严格控制。将 LB 液体培养基活化的全细胞生物传感器细胞滴加到试验组 LB 固体培养基平板(100 mg/L 氨苄青霉素、1 mg/L 甲基对硫磷和 0.1 mol/L IPTG)和空白对照组 LB 固体培养基平板(100 mg/L 氨苄青霉素和 0.1 mol/L IPTG)上, 37 °C 下静置培养约 24 h, 使用相机对细菌菌落进行拍照。

1.4 全细胞生物传感器检测甲基对硫磷的方法

E. coli DH5 α /pMP-RFP、*E. coli* DH5 α /pMP-CFP、*E. coli* DH5 α /pMP-YFP、*E. coli* DH5 α /pMP-GFP 和 *E. coli* DH5 α /pMP-AmilCP 菌株在 LB 液体培养基(100 mg/L 氨苄青霉素)中活化培养。将培养液接种到新的 LB 液体培养基(100 mg/L 氨苄青霉素), 37 °C、150 r/min 振荡培养, 至细胞 OD_{600} 达 0.45–0.50。收集培养细胞, 用 1/2 LB 液体培养基(含等量的 0.100 mol/L PBS 缓冲液和 20%甘油, pH 7.20)将其重悬。使用重悬试剂将细胞悬浮液 OD_{600} 调整为 1.00, 并将其分

装为每管 1.00 mL, -70 °C 保存备用。

向上述细胞悬浮液中加入 10 μ L 细胞敏化剂[含 0.1 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.20)、0.25 μ g/mL 多粘菌素 B 和 0.1 mol/L EDTA], 37 °C 振荡培养 0.5 h, 使细胞复苏。0.5 h 的复苏时间对以 *E. coli* 为载体的生物传感器细胞数量个体差异性影响较小^[7]。低剂量的多粘菌素 B 可以使 *E. coli* 的细胞壁松弛, 有利于污染物进入生物传感器细胞中, 且不会影响生物传感器细胞的生长和基因表达^[27-28]。将处理后的细胞(100 μ L/孔)分装到 96 孔板(corning)上, 添加 100 μ L/孔的检测样品(含甲基对硫磷 1/2 LB 液体培养基或土壤提取物), 并加入 10 μ L/孔的 1 mmol/L IPTG 混合。封装后, 将 96 孔板 37 °C 振荡培养 4 h^[29]。使用 SpectraMaxM5 酶标仪(Molecular Devices Co.)测定反应液的荧光值或吸光度值。酶标仪的检测参数参考红色荧光(激发波长 587 nm, 发射波长 610 nm)、青色荧光(激发波长 439 nm 和发射波长 476 nm)、黄色荧光(激发波长 514 nm 和发射波长 527 nm)、绿色荧光(激发波长 488 nm 和发射波长 511 nm)和紫色色素蛋白(紫外波长 588 nm)^[30]。

将风干研磨过的 4 种土壤(黄棕壤 Alfisol、红壤 Ultisol、黑土 Mollisol 和紫土 Inceptisol, 未检出含甲基对硫磷残留, 土壤理化性质见表 2)与等量的 1/2 LB 液体培养基(含 0.1 mmol/L EDTA)混合, 80 kHz 超声处理 20 min, 5 000 \times g 离心 10 min, 收集土壤浸出液。将甲基对硫磷加入土壤浸出液, 配制含不同浓度(0、10、25、50、75、100、250、500、750、1 000、2 500、5 000、7 500、10 000 μ g/L)甲基对硫磷的标准样品。根据上述试验方法, 使用配制的甲基对硫磷的土壤浸出液标准样品, 绘制计算甲基对硫磷浓度的标准曲线。全细胞生物传感器的检测限(detection limits, *DL*)由文献建立的方程 $DL=3SD/K$ (*SD* 和 *K* 分别表示空白对照的标准

表 2 四种测试土壤的理化性质

Table 2 Physicochemical property of tested four soils

Soils	Location	CEC (cmol/kg)	pH	Organic carbon (f_{oc} ; g/kg)	Soil particle size distribution		
					Clay (%)	Sand (%)	Silt (%)
Alfisol	Nanjing, China	9.72	7.13	15.9	35.7	50.2	14.1
Mollisol	Harbin, China	2.45	6.11	25.8	35.1	46.3	18.6
Ultisol	Yingtian, China	3.65	5.44	6.3	31.2	44.4	24.4
Inceptisol	Mianyang, China	14.10	7.25	5.7	44.2	34.1	21.7
S _{A1}	Nanjing, China	9.31	7.15	16.7	33.7	52.1	14.2
S _{A2}	Nanjing, China	9.09	7.11	15.6	34.4	51.0	14.6

The f_{oc} values denote the contents of organic carbon. The pH and cation exchange capacity (CEC), measured in 1:1 soil: water extract.

偏差和标准曲线的斜率)。根据标准曲线的 R^2 值大于 0.900 的部分, 估算全细胞生物传感器检测方法的线性范围^[29]。

1.5 全细胞生物传感器对实际土壤中甲基对硫磷检测方法

取用风干研磨黄棕壤样品等量分 10 份, 标记为 S₁–S₁₀; 同时取用风干研磨黑土样品等量分 10 份, 标记为 S₁₁–S₂₀, 在这 20 个土壤样品中随机加入适量的甲基对硫磷农药, 用于模拟污染的农田土壤。此外, 还收集到 2 处被甲基对硫磷污染的农田污染土壤(中国南京), 分别将其标记为土壤 S_{A1} 和土壤 S_{A2}, 以实际检验这种生物传感器方法(表 2)。使用 1.4 的方法对土壤中甲基对硫磷进行提取, 收集土壤提取物。使用上述全细胞生物传感器的检测方法, 对样品中的甲基对硫磷污染残留进行分析。由于农田污染土壤中的甲基对硫磷存在自然降解为对硝基酚的可能, 可能干扰到甲基对硫磷的确定。因此, 在使用生物传感器方法检测真实农田污染土壤时, 需要有不添加 IPTG, 单纯测定由样品中残留对硝基酚产生的背景荧光值。在计算甲基对硫磷的检测值时, 需扣除此背景荧光值。

2 结果与分析

2.1 有机磷农药降解基因和质粒骨架的优化

mpd 基因编码的甲基对硫磷水解酶能否高

效地将甲基对硫磷降解为对硝基酚(*pobR* 转录因子的靶向效应分子), 是构建该全细胞生物传感器的关键环节(图 1A)。6 个 *mpd* 基因(蛋白质序列编号为 AAK14390、AAP06948、AAA24930、AAA98299、AAT84091 和 AAK40367)分别在 pUC19、pBR322 和 pET28a 质粒上的表达试验结果如图 1B 所示, 经 4 h 反应后, *mpd* 基因融合到 pET21a 质粒上表达时对甲基对硫磷的降解率都低于 17.3%; *mpd* 基因融合到 pBR322 质粒上表达时对甲基对硫磷的降解率有所提高, 分别为 86.9%±0.54%、56.9%±3.22%、48.2%±3.23%、49.1%±3.57%、69.1%±2.91%和 51.3%±3.77%。其中, 2 个 *mpd* 基因(蛋白质序列编号 AAK14390 和 AAK40367)融合到 pUC19 质粒上表达时对甲基对硫磷的降解率比其他质粒都高, 分别为 96.6%±0.22%和 82.6%±2.62%。根据以上试验结果, 最终确定使用蛋白质序列编号 AAK14390 的 *mpd* 基因和 pUC19 质粒骨架用于构建检测甲基对硫磷的功能性质粒。

2.2 生物传感器的构建

5 个新的功能性重组质粒(pMP-RFP、pMP-CFP、pMP-GFP、pMP-YFP 和 pMP-AmilCP)的基因结构示意图如图 2A 所示, 在高拷贝型质粒骨架 pUC19 上, 插入了受 *lacI* 启动子调控的 *mpd* 基因和受控于 *pobR* 特异性调控元件的报告基因。在设计质粒时, 使用 T7 终止子将

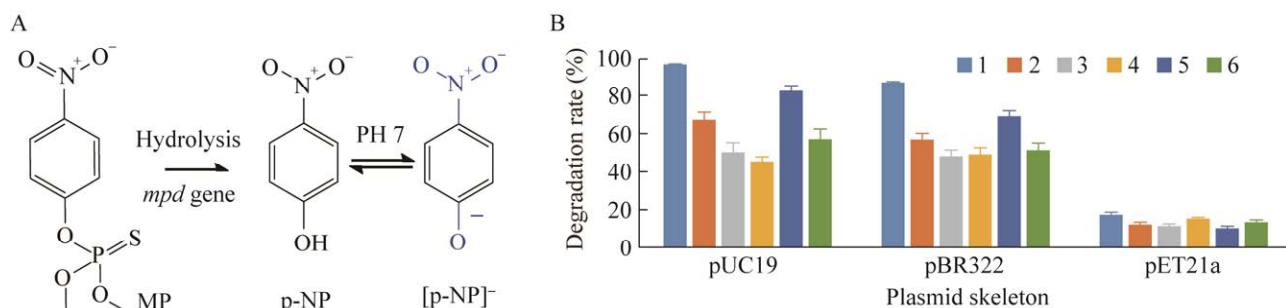


图1 有机磷农药降解基因和质粒骨架的优化 A: 甲基对硫磷代谢途径和化学结构. B: 甲基对硫磷水解酶基因和质粒骨架的筛选. 1、2、3、4、5和6分别表示 *mpd* (AAK14390、AAP06948、AAA24930、AAA98299、AAT84091和AAK40367)

Figure 1 Optimization of organophosphorus pesticide degradation gene and plasmid skeleton. A: Metabolic pathway and chemical structure of methyl parathion. B: Screening of methyl parathion hydrolase gene and plasmid skeleton. 1, 2, 3, 4, 5 and 6 represent *mpd* (AAK14390, AAP06948, AAA24930, AAA98299, AAT84091 and AAK40367).

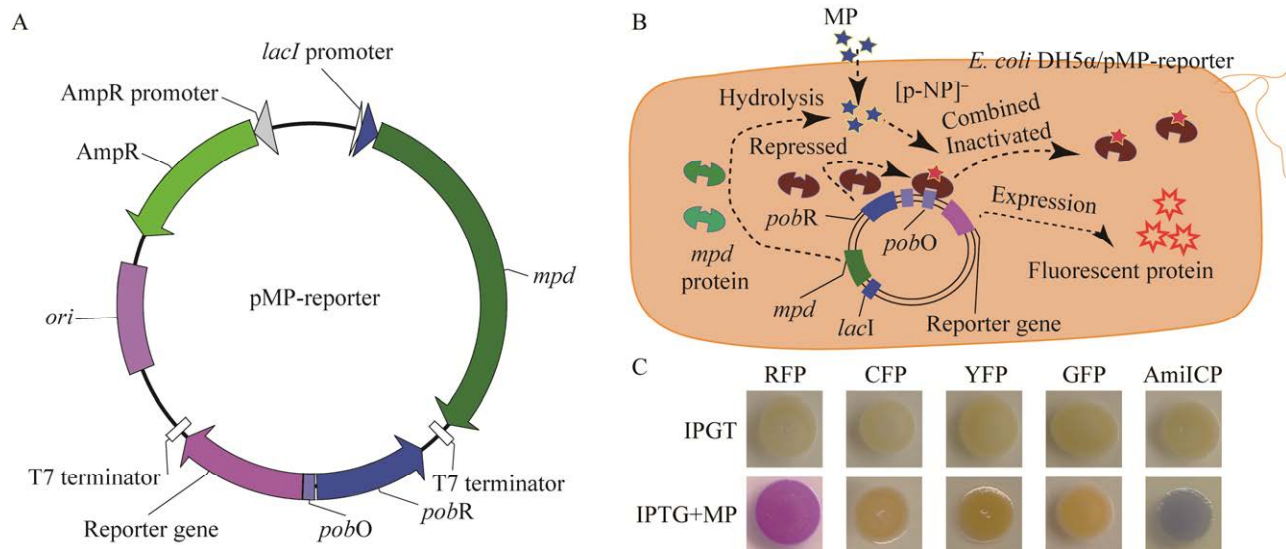


图2 重组质粒的构建 A: 重组质粒的示意图. B: 检测甲基对硫磷的遗传组织和机制. C: 甲基对硫磷诱导的相应细菌的荧光和颜色反应. RFP、CFP、GFP、YFP和AmilCP分别表示 *E. coli* DH5α/pMP-RFP、*E. coli* DH5α/pMP-CFP、*E. coli* DH5α/pMP-GFP、*E. coli* DH5α/pMP-YFP和*E. coli* DH5α/pMP-AmilCP检测甲基对硫磷

Figure 2 The construction of recombinant plasmids. A: Schematic presentation of the recombinant plasmid. B: Genetic organization and mechanism for the detection of methyl parathion. C: The fluorescence and color response of their corresponding bacteria induced by methyl parathion. RFP, CFP, GFP, YFP, and AmilCP represent *E. coli* DH5α/pMP-RFP, *E. coli* DH5α/pMP-CFP, *E. coli* DH5α/pMP-GFP, *E. coli* DH5α/pMP-YFP, and *E. coli* DH5α/pMP-AmilCP, respectively.

mpd 降解基因元件和 *pobR* 特异性调控元件阻隔,防止其表达和调控相互干扰。该功能性质粒在 *E. coli* DH5 α 细胞的工作机理如图 2B 所示。当甲基对硫磷进入含有功能性质粒的 *E. coli* DH5 α 细胞中,由 IPTG 诱导 *lacI* 启动子调控表达的甲基对硫磷水解酶基因高效率地将其水解为对硝基酚。对硝基酚可以和 *pobR* 基因表达产生的阻遏蛋白结合,使该阻遏蛋白从 *pobO* 启动子位点脱落,而与 *pobR* 基因反向的报告基因得到表达。由于靶向效应分子[p-NP]与 P_{obR} 阻遏蛋白的结合高度特异,未发现其他化合物(包含结构类似物)可诱导该蛋白,并终止其与 *pobO* 启动子的结合,这也保证了其对目标物检测的特异性^[31]。诱导试验的结果显示(图 2C),在 IPTG 和甲基对硫磷同时存在时, *E. coli* DH5 α /pMP-RFP 和 *E. coli* DH5 α /pMP-A_{mil}CP 细菌菌落带有红色和紫色,而 *E. coli* DH5 α /pMP-CFP、*E. coli* DH5 α /pMP-GFP 和 *E. coli* DH5 α /pMP-YFP 的细菌菌落带有较弱的淡黄色。如果直接用对硝基酚对该全细胞生物传感器进行诱导,报告基因也可以表达,这可以通过未添加 IPTG 的试验对照组来判断报告信号是由对硝基酚或甲基对硫磷产生。

2.3 新型生物传感器检测土壤提取物中甲基对硫磷的方法参数

为了量化土壤提取物中甲基对硫磷浓度,

利用生物传感器的报告基因的信号值的 \log 值与甲基对硫磷浓度可以建立线性正相关关系, 公式表示为: $\log MP = \alpha R$ (MP 、 α 和 R 分别表示甲基对硫磷浓度、标准曲线斜率和全细胞生物传感器的报告基因的信号值, 表 3)。使用生物传感器检测土壤中污染物, 其一般要求标准曲线的 $R^2 > 0.900$, 才能保证检测准确度。如表 3 所示, *E. coli* DH5 α /pMP-RFP、*E. coli* DH5 α /pMP-CFP、*E. coli* DH5 α /pMP-YFP 和 *E. coli* DH5 α /pMP-GFP 在应用于黑土和紫土中甲基对硫磷检测时, 其标准曲线的 R^2 值都小于 0.800, 特别是 *E. coli* DH5 α /pMP-CFP、*E. coli* DH5 α /pMP-YFP 和 *E. coli* DH5 α /pMP-GFP 在检测黑土时, 其标准曲线的 R^2 值分别低至 0.203、0.244 和 0.282, 这很难满足检测准确度的需要。*E. coli* DH5 α /pMP-AmilCP 在分析 4 种土壤和 *E. coli* DH5 α /pMP-RFP 在分析黄棕壤和红壤时, 这 2 种方法的标准曲线的 R^2 值都高于 0.900。

如表 4 所示, *E. coli* DH5 α /pMP-CFP、*E. coli* DH5 α /pMP-YFP、*E. coli* DH5 α /pMP-GFP 和 *E. coli* DH5 α /pPNP-AmilCP 方法用于红壤提取液中甲基对硫磷检测时, 检出限分别为 6.51、12.2、6.99、6.78 和 6.21 $\mu\text{g/L}$, 比其用于其他种类土壤中甲基对硫磷检测的检出限低。*E. coli* DH5 α /pMP-AmilCP 方法用于分析 4 种土壤提取

表3 全细胞生物传感器方法用于土壤提取物中甲基对硫磷测定的计算参数

Table 3 Calculation parameters for the detection of methyl parathion in soil extracts by whole-cell biosensor method

Methods	Alfisol		Mollisol		Inceptisol		Ultisol	
	α	R^2	α	R^2	α	R^2	α	R^2
RFP	89.3	0.911	76.2	0.520	80.5	0.792	90.1	0.963
CFP	375	0.520	334	0.203	354	0.298	377	0.810
GFP	335	0.478	278	0.244	309	0.398	389	0.890
YFP	327	0.420	311	0.282	354	0.388	406	0.945
AmiICP	0.380	0.932	0.366	0.960	0.321	0.932	0.299	0.944

RFP, CFP, GFP, YFP, and AmilCP represent *E. coli* DH5 α /pMP-RFP, *E. coli* DH5 α /pMP-CFP, *E. coli* DH5 α /pMP-GFP, *E. coli* DH5 α /pMP-YFP, and *E. coli* DH5 α /pMP-AmilCP method for the detection of methyl parathion in soil extracts, respectively.

表 4 全细胞生物传感器方法用于土壤提取物中甲基对硫磷检测的参数

Table 4 Detection parameters of methyl parathion in soil extracts by whole-cell biosensor method

Methods	Alfisol		Mollisol		Inceptisol		Ultisol	
	DL ($\mu\text{g/L}$)	LR ($\mu\text{g/L}$)	DL ($\mu\text{g/L}$)	LR ($\mu\text{g/L}$)	DL ($\mu\text{g/L}$)	LR ($\mu\text{g/L}$)	DL ($\mu\text{g/L}$)	LR ($\mu\text{g/L}$)
RFP	12.70	25–7 500	19.80	50–10 000	19.70	25–1 0000	6.5	10–10 000
CFP	139.00	250–2 500	198.00	500–2 500	177.00	250–1 000	12.2	25–10 000
GFP	159.00	50–10 000	187.00	500–5 000	165.00	50–2 500	7.0	25–10 000
YFP	165.00	75–10 000	181.00	500–2 500	169.00	50–7 500	6.8	10–10 000
AmilCP	6.28	10–10 000	6.66	10–10 000	6.37	10–10 000	6.2	10–10 000

RFP, CFP, GFP, YFP, and AmilCP represent *E. coli* DH5 α /pMP-RFP, *E. coli* DH5 α /pMP-CFP, *E. coli* DH5 α /pMP-GFP, *E. coli* DH5 α /pMP-YFP, and *E. coli* DH5 α /pMP-AmilCP method for the detection of methyl parathion in soil extracts, respectively. DL and LR are the detection limit and linear range, respectively.

液中甲基对硫磷的检出限都低于 6.66 $\mu\text{g/L}$ 。*E. coli* DH5 α /pMP-CFP、*E. coli* DH5 α /pMP-YFP、*E. coli* DH5 α /pMP-GFP 方法用于分析黄棕壤、黑土和紫土提取液中甲基对硫磷的检出限都高于 139 $\mu\text{g/L}$ 。*E. coli* DH5 α /pMP-AmilCP 方法应用黄棕壤、黑土、紫土和红壤土壤提取液中甲基对硫磷检测的线性范围都为 10–10 000 $\mu\text{g/L}$ 。*E. coli* DH5 α /pMP-RFP 和 *E. coli* DH5 α /pMP-AmilCP 方法比其他 3 种生物传感器方法的线性范围宽。上述试验结果表明, *E. coli* DH5 α /pMP-RFP 和 *E. coli* DH5 α /pMP-AmilCP 构建的检测方法具有较低的检出限和较宽的线性范围。

2.4 新型生物传感器检测真实土壤样品中甲基对硫磷

为了评估新建立的全细胞生物传感器方法对土壤中甲基对硫磷检测的适用性, 使用 *E. coli* DH5 α /pMP-RFP、*E. coli* DH5 α /pMP-CFP、*E. coli* DH5 α /pMP-GFP、*E. coli* DH5 α /pMP-YFP 和 *E. coli* DH5 α /pMP-AmilCP 方法分析 10 个黄棕壤测试样品(S₁–S₁₀)提取液中甲基对硫磷浓度。如表 5 所示, *E. coli* DH5 α /pMP-CFP、*E. coli* DH5 α /pMP-GFP、*E. coli* DH5 α /pMP-YFP 未检出 S₁、S₂、S₅、S₆、S₇ 和 S₈ 土壤中甲基对硫磷的含量, 这可能与土壤中甲基对硫磷的浓度低于这 3 种全细胞生物传感器的检出限有关。*E. coli* DH5 α /

pMP-RFP 和 *E. coli* DH5 α /pMP-AmilCP 方法可检测到 10 个黄棕壤测试样品中甲基对硫磷的实际含量, 且两种方法的检测值相近。例如, *E. coli* DH5 α /pMP-RFP、*E. coli* DH5 α /pMP-CFP、*E. coli* DH5 α /pMP-GFP、*E. coli* DH5 α /pMP-YFP 和 *E. coli* DH5 α /pMP-AmilCP 方法对 S₃ 土壤中甲基对硫磷的浓度检测值分别为 1.87、3.88、3.16、2.45 和 1.93 mg/L。*E. coli* DH5 α /pMP-CFP、*E. coli* DH5 α /pMP-GFP 和 *E. coli* DH5 α /pMP-YFP 方法的检测值显著高于其他 2 种全细胞生物传感器方法的检测值。这 5 种全细胞生物传感器在分析 S₄、S₉ 和 S₁₀ 土壤样品时也存在同样的情况。

使用 5 种全细胞生物传感器对 10 个黑土测试样品(S₁₁–S₂₀)提取液中甲基对硫磷浓度进行检测。结果如表 5 所示, 5 种全细胞生物传感器都能检出 S₁₅、S₁₇ 和 S₁₈, 但其数值存在差异。例如, *E. coli* DH5 α /pMP-RFP、*E. coli* DH5 α /pMP-CFP、*E. coli* DH5 α /pMP-GFP、*E. coli* DH5 α /pMP-YFP 和 *E. coli* DH5 α /pMP-AmilCP 的方法检测 S₁₅ 土壤中甲基对硫磷的浓度分别为 1.230、1.980、1.850、1.990 和 1.320 mg/L。*E. coli* DH5 α /pMP-RFP 和 *E. coli* DH5 α /pMP-AmilCP 的检测值相近, 且都低于其他 3 种全细胞生物传感器的检测值, 在分析 S₁₇ 和 S₁₈ 土壤样品时也存在同样的情况。

3 讨论与结论

全细胞生物传感器是研究环境中污染物与微生物互作机制的强有力工具,可以判断目标污染物在复杂环境介质中生物有效性的强弱^[3-4]。小型全细胞生物传感器(以 *E. coli* 为载体)的一个优势是它们可以穿梭于微小环境中,对复杂环境中目标污染物进行追踪和指示^[3],这是传统化学分析无法直接做到的^[32]。

此外,与此前建立的对硝基酚的全细胞生物传感器相比^[21],该研究中构建的全细胞生物传感器存在诸多优势。本研究建立了 5 种全新的全细胞生物传感器,不仅可以检测甲基对硫磷,在保证甲基对硫磷水解酶基因 *mpd* 的表达沉默时,也具备特异性指示对硝基酚的能力。由于该研究中构建的生物传感器的应答机制较为复杂,引入一些代表性高的拷贝型质粒(pUC19、pBR322)和表达型质粒(pET21a)进行了比较研究。在此前的研究中,多采用拷贝型质粒 pUC19 作为全细胞生物传感器中功能性质粒的骨架^[29,33-34]。也尝试使用表达型质粒 pET28a 作为质粒骨架用于新型全细胞生物传感器构建^[21,35],进一步的研究发现,使用表达型质粒构建的新型全细胞生物传感器,在长时间保存时会出现功能性质粒的大量丢失和检测性能显著降低等现象^[35]。一些水解酶基因对不同类型质粒具有一定选择性,且其表达性能上有差异^[23]。

另外,本研究还对所涉及的全细胞生物传感器检测流程(制备和检测)进行了诸多优化。在全细胞生物传感器的制备阶段,使用了新筛选出的 *mpd* 基因和 pUC19 质粒骨架,增强了全细胞生物传感器分析甲基对硫磷浓度的可靠。此外,全细胞生物传感器的构建使用了多种报告基因(荧光蛋白和色蛋白),这不仅提高了全细胞生物传感器抵抗其检测环境中荧光和紫光信号干扰的能力,也为检测其他环境基质提供了多种

选择。敏化全细胞生物传感器的制备流程与商业化的 *E. coli* DH5 α 感受态细胞类似,这有利于生物传感器的大规模生产和便捷应用。在全细胞生物传感器的检测阶段,细胞活化和样品提取可以在较短的时间内完成(0.5 h),这远远小于化学检测中固相萃取的时间(>2 h),并且可以批量化分析样品(一次 96 个或更多),检测全程耗时 5 h^[36]。该检测方法的计算公式相对简单,结果分析可在比较短的时间内完成。

全细胞生物传感器使用的宿主细胞(*E. coli*)对生存条件要求较为宽泛,可以在 pH 值 4.00–8.50 和盐浓度 0–0.55 mol/L 范围内的环境中存活^[37]。这都为新研制的全细胞生物传感器在我国典型农田土壤(黄棕壤、黑土、红壤和紫土)中的稳定应用提供保证。以检测性能最佳 *E. coli* DH5 α /pMP-AmilCP 为例,其检测土壤提取液中甲基对硫磷的检测限为 6.21–6.66 $\mu\text{g/L}$,线性范围为 10–10 000 $\mu\text{g/L}$,足够满足土壤污染检测需要^[38]。

综上所述,这种新型全细胞生物传感器方法简单、成本低、检测速度相对较快,可用于检测甲基对硫磷,并可用于评估土壤中甲基对硫磷的生物有效性的强弱。与其他 3 种生物传感器方法相比,*E. coli* DH5 α /pMP-RFP 和 *E. coli* DH5 α /pMP-AmilCP 这 2 种生物传感器在检测土壤提取液样品中甲基对硫磷时,表现出更低的检出限和更广的线性范围,检测稳定性更高。使用全细胞生物传感器对土壤环境中有机磷农药甲基对硫磷检测的研究,有助于掌握甲基对硫磷在土壤中生物有效性强弱及危害情况,为防治土壤中甲基对硫磷的污染危害提供了一种新的检测手段。

致谢

感谢江苏省农科院的陆超博士帮助本研究采集了部分土壤样品。

REFERENCES

- [1] CIOFFI A, MANCINI M, GIOIA V, CINTI S. Office paper-based electrochemical strips for organophosphorus pesticide monitoring in agricultural soil[J]. *Environmental Science & Technology*, 2021, 55(13): 8859-8865.
- [2] LI JW, ZHANG XY, WU H, BAI YP. Transcription factor engineering for high-throughput strain evolution and organic acid bioproduction: a review[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 98.
- [3] WANG BY, ZHANG YJ, ZHU DQ, LI H. Assessment of bioavailability of biochar-sorbed tetracycline to *Escherichia coli* for activation of antibiotic resistance genes[J]. *Environmental Science & Technology*, 2020, 54(20): 12920-12928.
- [4] CHEN ZY, ZHANG W, WANG G, ZHANG YJ, GAO YZ, BOYD SA, TEPPEN BJ, TIEDJE JM, ZHU DQ, LI H. Bioavailability of soil-sorbed tetracycline to *Escherichia coli* under unsaturated conditions[J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(11): 6165-6173.
- [5] AW R, POLIZZI KM. Biosensor-assisted engineering of a high-yield *Pichia pastoris* cell-free protein synthesis platform[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2019, 116(3): 656-666.
- [6] CHEN YF, YANG YJ, WANG Y, PENG Y, NIE JM, GAO GY, ZHI JF. Development of an *Escherichia coli*-based electrochemical biosensor for mycotoxin toxicity detection[J]. *Bioelectrochemistry*, 2020, 133: 107453.
- [7] HANSEN LH, FERRARI B, SØRENSEN AH, VEAL D, SØRENSEN SJ. Detection of oxytetracycline production by *Streptomyces rimosus* soil microcosms by combining whole-cell biosensors and flow cytometry[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(1): 239-244.
- [8] ROGERS JK, CHURCH GM. Genetically encoded sensors enable real-time observation of metabolite production[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(9): 2388-2393.
- [9] LIU JJ, LI JH, SHIN HD, LIU L, DU GC, CHEN J. Protein and metabolic engineering for the production of organic acids[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 239: 412-421.
- [10] THOMPSON MG, COSTELLO Z, HUMMEL NFC, CRUZ-MORALES P, BLAKE-HEDGES JM, KRISHNA RN, SKYRUD W, PEARSON AN, INCHA MR, SHIH PM, GARCIA-MARTIN H, KEASLING JD. Robust characterization of two distinct glutarate sensing transcription factors of *Pseudomonas putida* L-lysine metabolism[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(10): 2385-2396.
- [11] RAMAN S, ROGERS JK, TAYLOR ND, CHURCH GM. Evolution-guided optimization of biosynthetic pathways[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(50): 17803-17808.
- [12] EGGELING L, BOTT M, MARIENHAGEN J. Novel screening methods: biosensors[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2015, 35: 30-36.
- [13] 张莉鸽, 王伟伟, 胡海洋, 许平, 唐鸿志. 合成生物学在环境有害物监测及生物控制中的应用[J]. *生物产业技术*, 2019(1): 67-74.
- [14] ZHANG LG, WANG WW, HU HY, XU P, TANG HZ. Application of synthetic biology in environmental hazard monitoring and biocontainment[J]. *Biotechnology & Business*, 2019(1): 67-74 (in Chinese).
- [15] YANG JJ, YANG C, JIANG H, QIAO CL. Overexpression of methyl parathion hydrolase and its application in detoxification of organophosphates[J]. *Biodegradation*, 2008, 19(6): 831-839.
- [16] CUI ZL, LI SP, FU GP. Isolation of methyl parathion-degrading strain M6 and cloning of the methyl parathion hydrolase gene[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(10): 4922-4925.
- [17] CHONG HQ, CHING CB. Development of colorimetric-based whole-cell biosensor for organophosphorus compounds by engineering transcription regulator DmpR[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(11): 1290-1298.
- [18] PARK SM, PARK HH, LIM WK, SHIN HJ. A new variant activator involved in the degradation of phenolic compounds from a strain of *Pseudomonas putida*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2003, 103(3): 227-236.
- [19] HERRERA MC, DUQUE E, RODRÁ-GUEZ-HERVA JJ, FERNÁNDEZ-ESCAMILLA AM, RAMOS JL. Identification and characterization of the PhhR regulon in *Pseudomonas putida*[J]. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(6): 1427-1438.
- [20] LIU FY, HONG MZ, LIU DM, LI YW, SHOU PS, YAN H, SHI GQ. Biodegradation of methyl parathion by *Acinetobacter radioresistens* USTB-04[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2007, 19(10): 1257-1260.
- [21] ALVARENGA N, BIROLI WG, SELEGHIM MHR.

- PORTO ALM. Biodegradation of methyl parathion by whole cells of marine-derived fungi *Aspergillus sydowii* and *Penicillium decaturense*[J]. Chemosphere, 2014, 117: 47-52.
- [21] MA Z, LI YB, LU ZY, PAN J, LI M. A novel biosensor-based method for the detection of p-nitrophenol in agricultural soil[J]. Chemosphere, 2023, 313: 137306.
- [22] YU H, CHEN ZY, WANG N, YU SZ, YAN YJ, HUO YX. Engineering transcription factor BmoR for screening butanol overproducers[J]. Metabolic Engineering, 2019, 56: 28-38.
- [23] HEYKEL T, MATHILDE K, JEAN-LOUP F. Building a minimal and generalizable model of transcription factor-based biosensors: showcasing flavonoids[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2018, 115(9): 2292-2304.
- [24] FUENTES M, GONZÁLEZ-GAITANO G, GARCÍA-MINA JM. The usefulness of UV-visible and fluorescence spectroscopies to study the chemical nature of humic substances from soils and composts[J]. Organic Geochemistry, 2006, 37(12): 1949-1959.
- [25] FU GP, CUI ZL, HUANG TT, LI SP. Expression, purification, and characterization of a novel methyl parathion hydrolase[J]. Protein Expression and Purification, 2004, 36(2): 170-176.
- [26] HUANG G, OUYANG J, BAEYENS WRG, YANG YP, TAO CJ. High-performance liquid chromatographic assay of dichlorvos, isocarbophos and methyl parathion from plant leaves using chemiluminescence detection[J]. Analytica Chimica Acta, 2002, 474(1): 21-29.
- [27] VIROLAINEN NE, PIKKEMAAT MG, ALEXANDER ELFERINK JW, KARP MT. Rapid detection of tetracyclines and their 4-epimer derivatives from poultry meat with bioluminescent biosensor bacteria[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(23): 11065-11070.
- [28] ALATOSSAVA T, JÜTTE H, KUHN A, KELLENBERGER E. Manipulation of intracellular magnesium content in polymyxin B nonapeptide-sensitized *Escherichia coli* by ionophore A23187[J]. Journal of Bacteriology, 1985, 162(1): 413-419.
- [29] MA Z, LIU J, LI H, ZHANG W, WILLIAMS MA, GAO YZ, GUDDA FO, LU C, YANG B, WAIGI MG. A fast and easily parallelizable biosensor method for measuring extractable tetracyclines in soils[J]. Environmental Science & Technology, 2020, 54(2): 758-767.
- [30] INOUE S, TSUJI FI. Aequorea green fluorescent protein: expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein[J]. FEBS Letters, 1994, 341(2): 277-280.
- [31] JHA RK, KERN TL, KIM Y, TESAR C, JEDRZEJCZAK R, JOACHIMIAK A, STRAUSS CEM. A microbial sensor for organophosphate hydrolysis exploiting an engineered specificity switch in a transcription factor[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(17): 8490-8500.
- [32] ZHANG YJ, BOYD SA, TEPPEN BJ, TIEDJE JM, LI H. Role of tetracycline speciation in the bioavailability to *Escherichia coli* for uptake and expression of antibiotic resistance[J]. Environmental Science & Technology, 2014, 48(9): 4893-4900.
- [33] HAMSCHER G, SCZESNY S, HÖPER H, NAU H. Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. Analytical Chemistry, 2002, 74(7): 1509-1518.
- [34] KORPELA MT, KURITTU JS, KARVINEN JT, KARP MT. A recombinant *Escherichia coli* sensor strain for the detection of tetracyclines[J]. Analytical Chemistry, 1998, 70(21): 4457-4462.
- [35] MA Z, LIU J, SALLACH JB, HU XJ, GAO YZ. Whole-cell paper strip biosensors to semi-quantify tetracycline antibiotics in environmental matrices[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2020, 168: 112528.
- [36] SHI YF, ZHANG Y, DU YM, KONG DG, WU QH, HONG YG, WANG Y, TAM NFY, LEUNG JYS. Occurrence, composition and biological risk of organophosphate esters (OPEs) in water of the Pearl River estuary, south China[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2020, 27(13): 14852-14862.
- [37] STENZLER B, HINZ A, RUUSKANEN M, POULAIN AJ. Ionic strength differentially affects the bioavailability of neutral and negatively charged inorganic Hg complexes[J]. Environmental Science & Technology, 2017, 51(17): 9653-9662.
- [38] KOVACIC P, SOMANATHAN R. Nitroaromatic compounds: environmental toxicity, carcinogenicity, mutagenicity, therapy and mechanism[J]. Journal of Applied Toxicology, 2014, 34(8): 810-824.

(本文责编 陈宏宇)