

利用生物传感技术研究微生物底物间相互作用

张先恩 张德亭 张素琴 张 兴 夏祥明

(中国科学院武汉病毒研究所)

摘要 建立了以生物传感技术为基础的微生物代谢研究的新方法。以微生物传感器的响应表示微生物对底物的外源呼吸,采用动态响应模型(初始响应斜率 $R_0 = di/dt$),迅速获得细胞相对呼吸速率,由此观察到苯酚和葡萄糖作为共存底物时在不同的微生物代谢过程中表现不同的相互作用类型(抑制、协同或无作用)。传统的底物降解实验与生物传感法所得结果相吻合。

关键词 生物传感;微生物传感器;外源呼吸;苯酚;葡萄糖

生物传感技术已广泛用于生物流质的快速分析^[1,2]。该技术的主要特征是以生物活性材料作为前置敏感单元。作者最近提出,可以对生物活性材料施加各种条件,通过传感信息来观察和揭示细胞反应过程^[3]。本研究即利用这种方法探索微生物底物(苯酚和葡萄糖)之间的相互作用,并由此建立新的代谢研究方法。

材料和方法

(一) 实验菌株

选用三株从石油化工废水分离的解酚微生物:假单胞菌 A4 (*Pseudomonas* sp. A4), 诺卡氏菌 N4-1 (*Nocardia* sp. N4-1) 和未鉴定细菌 S4。

(二) 培养基及培养条件

种子培养基(g/L)含:蛋白胨 1.25;酵母粉 1.25,葡萄糖 3.0,苯酚 0.5, pH 7.2。

底物降解实验培养基(g/L)含: K_2HPO_4 1.73, KH_2PO_4 0.68, NH_4NO_3 1.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.02, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.03, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03。以葡萄糖和苯酚为单一碳源或双碳源,加入量为:葡萄糖 1.0g,苯酚 0.5g。

(三) 微生物传感器制备

传感器制作基本过程:将种子培养液离心(3000 r/min, 10 min),倾去上清液,用 0.02 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0)洗涤菌体 1—2

次,重新悬浮在磷酸缓冲液中,取相当于 1mg 干重的细胞过滤至孔径为 $0.33\mu m$ 的滤膜上。将此载菌滤膜以载菌面向内紧贴在氧电极端口,并用橡胶圈固定,即可使用。

(四) 工作系统及操作过程

工作系统的组成(图 1)包括:微生物传感器, CY-2 型测氧仪,测定池(含 5ml 磷酸缓冲液),恒温水槽($30 \pm 0.5^\circ C$),记录仪(XWT型),磁力搅拌器,转速 50—100r/min。

基本操作过程:将传感器浸入测定池内的缓冲液中,待传感器输出电流稳定后,加入样品(一般为 $5\mu l$),约 2min 响应结束,洗涤传感器和测定池,准备第二次测定,传感器重新平衡约需 10min。

(五) 底物浓度测定

按 4-氨基氨基替比林法^[4]测定苯酚;采用酶电极流动注射分析法测定葡萄糖^[5]。

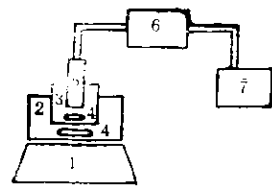


图 1 微生物传感器工作系统

1. 磁力搅拌器; 2. 恒温水浴; 3. 测定池; 4. 搅拌子;
5. 微生物传感器; 6. 测氧仪; 7. 记录仪

* 本工作属国家自然科学基金资助项目。

结果和分析

(一) 动态响应模型

图2是典型的微生物传感器响应曲线,它反应细胞外源呼吸的变化,其动力学过程已另有描述^[6]。在响应初期约十几秒钟内,电流直线下降,表明细胞耗氧呈一级动力学过程,其表观参量为电流对时间的导数 $(\frac{dI}{dt})$ 。设响应斜率为 R_x ,则有动态响应模型 $R_x = \frac{dI}{dt}$, x 为任意单一或混合的实验底物。因此, R_x 的生理意义是微生物细胞对一定浓度底物的相对初始呼吸速率,实验中用响应曲线直线部分的斜率来表示。实验表明,在8小时内, R_x 测定相对误差为 $\pm 10\%$ (数据略)。该误差为系统误差。由于氧电极本身在实验条件下的分析误差 $< 2\%$, 所以误差主要源于复杂的微生物细胞呼吸代谢。

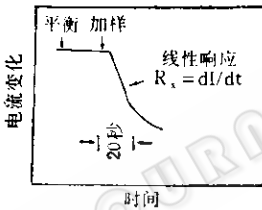


图2 微生物传感器响应过程曲线

选择苯酚和葡萄糖为底物,先测得微生物传感器对苯酚、葡萄糖及其混合物的响应值,分别记为 R_P , R_G 和 R_{P+G} 。比较 $R_P + R_G$ 和 R_{P+G} ,将误差考虑在内,如果 $R_P + R_G \approx R_{P+G}$,说明微生物能同时对两种底物呼吸,无底物间干扰。如果 $R_P + R_G >$ 或 $< R_{P+G}$,则可能存在底物间的抑制或协同效应。

(二) R_x 值测定和 χ^2 测验

按上述方法测定三种实验菌株对苯酚和葡萄糖及其两种底物的混合物的响应值 R_x ,每份样品至少重复测定三次,取平均值,结果见表1。三株菌的 $R_P + R_G$ 与 R_{P+G} 相比均有差异,但对A4而言,其相对差异仅为 $\pm 0.2\%$ 。其它两株菌传感器的比较差异较高。初步认为存

在实质性差异,进而利用 χ^2 测验检验差异的显著性。

表1 R_x 值及其比较

菌株	底物 ^a	R_x^b	$R_P + R_G$	$(R_P + R_G) - R_{P+G}$	相对差异 (%)
A4	P	33.3	87.3	+0.4	± 0.2
	G	54.0			
	P+G	87.7			
4-1	P	22.7	90	+11.3	± 6.0
	G	67.3			
	P+G	101.3			
S4	P	41.5	74.2	-16.7	± 13.1
	G	31.2			
	P+G	57.2			

a: P, 苯酚, 1mg/L; G, 葡萄糖, 1mg/L。

b: 比例单位

按一般生物学统计习惯,将风险概率定为5%, $\chi_{0.05}^2 = 3.84$, 检验结果见表2。根据差异显著水平作出判断: A4 菌株能同时氧化苯酚和葡萄糖,无底物间相互作用; 4-1 菌株亦能同时氧化苯酚和葡萄糖,其 $R_P + R_G > R_{P+G}$,但差异不显著,可能有弱的底物协同效应; S4 菌的 $R_P + R_G < R_{P+G}$,且差异显著,表现出较强的底物间抑制作用,又因 $R_{P+G} = 57.0$,与 R_P (41.5) 较接近,可能意味着葡萄糖的氧化被苯酚抑制。

表2 χ^2 测验

菌株	χ^2	χ^2 与 $\chi_{0.05}^2$ 比较	差异水平
A4	0.0018	$\chi^2 < \chi_{0.05}^2$	极不显著
4-1	1.4188	$\chi^2 < \chi_{0.05}^2$	不显著
S4	3.9871	$\chi^2 > \chi_{0.05}^2$	显著

(三) 底物降解实验

为了证实上述判断是否正确,需借助传统的底物降解性实验。将纯的种子培养物分别接种到以苯酚或葡萄糖为唯一碳源或双碳源的培养基,底物随时间的降解曲线见图3。在双碳源培养物中,A4 菌和 4-1 菌对苯酚和葡萄糖的利用是同步进行的。而 S4 菌则首先利用苯酚,直到苯酚消耗殆尽时,葡萄糖的降解才发生,

表明苯酚对葡萄糖代谢的抑制作用。将各培养物在对数生长中期(约第 17 小时)底物的消耗情况进行比较(表 3),A4 培养物中苯酚和葡萄糖的消耗在单一碳源和双碳源培养基中无甚差别;S4 菌株对葡萄糖的摄取由于苯酚的存在而降低约 90%;4-1 对葡萄糖和苯酚的消耗在双碳源培养基中都略为增加。底物降解实验与微生物传感器法所得结果基本相吻合。

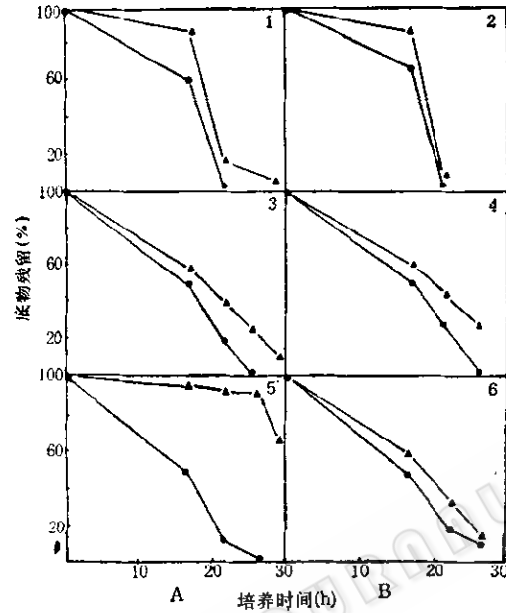


图 3 微生物对苯酚和葡萄糖的降解

A: 双碳源培养基; B: 单一碳源培养基; 1,2,A4 培养物; 3,4,4-1 培养物; 5,6,S4 培养物;
▲—▲ 葡萄糖; ●—● 苯酚

表 3 对数生长中期底物消耗的比较

菌株	葡萄糖消耗(%)		苯酚消耗(%)	
	单一碳源	双碳源	单一碳源	双碳源
A4	12	10	36	38
4-1	40	42	51	57
S4	40	5	55	52

讨 论

测定微生物细胞外源呼吸行为常用检压法和氧电极法,以后者较为简便。本研究部分地借鉴了氧电极法原理,所不同的是,微生物细胞被限制在氧电极表面的极薄层空间,所有的呼

吸反应都发生在该微小空间,使得极微弱的呼吸都能被检出。例如,苯酚浓度在 ppm 以下也能导致微生物传感器响应,其它方法难以达到这样高的灵敏度,故有利于精细的实验。又由于细胞经包埋后不会流失,可以很方便地选择各种底物或调节实验因子来探索细胞的反应。这些反应被迅速地转化成电信号而直观地定量地表现出来,提高了分析自动化程度。一般认为,生物学反应过程条件难以控制均匀,常常因出现可观的实验误差而被称为半定量实验。生物传感技术的引入较好地克服了这一弊端。以微生物活细胞作为研究材料时,分析误差可低于 10%,其原因可归结于(1)容易控制实验条件;(2)动态响应法较真实地反映初始反应情况,从而避免副反应的干扰;(3)操作简便,自动化程度较高,减少了人为误差。在本实验中,生物传感法与底物降解实验结果基本吻合,初步证实了其可靠性。

需要指出的是,本法测定周期约为十几秒钟,不同生理状态的细胞对同一样品的响应可能区别很大。如未经苯酚诱导培养的本实验菌株对苯酚响应极弱甚或响应全无,故仍需对结果作仔细分析。另一个值得考虑的因素是滤膜材料(细胞载体)对底物通透性的可能的化学阻滞作用,这种作用或许影响实验结果,有待考查。此外,控温水平也直接影响实验的精确程度。

有趣的是,实验首次发现了苯酚和葡萄糖作为共存底物时因菌种不同表现三种相互作用类型:互不干扰,抑制和协同效应。由此可能解释为什么存在有关苯酚能否抑制葡萄糖代谢的不同结论^[7,8],从而进一步为有关基础研究和苯酚废水处理的营养配比以及酚降解菌的选择与应用提供依据。

本研究结果有利于阐明 BOD 微生物传感器响应机理。标准 BOD 测定需要接种后培养五日,此时约 70% 的有机物被氧化,传感器法测定 BOD 仅需十几分钟,在如此短的时间内,如果存在过于强的底物间抑制作用或二次代谢,显然会使传感器法测定结果大大低于标准

方法。因此, S4 菌株显然不宜作为 BOD 微生物传感器的工作菌株, 而 A4 菌株传感器曾成功地用于含酚废水 BOD 测定^[9], 与本实验结果互为印证。

参 考 文 献

- [1] Karube, I. and Suzuki, S.: *Ion-selective Rev.*, **6**: 15, 1984.
- [2] De Young, H. G.: *High Technology*, Nov. 41,

1983.

- [3] 张先恩等: 第二届全国传感器学术讨论会论文集, 下册, 中国仪器仪表学会等编, P758, 1988.
- [4] 污染源统一监测方法编写组编: 污染源统一监测分析方法(废水部分), 标准技术出版社, P146, 1983.
- [5] 张先恩等: 生物化学杂志, 待发表.
- [6] 张先恩等: 生物工程学报, **5**(2); 140, 1989.
- [7] 王德铭: 环境生物学文集第三集, 中国科学院水生生物研究所编, P85, 1980.
- [8] Gaol, A. and Halina, Y. N.: *Archives of Microbiology*, **130** (1); 54, 1981.
- [9] 张先恩等: 环境科学学报, **6**(2): 184, 1986.