

基于大肠杆菌的 CellSense 生物传感器毒性分析性能研究

王学江, 王虹, 赵建夫, 夏四清, 赵红宁

(同济大学环境科学与工程学院, 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 上海 200092)

摘要:采用聚碳酸酯膜直接固定法制备并优化了大肠杆菌(*E. coli* Top10)CellSense 生物传感器微生物电极, 探讨了其在重金属和有机污染物生物急性毒性分析中的应用性能。结果表明, 基于对数生长期和稳定期 *E. coli* 微生物电极的 CellSense 生物传感器具有良好的毒性分析性能, 基于衰减期 *E. coli* 菌株的 CellSense 生物传感器毒性分析的稳定性和灵敏度降低; CellSense 生物传感器测试得 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、邻氯苯酚和对硝基苯酚对 *E. coli* 的 EC_{50} 分别为 0.6、3.1、5.8、180 和 94 $\mu\text{g/mL}$, 制备的 *E. coli* 微生物电极在冰箱中 4℃ 保存 2 个月, 仍能很好地满足毒性分析的需要。

关键词:微生物传感器; 大肠杆菌; 毒性; 重金属

中图分类号: X83 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)04-1210-05

Acute Toxicity Analysis Performance of CellSense Biosensor with *E. coli*

WANG Xue-jiang, WANG Hong, ZHAO Jian-fu, XIA Si-qing, ZHAO Hong-ning

(State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, College of Environmental Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract: *E. coli* microbial electrodes for CellSense biosensor were prepared by polycarbonate membrane immobilization process, and their performance for heavy metals and toxic organic compounds acute toxicity determination were studied. The results showed that when *E. coli* was in logarithmic and stationary phase, the CellSense biosensor with *E. coli* showed good performance in heavy metal ions and organic pollutants acute toxicity analysis, when *E. coli* was in its decline phase, the stability and sensitivity of the CellSense biosensor was poor. The EC_{50} values of Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , *o*-chlorophenol (2-CP) and *p*-nitrophenol (4-NP) detected by CellSense biosensor with *E. coli* were 0.6, 3.1, 5.8, 180 and 94 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The immobilized *E. coli* electrodes could still suit for acute toxicity assessment after 2 months storage at 4℃.

Key words: microbial biosensor; *E. coli*; toxicity; heavy metal

随着现代工业的迅速发展,越来越多的有毒化学物质通过生产和使用进入到水体,对水环境造成日益严重的污染^[1]。到目前为止,环境污染物的测定主要有理化分析方法和生物学方法^[2]。传统的理化分析方法能定量分析污染物中主要成分的含量,但不能直接、全面地反映各种有毒物质对环境的综合影响^[3~5];早期的生物毒性评价一般采用向哺乳动物如鼠类口服毒物,然后观察实验动物在1 h内的半致死量,由于该评价方法耗时长,操作复杂,不能快速反映被测物质的毒性^[6~8]。

近年来,以微生物为受试体的生物传感器毒性分析技术因其快速、在线、灵敏和经济等特点得以迅速发展。目前,国内外已研究开发出 Microtox[®]、ToxAlert[®]、CellSense 和生物活性测定仪(呼吸仪)等快速毒性分析系统,在环境监测领域得到广泛应用^[9~14]。

本研究针对 CellSense 生物传感器存在的商品化微生物电极价格较高和保存时间有限等不足^[15, 16],采用聚碳酸酯膜直接固定法制备并优化了

大肠杆菌(*E. coli* Top10)微生物电极,探讨了其在 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 等重金属离子和 2-CP、4-NP 等毒性有机污染物急性毒性分析中的应用性能,以期 CellSense 生物传感器在我国环境监测中的推广应用提供基础。

1 材料与方法

1.1 CellSense 生物传感器毒性分析系统

CellSense 生物传感器分析系统(英国 Eurolon 公司)是一种基于氧化还原介质的全细胞电流型微生物传感器。它的工作原理是:固定于传感器工作电极表面微生物的呼吸作用产生的电子通过氧化还原介质作用,实现其在微生物细胞和电极表面之间的传递,从而形成生物电流信号被系统以检测出来。当毒性污染物存在时,微生物细胞呼吸作用因受到毒性

收稿日期: 2008-05-08; 修订日期: 2008-06-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(20707014); 教育部留学回国人员科研启动基金项目

作者简介: 王学江(1974~), 男, 博士, 副教授, 主要研究方向为水污染控制与生物传感器环境监测技术, E-mail: wangxj@mail.tongji.edu.cn

抑制作用,从而表现为电流强度的变化,根据待测污染物对生物电流影响的程度来判断毒性的强弱,采用的评价指标为半数有效浓度(50% effective concentration, EC_{50}).它可通过选择固定特定敏感指示微生物对不同污染物(污染源)的毒性做出评价,具有便携、灵敏、快速和在线分析等特点. CellSense 生物传感器工作原理示意和微生物电极见图 1.

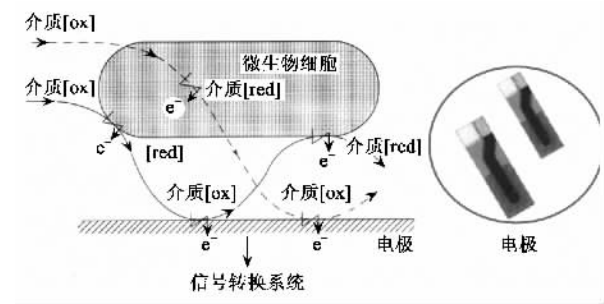


图 1 CellSense 生物传感器工作原理及电极
Fig.1 Principle of CellSense biosensor and electrodes

1.2 微生物生长曲线绘制

用接种环取定量 *E. coli* Top10 纯菌株(同济大学生物研究中心提供),接种至装有 50 mL LB 培养基溶液的 150 mL 三角瓶中,在恒温摇床中 30℃, 150 r/min 转速条件下培养 24 h,按 0.2% 的接种量将培养液再次接种到 50 mL LB 培养液中进行菌体培养,定时取样测定 D_{600} 的变化.

1.3 微生物电极制备

取一定量 *E. coli* Top10 纯菌株接种于 200 mL 培养基溶液中,在恒温摇床中 30℃, 150 r/min 转速条件下培养 24 h 后,在 5 000 r/min 下离心 30 min,用 0.85% 氯化钠溶液洗涤菌体 3 次,在 10 000 r/min 下离心 5min,得到湿菌体,保存于冰箱(−40℃)待用.

取 0.5 g 上述湿菌体,加入 200 μ L 0.85% 氯化钠溶液,用灭菌牙签将菌体和水溶液搅匀,用移液枪汲取 7 μ L 均匀涂于电极工作区域表面,室温晾干;用双面胶纸(3M 公司)将聚碳酸酯膜(孔径 0.4 μ m, Whatman)密封在菌体表面,制得微生物电极,置于冰箱 4℃ 保存.

1.4 测定步骤

将上述制得的微生物电极放置于含 0.85% NaCl 的呼吸基质中活化 30 min,将经活化的微生物电极浸入装有 10 mL 呼吸基质的平底玻璃瓶中,待 CellSense 生物传感器毒性分析系统稳定 5 ~ 10 min 后,加入一定量 *p*-苯醌氧化还原介质(图 2 中 a 处),待电信号稳定约 15 min,加入不同浓度待测样品进

行毒性测试(图 2 中 b 处).此过程中,CellSense 生物传感器计算系统将自动记录微生物电极输出电流的变化曲线(见图 2).根据电流抑制曲线,可计算出不同浓度梯度对应的抑制率大小.

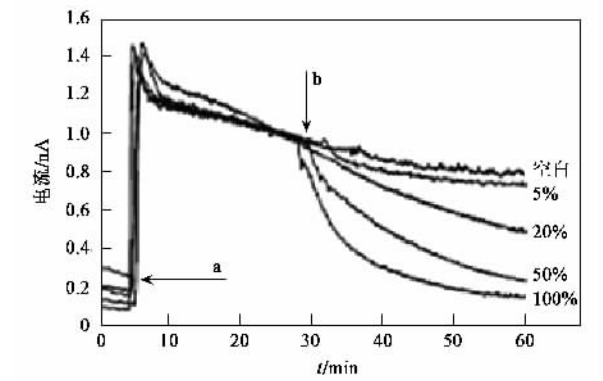


图 2 CellSense 生物传感器毒性分析电流抑制曲线示意
Fig.2 Typical toxicity analysis current curves of CellSense biosensor

毒理学指标 EC_{50} 值通过基于米门方程的双曲线函数拟合进行计算,抑制率和抑制物质浓度之间关系表达式如公式(1)所示.

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot c}{k + c}$$

(1)

式(1)中, μ 为抑制率, $\mu_{\max}$ 为估算所得的最大抑制率, k 为常数, c 为抑制污染物浓度.

2 结果与分析

2.1 不同培养周期的大肠杆菌对 CellSense 生物传感器毒性测试的影响

图 3 为 *E. coli* Top10 在 LB 培养基溶液中的生长曲线.从中可以看出,培养时间在 4 ~ 16 h 范围内,大肠杆菌的生长以几何级数增加,处于细菌生长周期的对数期;16 ~ 24 h 期间,细菌 D_{600} 变化很小,大肠杆菌的生长速度变得很缓慢,处于对数生长后期或稳定期;24 h 后,细菌 D_{600} 值呈逐渐下降趋势,大肠杆菌的生长进入衰减期.

试验取 12、24 和 48 h 3 个不同培养时间的 *E. coli* 菌体,采用聚碳酸酯膜直接固定法制备 *E. coli* 微生物电极,分别用于 Cu^{2+} 的毒性分析,所得的 Cu^{2+} 对 *E. coli* 的活性抑制曲线如图 4 所示.

由图 4 可以看出,*E. coli* 培养周期为 12 h 和 24 h 时制备的 CellSense 生物传感器对 Cu^{2+} 的急性毒性响应较为接近,*E. coli* 培养周期增加到 48 h 时,制备的 CellSense 生物传感器的毒性分析灵敏性明显下降.由此可见,*E. coli* 处于对数生长期和稳定期

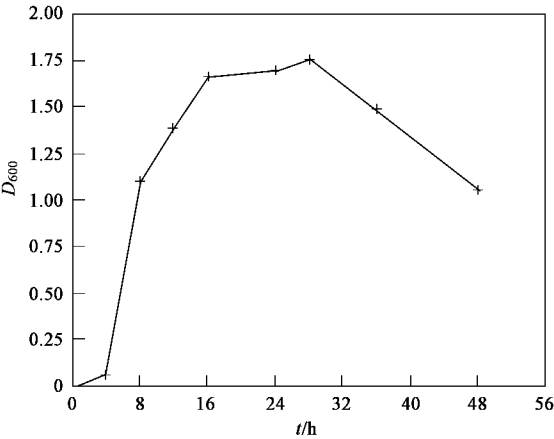


图 3 大肠杆菌生长曲线
Fig.3 Grown curve of *E. coli*

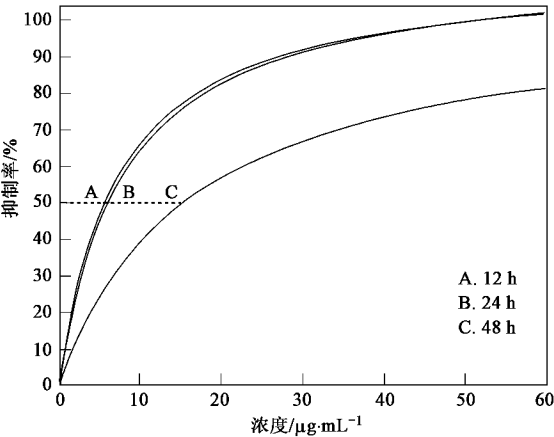


图 4 不同培养周期的 *E. coli* 对 CellSense 生物传感器分析的影响
Fig.4 Effect of *E. coli* at different cultivation periods on the performance of CellSense biosensor

时,其对金属离子具有良好毒性敏感性,而处于衰减期时,随着细胞活性的减弱,其对污染物的毒性敏感性下降.

试验同时考察了微生物不同生长阶段对 CellSense 生物传感器响应的影响.研究发现, *E. coli* 培养周期为 12 h 和 24 h 时制备的 CellSense 生物传感器的初始电流(加入氧化还原介质时的稳定电流)均在 200 nA 以上,而培养周期为 48 h 时 *E. coli* 的初始电流仅为 65~70 nA,同时,检测出电流响应曲线平滑度明显降低,常出现数值波动(图略).另外,培养周期为 24 h 时,获得的 *E. coli* 菌体量较高.因此,本试验选取培养周期为 24 h 的 *E. coli* 用于 CellSense 生物传感器微生物电极的制备.

2.2 金属离子毒性分析

试验考察了上述制备的 *E. coli* 微生物电极在 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 等重金属离子毒性分析中的应用性能.基于 *E. coli* 微生物电极的 CellSense 生物传感器测得的上述重金属离子对 *E. coli* 活性抑制电流曲线见图 5.

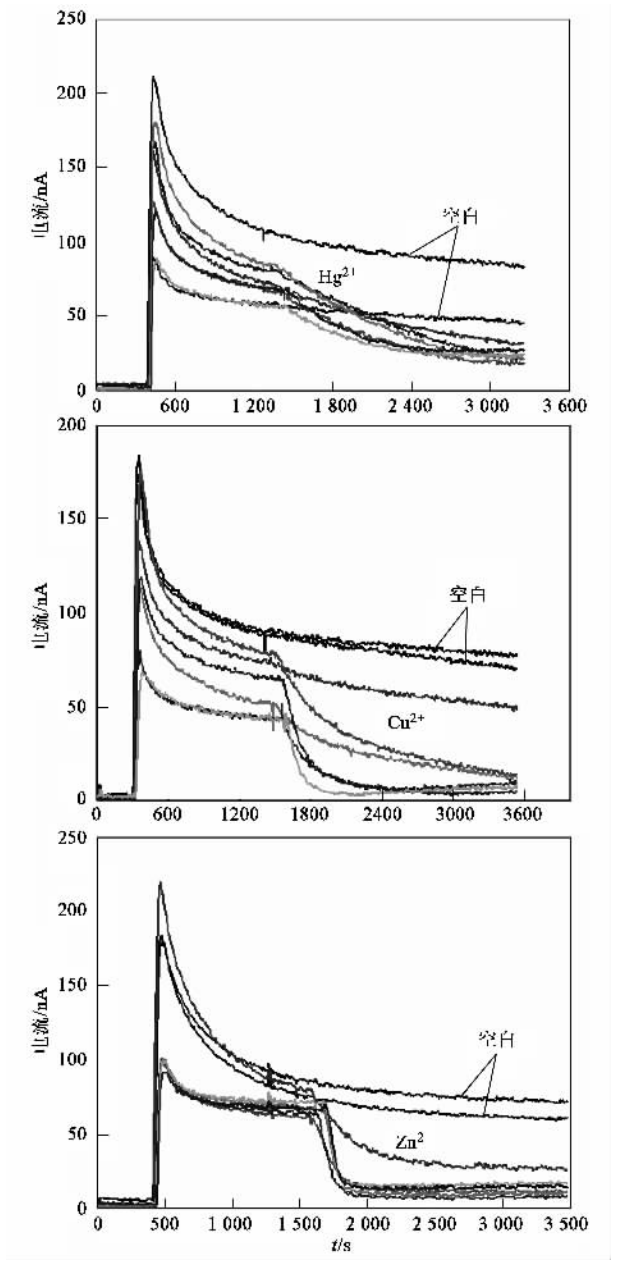


图 5 基于 *E. coli* 的 CellSense 生物传感器对 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 的毒性分析
Fig.5 Toxicity determination of Hg^{2+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} by CellSense biosensor with *E. coli*

由图 5 可以看出,基于该 *E. coli* 微生物电极的 CellSense 生物传感器对 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 具备良好的毒性分析性能,微生物抑制电流信号呈现双曲线下下降趋势,电流受到抑制程度随着金属离子浓度增

加而增大,计算得 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 金属离子对 *E. coli* 的 EC_{50} 值见表 1. Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 这 3 种金属离子对 *E. coli* 的毒性强弱顺序为 $\text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$, 这与基于其它毒性分析方法所得出毒性分析结果相同^[17].

表 1 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 的 EC_{50} 值

Table 1 EC_{50} values of Hg^{2+} , Cu^{2+} and Zn^{2+}

金属离子	拟合方程	EC_{50} $/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	R^2	检测限 $/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
Hg^{2+}	$y = 86.2x / (0.429 + x)$	0.6	0.994 3	< 0.5
Cu^{2+}	$y = 107x / (3.50 + x)$	3.1	0.993 9	< 1
Zn^{2+}	$y = 91.6x / (4.84 + x)$	5.8	0.993 7	< 10

2.3 有机物污染物毒性分析

试验考察了上述制备的 *E. coli* 微生物电极在 2-CP 和 4-NP 毒性分析中的应用性能. 基于 *E. coli* 微生物电极的 CellSense 生物传感器测得 2-CP 和 4-NP 对 *E. coli* 活性抑制的电流曲线见图 6. 试验发现, 在 2-CP 的毒性测定过程中, 高浓度的 2-CP 将造成电流在瞬间的激增, 对 2-CP 的毒性计算造成一定影响, 该 CellSense 生物传感器对 4-NP 具有良好毒性分析性能, 抑制电流曲线呈现稳定的下降趋势. 拟合计算可得出 2-CP 和 4-NP 对 *E. coli* 的 EC_{50} 分别为 180 和 $94 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

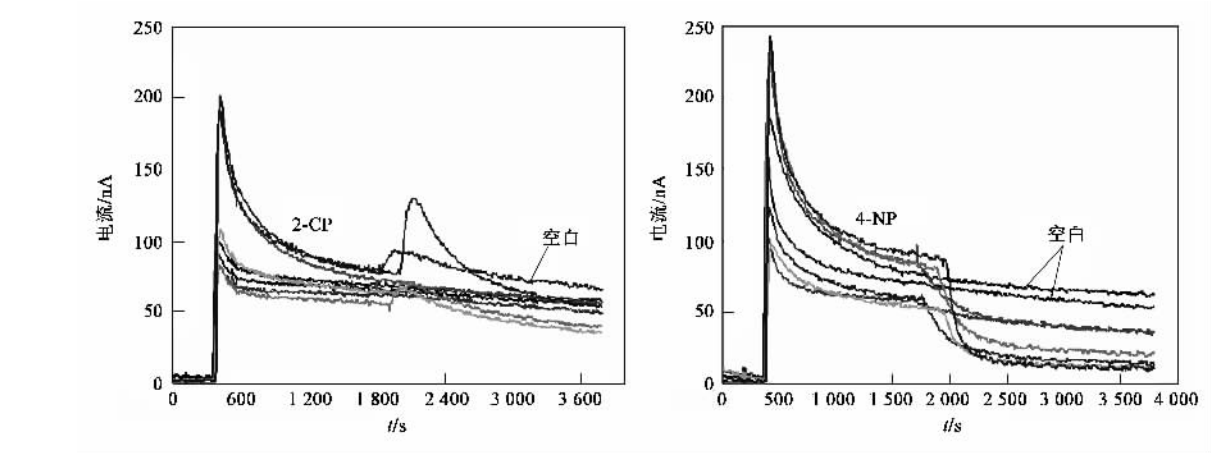


图 6 基于 *E. coli* 的 CellSense 生物传感器对 2-CP 和 4-NP 的毒性分析
Fig.6 Toxicity determination of 2-CP and 4-NP by CellSense biosensor with *E. coli*

2.4 毒性分析重复性

为考察聚碳酸酯膜直接固定法制备的 *E. coli* 微生物电极的毒性分析重复性能, 试验采用同批次制备 *E. coli* 微生物电极进行 Cu^{2+} 的 3 批次平行毒性分析, 试验结果如图 7 所示.

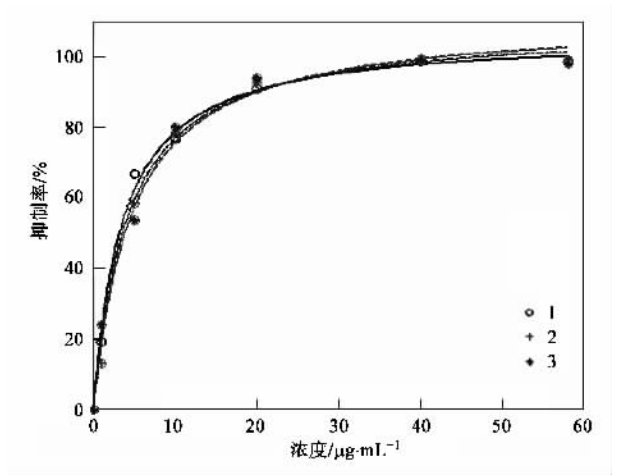


图 7 *E. coli* 型 CellSense 生物传感器的重复性
Fig.7 Reproducibility of CellSense biosensor with *E. coli*

从图 7 可以看出, 基于该 *E. coli* 微生物电极的 CellSense 生物传感器具有良好的重现性. 3 次平行试验所得出 EC_{50} 值分别为 3.1 、 3.8 、 $3.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 相对标准方差仅为 0.35% , 能很好地满足污染物急性毒性测试的需要.

2.5 微生物传感器的长期保存性能

微生物传感器的长期保存性能是影响其推广应用的主要因素, 而在活体细胞的保存过程中, 其活性代谢的变化会对生物传感器的分析性能产生影响, 有可能导致微生物敏感元件的活性有可能降低. 本研究将制备好的 *E. coli* 微生物电极直接保存于 4°C 冰箱内, 每隔一段时间取出一批电极用于 Cu^{2+} 的生物急性毒性分析, 以考察长期保存对其分析性能的影响情况, 结果见图 8.

由图 8 可以看出, 聚碳酸酯膜固定法制备的 *E. coli* 型 CellSense 生物传感器在保存 2 个月时仍然保持着良好的稳定性能, 保存 10、20、30 和 60 d 时所测定得出 Cu^{2+} 的 EC_{50} 值分别为 3.5 、 4.3 、 3.8 和 2.7

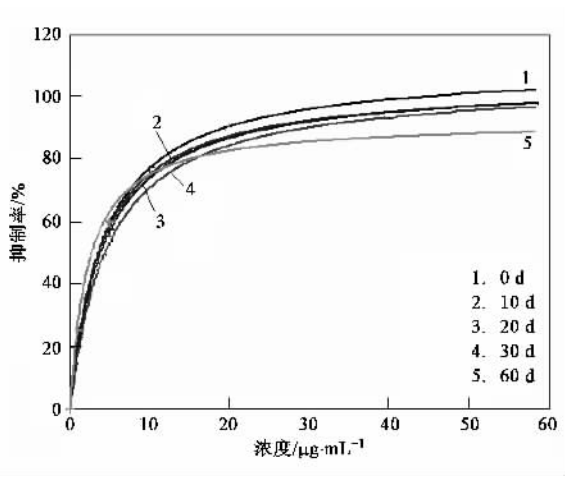


图 8 *E. coli* 微生物电极的长期保存性能
Fig.8 Storage stability of the *E. coli* electrode

$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. *E. coli* 微生物电极良好的保存性能为 CellSense 生物传感器在实际毒性分析中的推广应用提供了良好的基础.

3 结论

(1)基于对数生长期和稳定期 *E. coli* 菌株(培养周期为 12~24 h)的 CellSense 生物传感器具有良好的毒性分析性能,基于衰减期 *E. coli* 菌株(培养周期为 48 h)的 CellSense 生物传感器毒性分析的稳定性和灵敏性降低.

(2)基于聚碳酸酯膜直接固定法的 *E. coli* 微生物电极的 CellSense 生物传感器分析得到 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、2-CP 和 4-NP 对 *E. coli* 的 EC_{50} 分别为 0.6、3.1、5.8、180 和 $94\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

(3)制备的 *E. coli* 型 CellSense 生物传感器具有良好的重复性和长期保存性能,在冰箱 4℃ 保存 2 个月,仍能很好地满足生物毒性分析需要.

参考文献:

[1] 周雯,王连生. 水体有毒有机污染研究[J]. 中国环境监测, 2006, 22(1):91-95.
[2] 孔繁翔. 环境生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000. 138-152.

[3] Belkin S. Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollution [J]. Curr Opin Microbiol, 2003, 6: 206-212.
[4] Bhattacharyya J, Read D, Amos S, et al. Biosensor-based diagnostics of contaminated groundwater: assessment and remediation strategy [J]. Environ Pollut, 2005, 134: 485-492.
[5] De Schampelaere K A C, Forrez I, Dierckens K, et al. Chronic toxicity of dietary copper to *Daphnia magna* [J]. Aquat Toxicol, 2007, 81: 409-418.
[6] De Schampelaere K A C, Canli M, VanLierde V, et al. Reproductive toxicity of dietary zinc to *Daphnia magna* [J]. Aquat Toxicol, 2004, 70: 233-244.
[7] Gikas P, Romanos P. Effects of tri-valent (Cr(III)) and hexa-valent (Cr(VI)) chromium on the growth of activated sludge [J]. J Hazard Mater B, 2006, 133: 212-217.
[8] Kelly C J, Tumsaraj N, Lajoie C. Assessing waste water metal toxicity with bacterial bioluminescence in a bench-scale wastewater treatment system [J]. Water Res, 2004, 38: 423-431.
[9] Ren S J. Assessing wastewater toxicity to activated sludge: recent research and developments [J]. Environ Int, 2004, 30: 1151-1164.
[10] Cristiano V M A, Renato B N, Carla A O, et al. The use of Microtox® to assess toxicity removal of industrial effluents from the industrial district of Camaçari (BA, Brazil) [J]. Chemosphere, 2005, 58: 1277-1281.
[11] Nguyen-Ngoc H, Tran-Minh C. Fluorescent biosensor using whole cells in an inorganic translucent matrix [J]. Anal Chim Acta, 2007, 583(1): 161-165.
[12] dos Santos L F, Defrenne L, Krebs-Brown A. Comparison of three microbial assay procedures for measuring toxicity of chemical compounds: ToxAlert® 10, CellSense and Biolog MT2 microplates [J]. Anal Chim Acta, 2002, 456: 41-54.
[13] Wang H, Wang X J, Zhao J F, et al. Toxicity assessment of heavy metals and organic compounds using CellSense biosensor with *E. coli* [J]. Chin Chem Lett, 2008, 19: 211-214.
[14] 施汉昌,柯细勇,张伟,等. 用快速生物活性测定仪测定活性污泥生物活性的研究[J]. 环境科学, 2004, 25(1): 67-71.
[15] Bhatia R, Dilleen J W, Atkinson A L, et al. Combined physico-chemical and biological sensing in environmental monitoring [J]. Biosens Bioelectron, 2003, 18: 667-674.
[16] Bentley A, Atkinson A, Jezek J, et al. Whole cell biosensors-electrochemical and optical approaches to ecotoxicity testing [J]. Toxicol Vitro, 2001, 15: 469-475.
[17] 池振明. 微生物生态学[M]. 济南: 山东大学出版社, 1979. 98-112.