

单室 MFC 型生物毒性传感器对重金属离子的检测研究

吴锋^{1,2}, 刘志¹, 周奔³, 周顺桂^{2*}, 饶力群¹, 王跃强²

(1. 湖南农业大学生物科学与技术学院, 长沙 410128; 2. 广东省生态环境与土壤研究所, 广州 510650; 3. 广州市环境保护科学研究院, 广州 510620)

摘要:构建了单室微生物燃料电池 (air-cathode microbial fuel cell, ACMFC) 型生物毒性传感器, 以含重金属离子 (Cd^{2+} 、 Cu^{2+}) 人工配水为检测对象, 分析了有毒物质对检测仪的抑制率与有毒物质浓度的线性关系. 结果表明, ①单室 MFC 型生物毒性传感器结构简单, 操作方便, 灵敏度较高, 可用于水体重金属离子 (Cd^{2+} 、 Cu^{2+}) 生物毒性的快速检测; ②在实验条件下, 该生物毒性传感器检测时间 4 h, 清洗时间 2~10 min, 恢复时间 4 h; ③检测结果显示, 实验室自配 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 及其混合液 IC_{20} 值分别为 0.6、0.8 和 0.25 mg/L, 有毒物质浓度与 MFC 产电量的抑制率呈显著正相关, 相关系数分别为 0.996 0、0.974 4 和 0.990 7.

关键词:微生物燃料电池; 重金属; 生物毒性; 在线检测; 生物传感器

中图分类号: X830.2 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2010)07-1596-05

Development of a Low-cost Single Chamber Microbial Fuel Cell Type BOD Sensor

WU Feng^{1,2}, LIU Zhi¹, ZHOU Ben³, ZHOU Shun-gui², RAO Li-qun¹, WANG Yue-qiang²

(1. College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Guangdong Institute of Eco-Environment and Soil Sciences, Guangzhou 510650, China; 3. Guangzhou Research Institute of Environmental Protection, Guangzhou 510620, China)

Abstract: The principle of the detector is based on the effect of microbial toxicity of water sample on the electricity generation in microbial fuel cell (MFC). The performance of the MFC-type biotoxicity detector was evaluated with the synthetic water containing heavy metals of Cd^{2+} and Cu^{2+} . The experimental results demonstrated that: ① relative to the conventional methods, the MFC-type detector is easy to operate, and suitable for on-line measurements with high sensitivity; ② it only requires 4 h to complete measurements, and can get ready for next measurement within 4 h; ③ there is a significant linear correlation between the concentration of toxic metal(s) and inhibition ratios in Coulombic yields of MFC. As the IC_{20} (concentration causing 20% inhibition) of Cd^{2+} , Cu^{2+} and mixed metals (Cd^{2+} and Cu^{2+}) were 0.6, 0.8 and 0.25 mg/L, the regression coefficients were shown to be 0.996 0, 0.974 4 and 0.990 7.

Key words: microbial fuel cell (MFC); heavy metals; biotoxicity; on-line measurement; biosensor

水质毒性的快速在线检测是水环境质量评价的最重要环节,也是实现水质污染预警、突发毒害物应急处置、污染处理设施在线监控等活动的前提与保障.传统理化分析方法(如 HPLC、GC-MS、LC-MS 等)^[1]能够定量分析水体中有毒物的种类与浓度,但操作过程复杂,无法实时在线监测,而且不能反映各种有毒物质的综合效应.生物毒性检测法采用鱼类、蚤类、藻类、发光细菌、大肠杆菌等作为指示生物^[2~6],通过检测有毒物质对指示生物的运动、生长发育或呼吸活动的抑制效应来评估水质毒性.由于它反映了水质生态毒性的综合结果,因而可为水质的监测和综合评价提供科学依据,得到了迅速发展和广泛应用.然而,传统的生物检测方法存在灵敏度低、检测时间较长、维护成本高、指示生物保存困难的缺陷,因此迫切需要开发快速、简便、灵敏度高、易维护、能实时在线监测的生物毒性检测仪^[1].

微生物燃料电池 (microbial fuel cell, MFC) 是一种以产电微生物为阳极催化剂,将化学能直接转化成电能的装置^[7~10],MFC 中的产电微生物可进行胞外呼吸,它将水体有机污染物生物氧化过程产生的电子直接传递至电极,通过回路形成电流,因而 MFC 具有产电与有机物处置的双重功效.目前,对 MFC 的研究主要集中在微生物产电、废水处理新工艺和微生物传感器开发等方面. Mia 等^[11]率先将 MFC 引入至水质生物毒性的检测,它设计了一个双室型 MFC 为核心组件的 BOD 传感器,结果发现在一定范围内,阳极液中有毒物质种类和浓度与 MFC

收稿日期: 2009-09-02; 修订日期: 2009-10-30

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (2009AA05Z115); 广东省自然科学基金项目 (07006759); 广东省科学院科技创新引导项目 (CX200704)

作者简介: 吴锋 (1982~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为生物化学与分子生物学, E-mail: canboyu@163.com

* 通讯联系人, E-mail: sgzhou@soil.gd.cn

的产电抑制率呈线性关系,通过在线检测 MFC 的电流输出信号来实现水质生物毒性的实时监控. 目前韩国已研制出世界上第一台基于 MFC 的水质生物毒性检测仪(Biomonitoring System HATOX-2000),它采用双室型 MFC 作为核心部件,阳极室作为进样室泵入水样,阴极室需要连续曝气以提供氧气作为最终电子受体,结构与操作较为复杂,并且由于双室型 MFC 采用的质子交换膜价格昂贵,限制了其推广应用.

本课题组采用低成本离子交换膜代替质子膜,构建了一种单室 MFC 型 BOD 传感器^[11],它结构简单、无需曝气、操作简便,可用于水体 BOD 的在线监测. 在此基础上,本研究进一步分析了该系统作为生物毒性传感器的可行性.

1 材料与方法

1.1 人工配水、清洗液

实验采用的人工配水为葡萄糖与谷氨酸标准液(GGA 标准液)^[12],其 BOD 为 (200 ± 10) mg/L, pH 为 7.0 ± 0.1 , -20°C 冷藏,备用.

含 Cd^{2+} 阳极液:取 CdSO_4 溶液(Cd^{2+} 浓度为 100 mg/L) $100 \sim 800\ \mu\text{L}$, GGA 溶液 20 mL ,用阳极清洗液定容至 100 mL ,得 Cd^{2+} 浓度为 $0.1 \sim 0.8\text{ mg/L}$ 的阳极液.

含 Cu^{2+} 阳极液:取 CuSO_4 溶液(Cu^{2+} 浓度为 100 mg/L) $100 \sim 800\ \mu\text{L}$, GGA 溶液 20 mL ,用阳极清洗液定容至 100 mL ,得 Cu^{2+} 浓度为 $0.1 \sim 0.8\text{ mg/L}$ 的阳极液.

阳极清洗液:不含谷氨酸和葡萄糖的 GGA 溶液.

1.2 MFC 装置

本研究以单室 MFC^[12]为基础,构建单室 MFC 型生物毒性检测仪,以 GGA 溶液($\text{pH } 7.0 \pm 0.1$, BOD 值为 200 mg/L)为阳极液,接种后置于 30°C 人工气候箱中恒温培养,外接 $6\text{ k}\Omega$,在线记录输出电压.当电压降至 50 mV 时,更换 20 mL 阳极室 GGA 溶液,经过 15 d 共 5 次的阳极液更换后,电池的输出电压达到稳定,电池启动完毕,进行各项测试.

1.3 检测流程

如图 1 所示,待 MFC 启动并运行稳定后,用 20 mL 阳极清洗液清洗 MFC 阳极室,当输出电压降至 40 mV 时用注射器缓缓注入标准 GGA 溶液 20 mL (BOD = 40 mg/L),反应 4 h 后,注入 20 mL 清洗液,电压降至 40 mV 后再注入待测水样 20 mL ,反应 4 h

后再次清洗,注入标准 GGA 溶液 20 mL ,反应 4 h 后进入第二轮检测. 注入清洗液目的是为了清洗 MFC 阳极室内残留 GGA 溶液或重金属离子,迅速降低输出电压,再次检测标准溶液是为了降低重金属离子对微生物的影响,使传感器恢复到检测前的状态,减少误差.

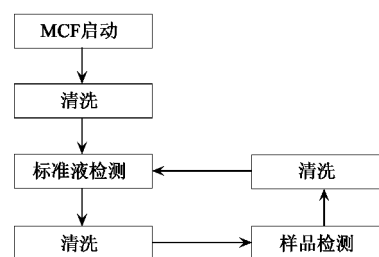


图 1 样品测定流程

Fig. 1 Operational procedure of the biomonitoring system using air-cathode microbial fuel cells

1.4 计算

每次检测完毕,计算产电量,并按下式计算产电抑制率,建立抑制率与有毒物质浓度之间的线性关系.

$$R_i = (Q_1 - Q_2) / Q_1 \times 100\%$$

式中, R_i 为产电抑制率, Q_1 为不含有毒物质的 GGA 溶液产电量, Q_2 为含有有毒物质的 GGA 溶液产电量.

MFC 恢复与第一次标准溶液检测时产电量(4 h)误差不超过 5% 时进入第二轮检测.

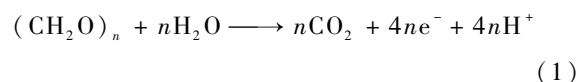
当 $R_i = 20\%$ 时,被检测溶液的有毒物质浓度为 IC_{20} (即 20% 抑制浓度)^[5].

2 结果与分析

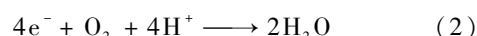
2.1 检测原理

文献[12]中已系统论述了 MFC 型传感器检测 BOD 的原理,反应过程如下.

阳极反应:



阴极反应:



即水体中的有机物在 MFC 阳极室被产电微生物生物氧化,产生的电子被微生物输送到阳极,然后通过外电路到达阴极,从而形成回路产生电流. 通过在线采集 MFC 中的电流信号,经过数据处理可获得特定 BOD 的产电量信息. 但是一旦水体存在毒害物,将影响阳极产电微生物的呼吸代谢过程与电子

传递速率,导致阳极反应受到抑制,电流信号强度减弱.在一定毒害物浓度范围内,产电量抑制程度与污染物生物毒性呈正相关.

2.2 检测条件的确定与优化

2.2.1 检测时间的影响

检测时间和清洗时间是设计传感器的2个重要指标.快速测定是传感器的根本任务,但测定时间太短,生化反应不完全,信号不明显,影响测定结果的准确性;测定时间太长,达不到快速测定的目的,不利于应用.因此,最大限度地对传感器的准确性和测定速度进行优化,是传感器设计的一个重要方面^[13].MFC外接电阻6 k Ω ,阳极标准溶液BOD为40 mg/L,以检测镉离子为例(其离子浓度分别为0.05~0.8 mg/L),按不同检测时间如2、3、4 h绘制标准曲线,由图2可知,随检测时间延长,线性关系变好.其中,当检测时间为4 h时,相关系数为0.996 1,已达检测要求.

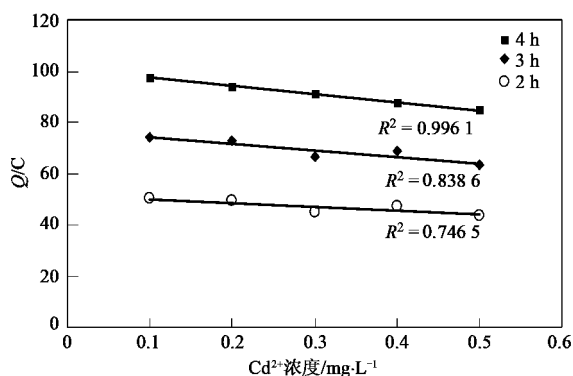


图2 不同检测时间的标准曲线

Fig.2 Correlation between Cd^{2+} concentration and Coulombic yield at different reaction times

2.2.2 清洗和恢复时间的影响

当连续检测多个样品时,为了使检测初始条件一致,减少误差,需要对MFC阳极室进行清洗,清除

其残留有机物.本研究设定输出电压信号降为40 mV时才能进行下次检测,具体方法是:向阳极室中注射20 mL充氮排氧的阳极清洗液,由于清洗液中不含BOD,故MFC的输出电压会迅速降低.图3反映了不同清洗时间下电压信号的下降幅度.可以看出,经过2~10 min的清洗(图3中的每个电压信号数据点相当于2 min),电压会降至设定的标准(即40 mV),每次检测含毒性离子溶液后,再次注入GGA溶液使传感器中微生物恢复到检测器的状态,从中还可以看出,经过一个周期(4 h)的反应,传感器基本恢复到检测前的状态.本实验采用混合菌种作阳极催化剂,其适应性强,清洗时间为2~10 min,恢复时间4 h.

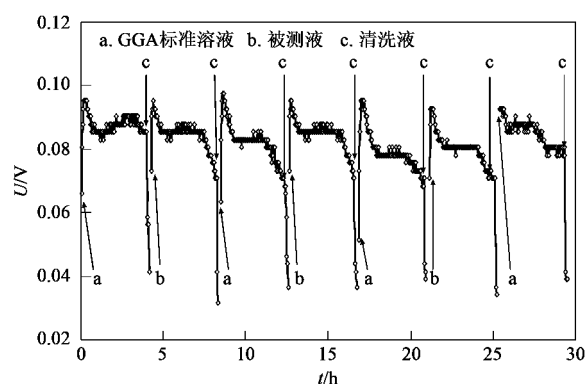
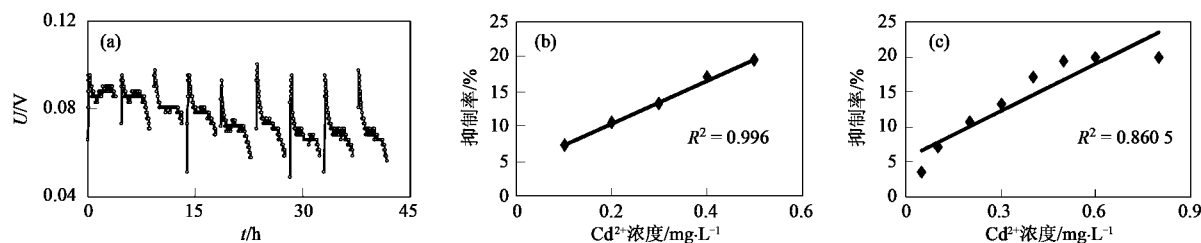


图3 清洗和恢复时间对检测的影响

Fig.3 Effects of cleaning and recovering timing on voltage output

2.3 镉离子的检测

以BOD值为40 mg/L的GGA溶液作标准溶液,分别检测 Cd^{2+} 浓度为0.05~0.8 mg/L的待测溶液(BOD值为40 mg/L),制作标准曲线(图4).由图4(b)可知,在 Cd^{2+} 浓度为0.1~0.5 mg/L时,其抑制率与 Cd^{2+} 浓度显著线性相关($R^2 = 0.996$),由图4(c)可知,镉离子 IC_{20} 值^[10]为0.6 mg/L.



(a) 传感器测定标准液的电压-时间关系;(b) 抑制率与 Cd^{2+} 浓度(0.1~0.5 mg/L)线性关系;

(c) 抑制率与 Cd^{2+} 浓度(0.05~0.8 mg/L)线性关系

图4 镉离子检测

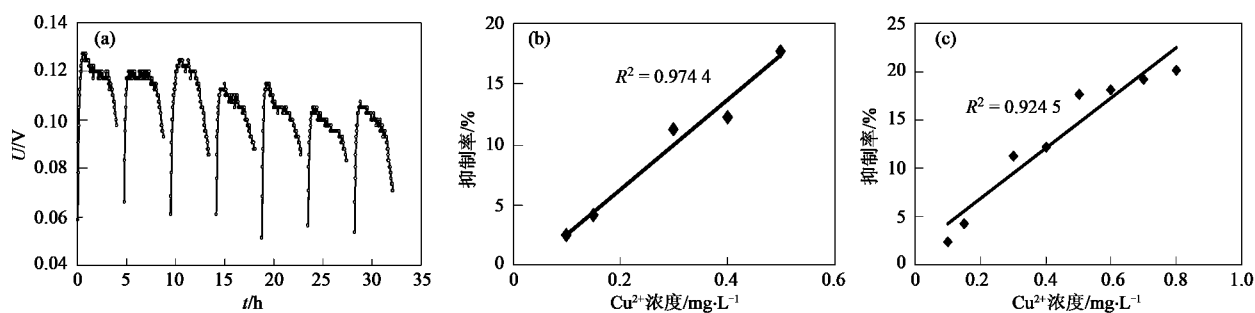
Fig.4 Detection of Cd^{2+}

2.4 铜离子的检测

用 BOD 值为 40 mg/L 的 GGA 溶液作标准溶液,分别检测 Cu^{2+} 浓度为 0.1 ~ 0.8 mg/L 的待测溶液(BOD 值为 40 mg/L),制作标准曲线(图 5)。由图

5(b)可知,在 Cu^{2+} 浓度为 0.1 ~ 0.5 mg/L 时,其抑制率与 Cu^{2+} 浓度显著相关($R^2 = 0.9744$),由图 5(c)可知,铜离子 IC_{20} 值为 0.8 mg/L。

2.5 镉离子与铜离子混合溶液的检测



(a) 传感器测定标准液的电压-时间关系; (b) 抑制率与 Cu^{2+} 浓度(0.1 ~ 0.5 mg/L)的线性关系;

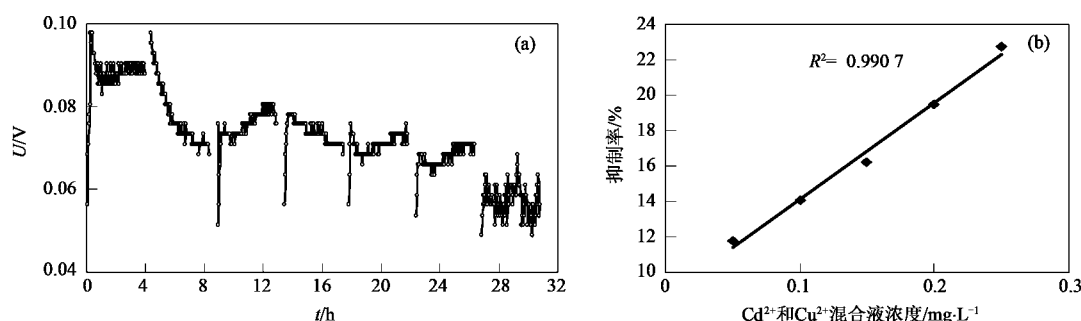
(c) 抑制率与 Cu^{2+} 浓度(0.1 ~ 0.8 mg/L)的线性关系

图 5 铜离子检测

Fig. 5 Detection of Cu^{2+}

以 BOD 值为 40 mg/L 的 GGA 溶液作标准溶液,分别检测 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 浓度均为 0.05 ~ 0.3 mg/L 的待测溶液(BOD 值为 40 mg/L),制作标准曲线(图 6)。由图 6(b)可知,在 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 浓度均为 0.05 ~ 0.25 mg/L 时,其抑制率与 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 浓度显

著相关($R^2 = 0.9907$),其 IC_{20} 值为 0.2 mg/L。与单独的 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 相比,2 种离子的混合溶液对 MFC 产电的抑制率更高,说明 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 复合会产生协同毒性作用,这与宋玉芳等^[14]的报道结果是一致的。



(a) 传感器测定标准液的电压-时间关系; (b) 抑制率与 Cd^{2+} 浓度的线性关系

图 6 镉离子与铜离子混合液的检测

Fig. 6 Detection of Cd^{2+} and Cu^{2+}

综上所述,单室 MFC 型生物毒性传感器可用于生物毒性检测,其操作简单,灵敏度较高。研究结果表明,单一重金属离子溶液中, Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 浓度为 0.1 ~ 0.5 mg/L 时,其抑制率与有毒物质浓度的线性关系最好; Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 混合溶液中, Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 浓度为 0.05 ~ 0.25 mg/L (Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 浓度相等)时,其抑制率与有毒物质浓度的线性关系最好; 3 种溶液 IC_{20} 值分别为 0.6、0.8 和 0.25 mg/L。

2.6 各种生物毒性检测方法比较

目前国际上应用于水质毒性检测的各种急性毒性实验方法的原理及优缺点见表 1。

由表 1 可见,鱼类、藻类或蚤类毒性实验存在指示生物保存困难、实验周期长的缺点。作为水质急性毒性测定国家推荐标准的发光细菌法(GB/T 15441-1995)也存在指示生物保存、复壮以及整体操作繁琐的问题。与上述方法相比,MFC 法利用电池阳极上形成的产电微生物膜作为指示生物,它在监测过程可同时利用废水中有机物增殖,无需专门保存;另

表 1 水质毒性检测方法比较

Table 1 Comparison of biotoxicity assays of water quality

检测方法	检测原理	优点	缺点	参考文献
鱼类毒性试验	水体有毒物质对鱼类游动抑制效应	可用于现场检验、现象直观、 □ 察	实验周期长、需大量材料和多 次重复实验	[15,16]
蚤类毒性试验	有毒物质对水蚤生长发育与 活动的抑制效应	实验现象直观,易于观察	测试灵敏度低、实验时间长、 指示生物保存难	[17 ~ 19]
藻类毒性实验	水体中有毒物质抑制藻类光 合/呼吸作用	以藻类的生长抑制效应作为 测试指标,准确可靠	工作量大,测定周期长、指示 生物保存难	[20,21]
发光细菌	检测水体有毒物质对发光细 菌发光强度变化	检测快速,技术发展较成熟, 操作已程序化	操作较为繁杂、指示生物保存 困难.	[5,22]
微生物燃料电池	检测水体有毒物质对 MFC 产 电量的抑制率	灵敏度较高,操作简单,产电 微生物自我繁殖,无需保存	产电微生物膜易产生抗性,影 响检测结果,效果的长期稳定 性以及实际复杂水样的检测 需要验证	本研究

外,由于它是多种产电细菌与发酵性细菌组成的混合菌群,因而与单一指示生物(如发光细菌)相比,也更有利于反映水质的实际毒性.

单室 MFC 型生物毒性传感器结构简单,操作方便,易于维护,灵敏度较高,响应时间较短,重现性较好,便于携带.今后的研究重点是如何用于实际水样的检测,并维持 MFC 传感器的长期稳定性,达到生物毒性现场在线监测的目的.

3 结论

(1)单室 MFC 型生物毒性传感器结构简单、操作方便、灵敏度较高,有望替代传统发光细菌法,可用于水体重金属离子(Cd^{2+} 、 Cu^{2+})生物毒性的快速检测.

(2)该单室 MFC 型生物毒性传感器的适宜检测时间为 4 h,清洗时间 2 ~ 10 min,恢复时间 4 h.

(3)该传感分别检测含 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 和 2 种毒性离子的混合溶液,结果显示 3 种溶液 IC_{20} 值分别为 0.6、0.8 和 0.2 mg/L,对检测仪产电的抑制率与其浓度呈显著线性关系,相关系数分别为 0.996 0、0.974 4和 0.990 7.

参考文献:

[1] 王广鹤,瞿璟琰,卢湘岳,等. 水质毒性快速检测技术及其发展趋势[J]. 环境科技,2008,**21**(2):27-29.

[2] Gerhardt A. Whole effluent toxicity testing with *Oncorhynchus mykiss*(Walbaum 1792):Survival and behavioral responses to a dilution series of a mining effluent in South Africa[J]. Arch Environ Contam Toxicol, 1998, **35**:309-316.

[3] 张凤民,胡炜. 十三种硝基苯类化合物对大型蚤(*Daphnia Magna* Straus)的急性毒性试验[J]. 水生生物学报,2000,**24**(3):201-207.

[4] Wong S L, Nakamoto L, Wainwright J F. Detection of toxicity organometallic complexes in wastewaters using algal assays [J]. Arch Environ Contam Toxicol, 1997, **32**:358-366.

[5] Stefano G, Luca B, Aldo R, *et al.* Improved detection of toxic chemicals using bioluminescent bacteria [J]. Analytica Chimica Acta, 2002, **8**:113-120.

[6] 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.

[7] Kim M, Youn S M, Shin S H, *et al.* Practical field application of a novel BOD monitoring system [J]. Environ Monit, 2003, **5**: 640-643.

[8] Ampai K, Proespichaya K, Punnee A, *et al.* Microbial BOD sensor for monitoring treatment of wastewater from a rubber latex industry [J]. Enzyme Microb Technol, 2008, **42**: 483-491.

[9] Dhall P, Kumar A, Joshi A, *et al.* Quick and reliable estimation of BOD load of beverage industrial wastewater by developing BOD biosensor [J]. Sens Actuators B, 2008, **133**: 478-483.

[10] 尤世界,赵庆良,姜珺秋. 废水同步生物处理与生物燃料电池发电研究[J]. 环境科学,2006,**27**(9):1786-1790.

[11] Mia K, Hyun M S, Geoffrey M, *et al.* A novel biomonitoring system using microbial fuel cells [J]. J Environ Monit, 2007, **9**:1323-1328.

[12] 吴锋,刘志,周顺桂,等. 低成本单室微生物燃料电池型 BOD 传感器的研制[J]. 环境科学,2009, **30**(10): 3099-3103.

[13] 王建龙,章一心. 生物传感器 BOD 快速测定仪的研究进展[J]. 环境科学学报, 2007, **27**(7): 1066-1082.

[14] 宋玉芳,许华夏,任丽萍,等. 土壤重金属对白菜种子发芽与根伸长抑制的生态毒性效应[J]. 环境科学,2002,**23**(1): 103-107.

[15] Toussaint M W, Brennan L M, Rosencrance A B, *et al.* Acute toxicity of four drinking water disinfection byproducts to Japanese medaka fish [J]. Bull Environ Contam Toxicol, 2001, **66**:255-262.

[16] Roex E W M, Langen M C T, Gestel C A M. Acute toxicity of two compounds with different modes of action to the zebrafish, danio rerio[J]. Bull Environ Contam Toxicol, 2002, **68**:269-274.

[17] Barbosa I R, Martins R M, Saemelo M L, *et al.* Acute and chronic toxicity of dimethylsulfoxide to daphnia magna[J]. Bull Environ Contam Toxicol, 2003, **70**:1264-1268.

[18] Lan C H, Peng C Y, Lin T S. Acute aquatic toxicity of *N*-methyl-2-pyrrolidinone to daphnia magna [J]. Bull Environ Contam Toxicol, 2004, **73**:392-397.

[19] 吴永贵,黄建国,袁玲. 利用隆线蚤趋光行为评价铬的生物毒性[J]. 应用生态学报,2005,**16**(1):171-174.

[20] Ma W, Liang J, Xu L, *et al.* Acute toxicity of 33 herbicides to the green alga chlorella pyrenoidosa [J]. Bull Environ Contam Toxicol, 2001,**66**:536-541.

[21] 孙红文,黄国兰. 藻类与有机污染物间的相互作用研究[J]. 环境化学,2003,**22**(5):440-444.

[22] Aruldoss J A, Viraraghavan T. Toxicity testing of refinery wastewater using Microtox [J]. Bull Environ Contam Toxicol, 1998, **60**:456-463.