

检测水中急性毒性污染物的发光细菌光纤传感器的研究

于海¹, 何苗^{1*}, 蔡强², 张理兵²

(1. 清华大学环境科学与工程系, 北京 100084; 2. 清华大学浙江清华长三角研究院, 嘉兴 314050)

摘要: 水中有毒污染物的快速现场监测对于保障水环境安全具有重要意义, 本研究开发了一种快速、灵敏、简便的监测水中污染物急性毒性的光纤生物传感器. 该传感器由固定了明亮发光杆菌的光纤探头构成, 生物发光信号经光纤传输到检测系统. 采用海藻酸钠作为固定化凝胶, 试验了海藻酸钠和 CaCl_2 的浓度、固化时间、pH、保存条件等因素对凝胶和发光细菌的影响. 优化后的传感器制备方法是在光纤探头上, 用 3% 海藻酸钠在 3% CaCl_2 溶液中固定 *Photobacterium phosphoreum* T3 菌 15 min, 制备好的传感器保存于 3% NaCl 溶液中. 应用开发的传感器检测了 Zn^{2+} 、 NH_3 、硝基苯和甲酚 4 种典型污染物的剂量-效应曲线, 通过计算确定了其 EC_{50} 分别为: 5.1、10.2、70.4、77.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. 通过与发光细菌标准方法的比较实验表明, 发光细菌光纤传感器与标准法具有良好相关性, 能反映水中污染物的总毒性. 而传感器由于容易保存和携带, 适合现场监测.

关键词: 发光细菌; 光纤传感器; 毒性; 环境监测

中图分类号: X85 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)02-0375-05

Research of a Bioluminescent Bacterial-Based Optical Fiber Sensor to Detecting Acute Effects of Pollutants in Water

YU Hai¹, HE Miao¹, CAI Qiang², ZHANG Li-bing²

(1. Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 2. Institute of Ecology and Environment, Yangtze Delta Region Institute of Tsinghua University, Jiaxing 314050, China)

Abstract: Field detection of general toxicity is urgent demand in these years, therefore rapid, sensitive, convenient biosensor was studied to detect acute toxicity of water pollutant, which is a novel optical fiber sensor immobilized bioluminescent bacterial, *Photobacterium phosphoreum* T3. This bioluminescence light was measured by light detection system after it coupling to optical fiber. For the activity and bioluminescence of bacterial was seriously affected by immobilizing conditions, optimization of immobilization was studied, including the concentration of Sodium alginate gel and CaCl_2 , immobilizing time, pH, and the preservation time. When the bacteria was immobilized with 3% sodium alginate in 3% CaCl_2 solution for 15 minutes, the bacteria had the best activity, and the immobilized bacteria would maintain its activity for the longest time in the 3% NaCl solution. The dose-response curves of Zn^{2+} , NH_3 , nitrobenzene and cresol are detected, and the EC_{50} are also calculated, which are 5.1, 10.2, 70.4, 77.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The EC_{50} are quite coherent to the results of standard bioluminescent bacteria method. The optical fiber biosensor could be disposable, small sized, convenient operation for field application.

Key words: bioluminescent bacteria; optical fiber; toxicity; environmental monitor

近年来,环境中有毒化学品的生物检测技术逐渐形成了 2 类:一类是分析化学品组分的浓度,另一类是检测和评估化学品对活性生物系统产生的生物效应.后一种生物检测技术对于快速评估水环境的生物安全性具有不可替代的作用^[1].基于微生物毒性效应来评价水中污染物的毒性具有快速和成本低的特点^[2~6],国际标准化组织在 1998 年颁布了发光细菌方法的标准(ISO 11348-1~2-1998),我国也在 1995 年颁布了发光细菌法检测水质急性毒性的标准(GB/T 15441-95),因此近年来发光细菌传感器得到一定的发展^[7].

其中美国的 Oak Ridge 国家实验室和 Tennessee 大学联合研制了基于生物发光的毒性检测芯片,将

琼脂固定的菌膜与电路结合检测^[8,9].以色列和韩国的研究者则采用光纤探头的结构,把发光细菌固定于裸光纤顶端^[10],或将发光细菌固定于连接光纤的套管中^[11].国内一些研究中将发光细菌吸附固定于混合纤维膜上^[12,13],或者包埋于海藻酸钠凝胶中^[14],敏感膜与硅光二极管直接相连.固定化材料,主要有水凝胶^[15]、醋酸纤维素膜等.其中,国外研究者多采用费氏弧菌和重组发光细菌^[16~18]作为敏感生物,与我国普遍采用的明杆发光细菌的生化、毒理

收稿日期: 2007-03-19; 修订日期: 2007-05-19

基金项目: 国家科技支撑计划重点项目(2006BAC19B06); 浙江省科技项目(2006C23069); 嘉兴市科技项目(2006AY2059)

作者简介: 于海(1982~),男,硕士研究生,主要研究方向为环境监测, E-mail: yuhai04@mails.tsinghua.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: hemiao@tsinghua.edu.cn

特性不符合,但是国内研究的敏感细菌膜与光电探测器直接结合的方案,与光纤探头相比,具有成本高、更换和维护不方便等缺点。

因此,本研究采用光纤探头结构、以国标中规定的明杆发光杆菌为敏感物,这样可以避免水样与光电探测器接触,延长其使用寿命,而通过光纤传输信号使传感器与后面的集成光学检测分析系统相分离,便于现场应用。研究发光细菌包埋固定化条件对其活性的影响,分析传感器的动力学过程,试验不同污染物的响应特性,以期开发一次性便携毒性传感器奠定技术基础。

1 材料与方法

1.1 试剂

海藻酸钠、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 NaCl 、 ZnCl_2 、 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、硝基苯、甲酚(均为分析纯)。

细菌菌种为明亮发光杆菌 T3 小种(*Photobacterium phosphoreum* T3)冻干粉(南京土壤所)。培养基(质量浓度):胰蛋白胨(0.5%),酵母浸出汁(0.5%),氯化钠(3%),磷酸氢二钠(0.5%),磷酸二氢钾(0.1%),甘油(0.3%),pH 7.0。取以上液态培养基 100 mL,在 20℃ 下,培养 20~24 h。

1.2 光纤式发光细菌传感器

光纤式发光细菌传感器包括 3 个部分:光纤的预处理、发光细菌的固定化、生物发光的检测。其中,光纤预处理方法为:在光纤的顶端剥离 1 cm 的覆层,露出光纤芯,在 1 mL 离心管的正中心打一直径为 2 mm 的孔,插入光纤,固定光纤的相对位置,使其不会上下移动。

发光细菌固定在海藻酸钠凝胶中,方法如下:将一定量的海藻酸钠溶解在 3% NaCl 溶液中,加热溶解,冷却后按照 1:10 的比例加入培养好的菌液,并混合均匀。之后,将 200 μL 混合液,加入至离心管中,再加入 1 mL CaCl_2 溶液浸没海藻酸钠-细菌混合液,固定一定时间后,菌膜已经形成并附着再离心管底部,吸出 CaCl_2 溶液,利用 3% NaCl 溶液清洗后,保存待用。优化实验中,配制不同浓度的海藻酸钠、 CaCl_2 溶液进行优化实验,同时确定固定时间。以上参数确定后,检测了不同 pH 值对固定化的影响,并确定了固定后菌膜的保存方法。光纤探头置于 2 mL 离心管中,并加入 3% NaCl 溶液在室温保存待用。

生物发光的检测器包括传光光纤、光电器件、数据采集等部分。传光光纤采用直径 1 mm 的塑料光纤,光电倍增管(北京滨松光子技术股份有限公司,

R105)置于不锈钢屏蔽罩中。检测信号经过光电转换和前置放大,进入数据采集模块(USB7310,北京中泰),监控程序采用 LabVIEW(美国 NI 公司)编写。检测器的采样频率 100 Hz,内置 Butterworth 滤波器截止频率 1 Hz。

1.3 毒性检测实验

为评价开发系统对水中有毒污染物的毒性响应特性,研究中选取 Zn^{2+} 、 NH_3 、硝基苯和甲酚 4 种物质作为代表污染物,应用该系统测定分析其剂量-效应关系。首先用去离子水配制不同浓度的待测溶液,其中硝基苯溶液中加入 5% 左右酒精混溶^[19]。检测时将 NaCl 溶液吸出,加入待测溶液,在室温下反应,并利用检测系统实时获得生物发光信号。

2 结果与讨论

2.1 海藻酸钠凝胶固定发光菌的优化实验

发光菌的固定化是传感器开发的关键技术环节。细菌的固定化,其目标是保持菌膜一定的机械强度、性状和相对位置,便于传感器的信号检测,同时需要保证发光细菌的活性,并能进行下一步毒性检测。本研究采用海藻酸钠水凝胶进行固定,主要考察了海藻酸钠和 CaCl_2 的浓度、固定化反应时间、pH 对固定化效果的影响特征。

研究中采用浸渍法固定发光细菌,室温下浸入 CaCl_2 溶液进行交联反应,其中通过 Ca^{2+} 取代 Na^+ 来形成凝胶网络。凝胶逐渐从半流动态到固态,体积略有收缩,15 min 时,凝胶完全失去流动性,并附着于光纤表面,随着反应时间的增加,机械强度进一步增大。通过实验表明由于海藻酸钠固定化过程对该细菌有抑制作用,见图 1。为保持传感器中发光菌的活性,应尽量减少反应时间,因此以下实验的固定时间均为 15 min。

海藻酸钠和 CaCl_2 的浓度比例对于发光细菌活性也有着重要影响。表 1 中为不同海藻酸钠和 CaCl_2 浓度情况下,固定 15 min 后菌膜的相对光强。实验中海藻酸钠浓度分别取 2%、3%、4%, CaCl_2 浓度分别取 1%、3%、7%、10%。研究结果以相对发光强度(RBL)表示。

由表 1 可见,在海藻酸钠浓度为 3% 时,传感器光强是最高的,细菌活性保持最好。这是因为,在海藻酸钠浓度过低时凝胶过稀,这造成了凝胶的孔隙较大, Ca^{2+} 大量进入凝胶深处,抑制了细菌的活性,同时造成了 15 min 后凝胶还具有相当的流动性,会

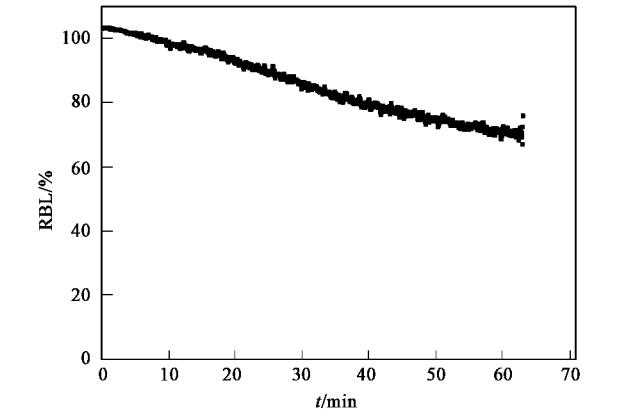


图 1 固定化实验的时间
Fig.1 Time of immobilization

从光纤表面脱落,固定化并不稳定.而当海藻酸钠浓度过高时,凝胶表层太过致密,孔隙减小,导致了物质难以进入凝胶深处,包括氧气,从而也导致了细菌的大量死亡,同时由于凝胶溶液浓度过高,使其流动性下降,细菌也不容易与凝胶溶液混合均匀,同时凝胶的孔隙小也不利于有毒物质的进入,对以后的毒性抑制实验不利.因此在其后的实验中选取海藻酸钠浓度为 3%.

从表 1 中数据还可以得出,随着 CaCl_2 浓度的增加,细胞活性减小,因此需要尽量选取浓度低的 CaCl_2 溶液.但是,当 CaCl_2 浓度过低时,会导致固定化难以完成,在 CaCl_2 浓度为 1% 时,凝胶的流动性均较大,不能稳定地附着在光纤表面.本实验中选择 3% 的 CaCl_2 溶液进行固定化,传感器保持了较高的细胞活性和机械稳定性.

分别取 CaCl_2 溶液的 pH 为 1 ~ 13,固定化 15 min 后检测其细胞活性,其中海藻酸钠浓度为 3%, CaCl_2 浓度为 3%,结果见图 2.其中 pH = 13 的情况下, Ca^{2+} 生成 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 沉淀析出,导致 Ca^{2+} 浓度变化,无法与其它数据进行比较.图 2 中数据为固定后菌膜的相对光强.由图 2 可见,在 pH 为 3 ~ 9 时,pH 对固定化的影响并不大.

表 1 固定化优化实验结果(相对光强)

Table 1 Results of immobilization (RBL)

CaCl_2 浓度 (质量分数)/%	海藻酸钠浓度(质量分数)/%		
	2	3	4
1	81.9	117.7	86.6
3	44.2	96.1	70.0
5	13.5	39.1	11.8
7	2.6	11.8	8.4
10	— ¹⁾	1.5	1.4

1)未测

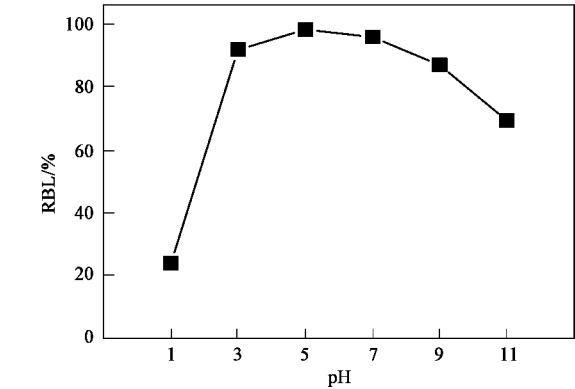


图 2 pH 对固定化的影响
Fig.2 Effection of pH to immobilization

2.2 传感器的保存条件

由于发光细菌活性被抑制后不能恢复,属于一次性传感器,因此保存寿命和保存条件是影响传感器实用化的重要环节.本研究分别进行了在空气、3% NaCl 溶液和去离子水 3 种保存条件的活性维持实验.其保存温度均为室温.结果见图 3,在该细菌最适的生长条件下(3% NaCl),其活性基本维持不变.在其余无论是空气中还是去离子水中其活性均降低较快.在空气中,由于凝胶中水分迅速蒸发,导致凝胶中生境不利于发光细菌生存;而在去离子水中,离子强度不适于该细菌的生长(该发光细菌为海洋细菌),也使活性降低较快.因此本研究中,采用 3% NaCl 条件对固定后的发光细菌进行保存.

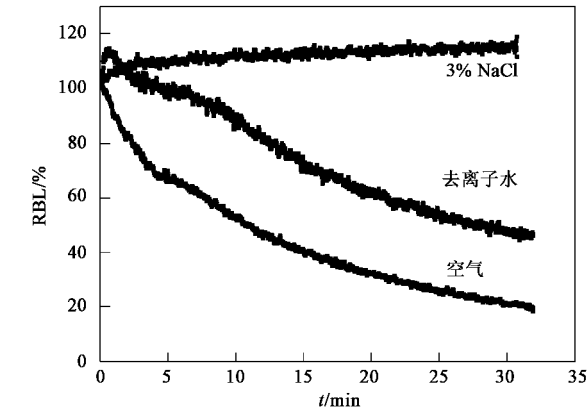


图 3 固定化细菌在不同介质下活性的稳定特性
Fig.3 Stability of the activity of immobilized bacteria under different condition

2.3 发光细菌光纤传感器检测有毒污染物的评价
实验采用开发的传感器与国家的标准方法^[20]检测了 4 种毒性物质 Zn^{2+} 、 NH_3 、硝基苯、甲酚的毒

性响应特征. 利用传感器检测的结果采用 Logistic 模型拟合, 计算出其 EC_{50} 数值, 如图 4~7 所示. EC_{50} 的结果比较见表 2.

表 2 EC_{50} 检测结果比较/ $mg \cdot L^{-1}$
Table 2 Results of EC_{50} test/ $mg \cdot L^{-1}$

项目	Zn^{2+}	NH_3	硝基苯	甲酚
传感器检测结果	5.1	10.2	70.4	77.0
国标方法检测结果	0.34	4.1	25.8	73.2

由表 2 可见, 硝基苯和甲酚的 EC_{50} 大于 Zn^{2+} 和 NH_3 的 EC_{50} 值, 与利用国标法检测结果相比是吻合的. 其中与国标法检测的结果相比, 除 Zn^{2+} 的差距较大外, 其余均在 1 个数量级内. 可见研究中设计的固定化技术, 未影响发光细菌生物活性, 可以用于毒性的检测. 不同物质之间 EC_{50} 的差异, 是由于明杆发光细菌对不同物质的灵敏度不同.

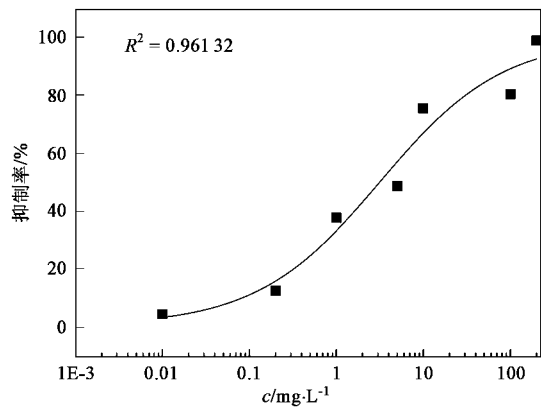


图 4 光纤生物传感器检测 Zn^{2+} 的剂量-效应曲线
Fig.4 Determination of Zn^{2+} by optical biosensor

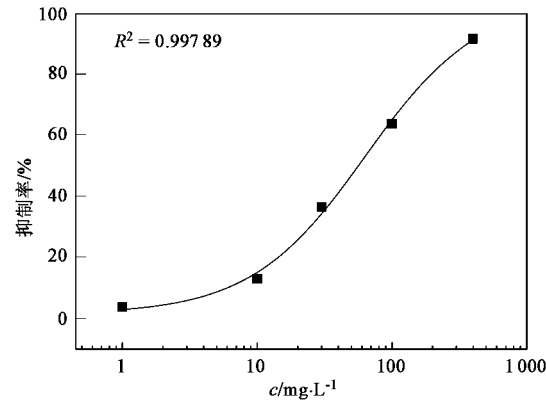


图 5 光纤生物传感器检测硝基苯的剂量-效应曲线
Fig.5 Determination of Nitrobenzene by optical biosensor

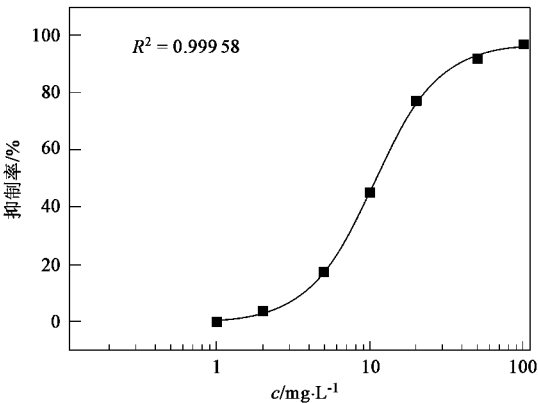


图 6 光纤生物传感器检测 NH_3 的剂量-效应曲线
Fig.6 Determination of NH_3 by optical biosensor

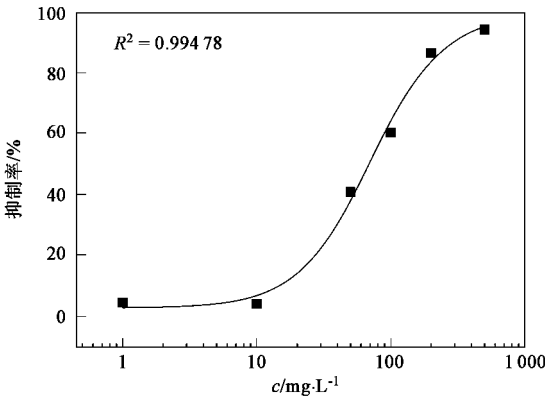


图 7 光纤生物传感器检测甲酚的剂量-效应曲线
Fig.7 Determination of Cresol by optical biosensor

3 结论

本研究将发光细菌固定于光纤表面, 与光电检测系统结合, 开发了一种发光细菌光纤传感器, 用于水中有毒污染物毒性的快速监测和评价. 与标准方法相比具有较好的准确性和灵敏性. 与液态检测相比, 固定化后的发光细菌更易于保存和携带, 实验操作也更为简便, 对于水中急性毒性的野外检测, 具有更广阔的前景, 可以较好地作为毒性预警的一个检测手段.

参考文献:

[1] Philp J C, Balmand S, Hajto E, *et al.* Whole cell immobilised biosensors for toxicity assessment of a wastewater treatment plant treating phenolics-containing waste [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2003, **487**: 61-74.

[2] Lee J H, Gu M B. An integrated mini biosensor system for continuous water toxicity monitoring [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, **20**: 1744-1749.

[3] Horsburgh A M, Mardlin D P, Tumer N L, *et al.* On-line microbial biosensing and fingerprinting of water pollutants [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2002, **17**: 495-501.

[4] Gu M B, Gil G C, Kim J H. A two-stage minibioreactor system for continuous toxicity monitoring [J]. Biosens Bioelectron, 1999, **14**: 355-361.

[5] Gu M B, Gil G C, Kim J H. Enhancing the sensitivity of a two-stage continuous toxicity monitoring system through the manipulation of the dilution rate [J]. Biotechnol, 2002, **93**: 283-288.

[6] Gu M B, Gil G C. A multi-channel continuous toxicity monitoring system using recombinant bioluminescent bacteria for classification of toxicity [J]. Biosens Bioelectron, 2001, **16**: 661-666.

[7] Philp J, French C, Wiles S, *et al.* Wastewater Toxicity Assessment by Whole Cell Biosensor, The Handbook of Environmental Chemistry [M]. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2004. 165-225.

[8] Simpson M L, Sayler G S, Patterson G, *et al.* An integrated CMOS microluminometer for low-level luminescence sensing in the bioluminescent bioreporter integrated circuit [J]. Sensors and Actuators B, 2001, **72**: 134-140.

[9] Simpson M L, Sayler G S, Applegate B M, *et al.* Bioluminescent-bioreporter integrated circuits form novel whole-cell biosensors [J]. Tibtech, 1998, **16**: 332-338.

[10] Polyak B, Bassis E, Novodvoret A, *et al.* Bioluminescent whole cell optical fiber sensor to genotoxicants: system optimization [J]. Sensors and Actuators B, 2001, **74**: 18-26.

[11] Lee H J, Villaume J, David C Cullen, *et al.* Monitoring and classification of PAH toxicity using an immobilized bioluminescent bacteria [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2003, **18**: 571-577.

[12] 黄正,汪亚洲,王家玲.用于污染物毒性检测的细菌发光传感器的研制[J].传感器技术, 1997, **16**(3): 13-16.

[13] 黄正,汪亚洲,王家玲.细菌发光传感器在快速检测污染物急性毒性中的应用[J].环境科学, 1997, **18**(4): 14-16.

[14] 李百祥,王德才,闫鹏.急性毒性发光细菌传感器和急性毒性快速测定仪的研究[J].中国卫生检验杂志, 2002, **12**(4): 397-400.

[15] Fesenko D O, Nasedkina T V, Prokopenko D V, *et al.* Biosensing and monitoring of cell populations using the hydrogel bacterial microchip [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2005, **20**: 1860-1865.

[16] Choi S H, Gu M B. A portable toxicity biosensor using freeze-dried recombinant bioluminescent bacteria [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2002, **17**: 433-440.

[17] Kim B C, Park K S, Kim S D. Evaluation of a high throughput toxicity biosensor and comparison with a *Daphnia magna* bioassay [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2003, **18**: 821-826.

[18] Lee J H, Mitchell R J, Kim B C, *et al.* A cell array biosensor for environmental toxicity analysis, Biosensors and Bioelectronics [J]. 2005, **21**: 500-507.

[19] 董玉瑛,雷炳莉,马静,等.助溶剂对发光菌生物毒性测试的影响[J].化工学报, 2006, **57**(3): 636-639.

[20] GB/T 15441-95, 水质-急性毒性的测定-发光细菌法[S].