

微生物电极快速测定微生物浓度的研究

杨茂余 杨 璋

(南京化工学院应用化学系, 南京)

利用前文所描述的微生物电极, 测定了酵母菌、大肠杆菌和枯草杆菌三种微生物的标准曲线。其基本原理是: 微生物在厌氧条件下将硫董还原, 还原态硫董在阳极上氧化, 而电流的最大上升速率与微生物的浓度成线性关系。对酵母菌、大肠杆菌和枯草杆菌的检测下限分别为 5×10^5 、 2×10^6 和 1×10^5 cells/ml。检测时间一般少于 20min, 重现性误差小于 5%。本文还讨论了温度、染料浓度和磁搅拌转速等因素对微生物浓度测定的影响。

关键词 微生物测定; 微生物电极; 氧化还原媒介; 硫董; 酵母; 细菌

对于Matsunaga等人^[1]开发的非染料偶合的燃料电池型微生物电极系统, 由于微生物与阳极之间直接进行电子传递的能力很弱, 电流输出一般不到 $1\mu\text{A}/\text{cm}^2$, 可检测的范围在 10^7 — 10^9 cells/ml 之间 (酵母菌为 5×10^7 — 4×10^8 cells/ml, 细菌为 9×10^8 — 3×10^9 cells/ml)。而以吩嗪染料为电子传递媒介的燃料电池型电极系统和恒电位系统^[2], 对大肠杆菌的检测下限分别为 4×10^6 和 6×10^6 cells/ml。Nishikawa等人^[3]以2,6-二氯酚靛酚为媒介, 并用滤膜预先富集, 对细菌的检测下限可降至 10^4 cells/ml。这些电极系统的检测时间一般为 10—20min, 重现性误差为 5% 左右。目前, 尚未见有关以硫董为微生物电极系统的电子传递媒介的文献报道。

利用作者所研制的以硫董为电子传递媒介的燃料电池型的微生物电极^[4], 可以快速、准确地测定微生物浓度。本文利用该微生物电极系统, 测定了酵母菌、大肠杆菌和枯草杆菌三种微生物的标准曲线, 讨论了温度、染料浓度和磁搅拌转速等因素对微生物浓度测定的影响。

材 料 和 方 法

(一) 微生物的培养及菌悬液的制备

1. 菌种: 啤酒酵母 AS2.368, 大肠杆菌 AS 1.129、枯草杆菌 AS 1.377 (均由中国科学院微生物研究所提供)。

2. 培养基的配制: 肉汤培养基: 牛肉膏 3g、蛋白胨 10g、NaCl 5g, 加自来水 1L, 用 NaOH 调 pH 值到 7.2。麦芽汁培养基: 麦芽汁 6 巴林, pH 值不调。在上述液体培养基中每升加入 15—20g 琼脂, 即成固体培养基。液体和固体培养基均在 121°C 下蒸汽灭菌 15—20min。

3. 微生物的培养: 细菌和酵母菌分别在肉汤培养基中 37°C 和麦芽汁培养基中 30°C 摇床 (150r/min) 培养 24h。

4. 菌悬液的制备: 将微生物培养液在 4000rpm 下离心 15—20min, 菌体用生理盐水配成菌悬液, 保存在 4°C 冰箱中备用。

5. 微生物的计数: 采用平板菌落计

数法对所用菌悬液的浓度进行计数。细菌在固体肉汤培养基中37℃培养2—3天计数；酵母菌在固体麦芽汁培养基中30℃培养2—3天计数。

(二) 测定微生物浓度的实验方法

1. 阴极液的配制：在37℃蒸馏水中加入过量的 $K_3Fe(CN)_6$ 和 $K_4Fe(CN)_6$ 配成饱和溶液。

2. 阳极液的配制及除氧：将一定量的硫董浓溶液（用无菌蒸馏水配制）添加到一定量的经蒸汽灭菌的0.1mol/L磷酸盐缓冲液中配成一定硫董浓度的阳极液。使用前，将阳极液预先在1L的有机玻璃圆筒中用纯化后的氮气^[5]除氧2h左右。

3. 微生物浓度的测定：微生物电极的测量装置如图1所示。通过控温仪可以调节所需要的实验温度；在整个实验过程

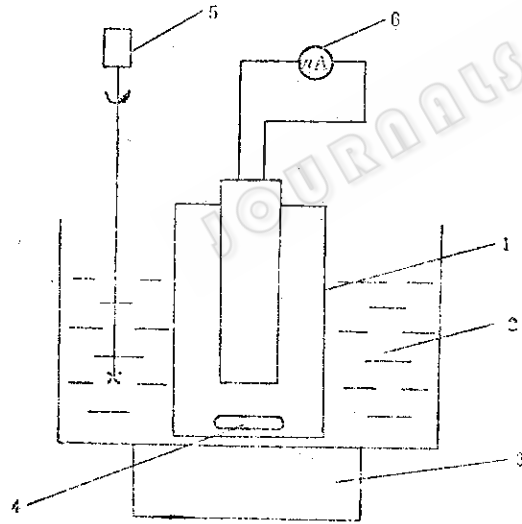


图1 测定微生物浓度的实验装置

Fig.1 Experimental apparatus for determination of microbial cell concentration

1. 微生物电极 Microbial electrode 2. 恒温水浴 Water bath 3. 磁搅拌器Magnetic agitator
4. 磁搅拌转子 Magnetic agitating bar 5. 电动搅拌器Motor agitator 6. 微安表Microammeter

中，始终维持一定的磁搅拌转速。测量时，先用无菌水冲洗微生物电极数次，然后将预先除氧的阳极液注入微生物电极的

阳极室，再添加一定量的葡萄糖。在整个系统都完全恒温后，从进样口（测试期间用橡皮塞密封）注入待测菌悬液，用DT-830数字万用表记录微生物电极的电流-时间曲线。由于阳极室难以完全密封，整个测试期间都通氮气以维持厌氧气氛。

基本原理

由于微生物电极的阳极反应受扩散控制^[4]，可以用下式表示其电流输出^[6]：

$$i = nFD = \frac{C_{r,d}}{\delta} \quad (1)$$

式中*i*是电流密度，*n*是反应电子数，*F*是法拉第常数，*D*是扩散系数，*C_{r,d}*是硫董（还原态）的本体浓度，*δ*是扩散层厚度。

在保持液体流动状态不变的情况下，*δ*是一个常数，微生物电极的电流输出随时间的变化取决于硫董（还原态）浓度随时间的变化，即

$$\frac{di}{dt} = nFD \frac{1}{\delta} \frac{dC_{r,d}}{dt} \quad (2)$$

而微生物对硫董的还原则是按米氏型方程进行的^[4]，即

$$\frac{dC_{r,d}}{dt} = \frac{Q_{max}XC_{o,x}}{K_i + C_{o,x}} \quad (3)$$

其中 $C_{o,x}$ 为硫董（氧化态）的浓度，*K_i*为半饱和和常数，*Q_{max}*为最大比反应速率，*X*为微生物的浓度。

因此，在一定的硫董浓度下，对于一定种类的微生物，电流的上升速率与微生物的浓度成正比；在反应的初期，硫董（氧化态）浓度最大，电流上升速率达到最大值。电流上升速率最大值的大小，反映了测试液中微生物浓度的大小。

实验结果

(一) 染料和氧化基质的作用

图2表明在相同的微生物浓度下, 加与不加葡萄糖、加与不加氧化还原染料时微生物电极的电流-时间曲线。可以看出, 在阳极液中不加入染料, 也不加入葡萄糖, 微生物电极有一个微小的恒定的电流输出; 这个微小的电流可能是微生物和阳极液中的还原性物质在阳极上放电所产生的^[1]; 在阳极液中加入2g/L葡萄糖、但

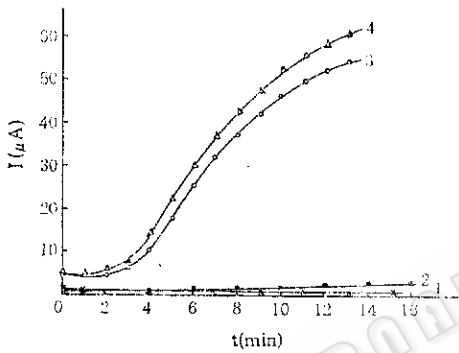


图2 染料和葡萄糖的作用

Fig.2 Effects of dye and glucose (37°C)

1. Ck* 2. Ck+葡萄糖Glucose 2g/L 3. Ck+硫堇Thionioe 200 μ mol/L 4. Ck+硫堇Thionine 200 μ mol/L+葡萄糖Glucose 2g/L

* 0.1mol/L磷酸盐缓冲液Phosphate buffer+*E. coli* 2.23 $\times 10^8$ cells/ml

不加入染料, 微生物电极经过一定的时间(10min左右)后电流有微小的上升(最大电流上升速率为0.3 μ A/min), 这显然是由于微生物在厌氧条件下不断氧化葡萄糖产生的电活性物质在阳极上反应所引起的; 如果在阳极液中加入200 μ mol/L的硫堇, 经过短暂的延迟期后微生物电极的电流输出显著上升(最大电流上升速率为7.6 μ A/min), 十几分钟后, 由于染料浓度下降, 电流上升变得缓慢, 最后将趋于一个稳定值。如果在阳极液中同时加入200 μ mol/L的染料和2g/L的葡萄糖, 可

以进一步提高电流上升速率(最大电流上升速率为9.0 μ A/min)。很显然, 在不加葡萄糖的情况下, 还原染料所需的电子来自细胞内有机质(内源有机质)的氧化; 加入葡萄糖时, 电子将来自内源有机质和外源有机质的氧化。

(二) 不同微生物浓度的电流-时间曲线

不同大肠杆菌浓度的电流-时间曲线如图3所示。从图可见, 在大肠杆菌浓度较低时, 电流-时间曲线存在一段延迟期, 在这段时间里, 电流上升缓慢。微生物浓度越低, 延迟期越长; 微生物浓度越高, 延迟期越短, 甚至消失。这显然是阳极液中微量的溶解氧的影响所致。溶解氧的存在将降低微生物对染料的还原速率。只有

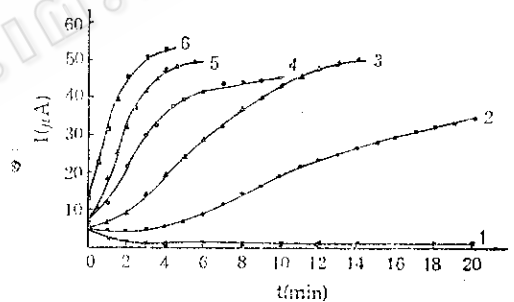


图3 不同大肠杆菌浓度的电流-时间曲线

Fig.3 Current-time curves of various *E. coli* concentrations

37°C, 硫堇Thionine 200 μ mol/L, 葡萄糖Glucose 2g/L, 1. 不加*E. coli* Without *E. coli*
2-b: 6.5 $\times 10^7$, 1.31 $\times 10^8$, 2.58 $\times 10^8$, 3.93 $\times 10^8$, 4.57 $\times 10^8$ cells/ml

在微生物基本上完全还原溶解氧(或溶解氧不产生影响)后, 染料的还原才能以米氏型方程进行, 才会出现最大电流上升速率。最大电流上升速率随微生物浓度的增大而增大, 而最大电流上升速率所持续的时间却随微生物浓度的增大而缩短。该电极系统测定微生物浓度所需的时间少于20min。

从图中还可看出: 在不加大肠杆菌的

情况下，电流很快下降到一个很小的稳定值。这表明测量系统中杂菌污染的影响可以忽略。

(三) 温度对最大电流上升速率的影响

图 4 表明在相同的硫董浓度和相同的大肠杆菌浓度下，温度对最大电流上升速率的影响。可以看出，在较低的温度（如 25—30℃）下，最大电流上升速率随温度的升高而缓慢上升；而在较高的温度（如 35—40℃）下，最大电流上升速率随温度

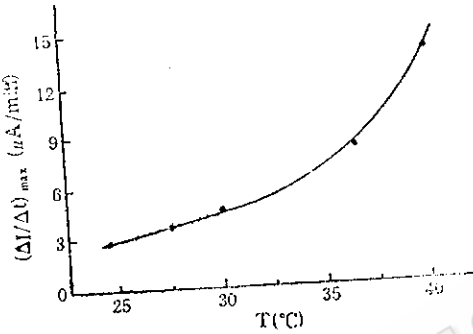


图 4 温度对最大电流上升速率的影响

Fig.4 Effect of temperature on maximum increase rate of current

离子交换膜的使用温度 < 40℃ The ion-exchange membrane can only be used below 40℃
硫董 Thionine 200 μmol/L, E.coli 2.2 × 10⁸ cells/ml, 葡萄糖 Glucose 2g/L

的升高而急剧增大。考虑到微生物电极的检测灵敏度，选择 37℃ 为实验温度。

(四) 染料浓度对最大电流上升速率的影响

图 5 表明染料浓度对最大电流上升速率的影响。在较低的染料浓度 (< 100 μmol/L) 下，最大电流上升速率随染料浓度线性增大，染料的还原以一级反应进行；在较高的染料浓度 (> 1000 μmol/L) 下，最大电流上升速率几乎不随染料浓度的增大而增大，染料的还原以零级反应进行；而在 100—1000 μmol/L 之间，随着染料浓度的增大，最大电流上升速率的变化逐渐缓

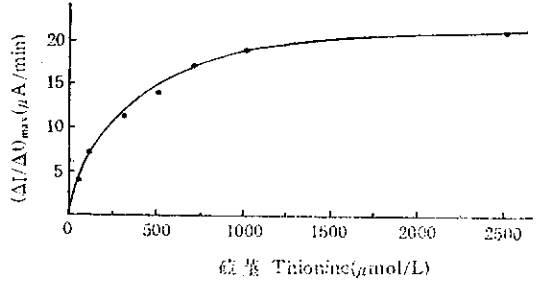


图 5 染料浓度对最大电流上升速率的影响

Fig.5 Effect of dye concentration on maximum increase rate of current

37℃, E.coli 2.45 × 10⁸ cells/ml, 葡萄糖 Glucose 2g/L

慢，染料的还原按混合级反应进行。染料浓度对最大电流上升速率的影响与米氏型方程相符。

(五) 最大电流上升速率与微生物浓度的关系 (标准曲线)

图 6—8 是大肠杆菌、枯草杆菌和酵母菌的标准曲线。可以看出，三种微生物的最大电流上升速率与微生物的浓度成线性关系。因为不同种类的微生物对染料的还原能力各不相同，所以，所得到的标准曲线之间差异也较大。由于阳极液中存在微量的溶解氧，而微生物只有在溶解氧大部分被还原或影响很小的情况下才能还原染料，同时由于微安表的分辨率不可能过高 (0.1 μA)，检测下限将受到一定的限

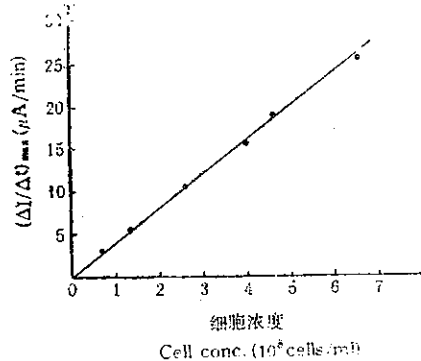


图 6 大肠杆菌标准曲线

Fig.6 Calibration curve for E.coli
37℃, 硫董 Thionine 200 μmol/L, 葡萄糖 Glucose 2g/L

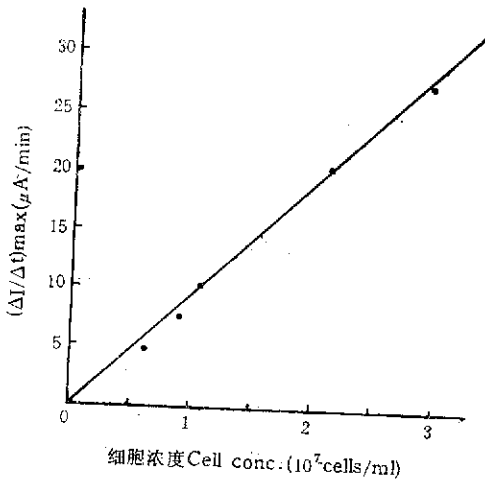


图7 枯草杆菌标准曲线

Fig.7 Calibration curve for *B. subtilis*
37°C, 硫堇 Thionine 200 μmol/L, 葡萄糖 Glucose 2g/L

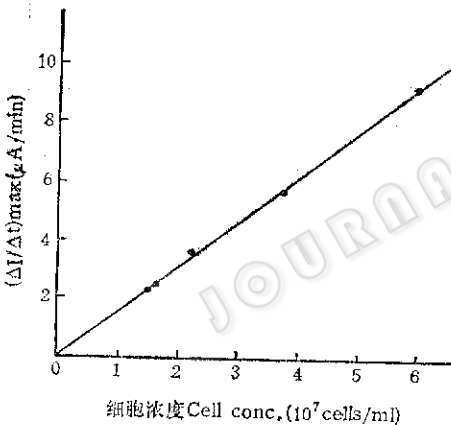


图8 酵母菌标准曲线

Fig.8 Calibration curve for yeast
30°C, 硫堇 Thionine 200 μmol/L, 葡萄糖 Glucose 2g/L

制。只要阳极液除氧较彻底，并且适当延长检测时间，则微生物电极对酵母菌的检测低限可至 5×10^5 cells/ml，对大肠杆菌和枯草杆菌的检测低限分别可至 2×10^6 和 1×10^5 cells/ml。

(六) 测量重现性

用微生物电极对同一浓度的菌悬液进行 5 次重复测量，结果列于表 1。可见，平均相对误差为 4.2%。

表 1 重现性实验结果

Table 1 Experimental results of reproducibility

最大电流上升速率 Maximum increase rate of current ($\mu\text{A}/\text{min}$)	16.0	15.7	15.6	15.6	13.8
平均最大电流上升速率 Average maximum increase rate of current ($\mu\text{A}/\text{min}$)	15.3				
相对误差 Relative error (%)	4.6	2.6	1.96	1.96	-9.8
平均相对误差 Average relative error (%)	4.2				

E. coli 3.8×10^8 cells/ml

讨 论

根据上述实验结果，微生物电极测定微生物浓度的误差主要来源于温度、染料浓度、磁搅拌转速、微生物的活性等因素。微生物的活性将对染料的还原速率产生较大的影响，但由于影响微生物活性的因素较为复杂，此处仅就温度、染料浓度、磁搅拌转速的波动可能产生的测量误差作一些分析。

(一) 温度

图4是在硫堇 200 μmol/L、*E. coli* 2.2×10^8 cells/ml 的实验条件下所得到的温度对微生物电极最大电流上升速率的影响曲线。在 37°C 时，如果温度波动的最大幅度为 $\pm 0.5^\circ\text{C}$ ，则最大电流上升速率的平均波动范围为 $8.85 \pm 0.52 \mu\text{A}/\text{min}$ ，对测量产生的平均误差为 $0.52/8.85 = 5.88\%$ 。

(二) 染料浓度

图5为在 37°C、*E. coli* 2.45×10^8 cells/ml 的实验条件下所得到的染料浓度对微生物电极最大电流上升速率的影响曲线。如果染料浓度波动的最大幅度为 10%，染料浓度的波动范围为 $200 \pm 20 \mu\text{mol}/\text{L}$ ，此时微生物电极最大电流上升速率的平均波动范围为 $10.1 \pm 0.30 \mu\text{A}/\text{min}$ 。此项引

起的平均测量误差为2.97%。

染料浓度的波动来源于染料溶液的配制、延迟期中染料的不同程度的还原。

(三) 磁搅拌转速

由于电源电压不稳以及转速调节不准等原因,将使实验过程中的磁搅拌转速产生一定的波动。如果实验所用的磁搅拌转速为500rpm,最大波动幅度为5%,则磁搅拌转速的变化范围为 500 ± 25 rpm。因为阳极过程受扩散控制, $I \propto \sqrt{\omega}$, 则由转速波动所产生的平均测量误差为

$$\frac{1}{2} \left(\left| \frac{\sqrt{\omega_-} - \sqrt{\omega_+}}{\sqrt{\omega}} \right| + \left| \frac{\sqrt{\omega_+} - \sqrt{\omega_-}}{\sqrt{\omega}} \right| \right)$$

$$= \frac{1}{2} \left(\left| \frac{2.89 - 2.82}{2.89} \right| + \left| \frac{2.89 - 2.96}{2.89} \right| \right)$$

$$= 2.42\%$$

因此,可以得到上述三个因素所引起的最大可能测量误差为11.27%。其中温度的波动是微生物电极测量误差的主要来源,其次是染料浓度的波动,而磁搅拌转速的变化对测量的影响较小。由于在实际

测量中,三个因素的作用往往相互抵消,所以实际的测量重现性误差要小于最大可能误差。

一般说来,以硫董为电子传递媒介的微生物电极系统可以用来检测任何一种对硫董具有还原能力的微生物。由于许多种类的微生物对硫董都有一个较高的还原速率^[7],该微生物电极具有较广的应用范围。与非染料偶合的微生物电极系统^[1]相比,该微生物电极系统对微生物浓度的检测低限低得多,检测范围宽得多。由于本文将最大电流上升速率与微生物的浓度相关联,只要适当增加硫董的浓度,就可相应提高检测高限,检测低限也可通过延长检测时间而得到降低,因而其检测范围要比以吩嗪染料和2,6-二氯酚靛酚为媒介的燃料电池型的微生物电极系统^[2,8]宽(这两种微生物电极系统是将电流最大值或电流稳定值与微生物的浓度相关联的)。在检测时间和测量重现性方面,本文与Matsunaga、Nishikawa等人^[1-3]的结果大致相同。

参 考 文 献

- [1] Matsunaga, T. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 37:117, 1979.
- [2] Turner, A.P.F. and Ramsay, G., *Biochem. Soc. Trans.*, 11:445, 1983.
- [3] Nishikawa, S. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 43:814, 1982.
- [4] 杨茂余, 杨璋: 生物工程学报, 4(2):138—144, 1988.
- [5] 高 鸿编著: 仪器分析(修订本), 人民教育出版社, 北京, p.106, 1964.
- [6] 查全性编著: 电极过程动力学导论, 科学出版社, 北京, p.21, 1976.
- [7] Roller, S.D. et al., *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 34(B):3, 1984.

STUDY ON THE RAPID DETERMINATION OF MICROBIAL CELL CONCENTRATION BY THE MICROBIAL ELECTRODE

Yang Maoyu Yang Zhang

(Department of Applied Chemistry, Institute of Chemical Technology, Nanjing)

The calibration curves for yeast, *E. coli* and *B. subtilis* were determined using the microbial electrode described in the previous paper. The basic principle is that under oxygen-free condition microorganisms reduce thionine from oxidized state to reduced state which is then oxidized on anode, and maximum increase rate of current produced is proportional to the microbial cell concentration. Detectable limits of yeast, *E. coli* and *B. subtilis* were 5×10^5 , 2×10^8 and 1×10^5 cells/ml respectively. Detection time was generally less than 20min. Determinations were reproducible with an average relative error of less than 5%. The effects of temperature, dye concentration, and magnetic agitating velocity on the determination of microbial cell concentration were also discussed.

Key words

Determination of microorganism; microbial electrode; redox mediator; thionine; yeast; bacteria