

基于阻抗生物传感器检测 一种海洋缓蚀细菌的研究

王治文, 梁慧光, 李永娟*, 龙海涛, 孔鹏
(甘肃农业大学理学院, 甘肃兰州 730070)

摘要: 通过将 11-巯基-十一烷酸自组装到金电极表面、利用 EDC/NHS 活化羧基促进凝集素分子(ConA)的固载, 构建了用于检测一种具有良好缓蚀性能海洋细菌(S-59)的生物传感器。通过电化学阻抗谱探究了 S-59 在 Q235 碳钢表面的电化学反应, 并利用 ConA 修饰金电极传感器系统对不同浓度菌液进行检测, 建立了电荷转移电阻(R_{ct})与 S-59 浓度之间的线性关系, 线性检测范围为 $10^3 \sim 10^8$ cfu/mL, 同时验证了该传感器具有较好的特异性、稳定性和重复性。

关键词: 阻抗生物传感器; 凝集素; 缓蚀细菌

中图分类号: O657.11

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2021)09-0241-05

DOI: 10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2021.09.048

Determination of a kind of marine corrosion inhibiting bacteria by impedance biosensor

WANG Zhi-wen, LIANG Hui-guang, LI Yong-juan*, LONG Hai-tao, KONG Peng
(College of Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: An electrochemical sensor for the detection of marine bacteria (S-59) with good corrosion inhibition performance is constructed through self-assembling 11-mercaptoundecanoic acid onto the surface of gold electrode and promoting the immobilization of lectin-Concanavalin A (ConA) by activating carboxyl group with EDC/NHS. The corrosion inhibitory effect of S-59 on Q235 carbon steel surface is investigated by means of electrochemical impedance spectroscopy (EIS). ConA modified gold electrode sensor system is applied to detect different concentrations of bacterial solution. A linear relationship between charge transfer resistance (R_{ct}) and S-59 concentration is established. The linear detection ranges from 10^3 cfu·mL⁻¹ to 10^8 cfu·mL⁻¹. Good specificity, stability and repeatability of the sensor are also verified.

Key words: impedance biosensor; ConA; corrosion inhibiting bacteria

金属材料在一些特殊环境中如海洋、港口、石油平台等使用时, 由于长期浸泡在有水条件下而容易受到腐蚀。为减少腐蚀损失, 人们多采用有机涂层、合金等以达到防锈的效果^[1-5], 但这些方法常常会对环境释放毒性物质而且处理费用较高, 因此生物基防腐蚀材料以可降解、再生、毒性低等特性, 逐渐受到人们的青睐, 利用细菌及其代谢产物制成的生物制品来减缓金属腐蚀成为了近年来研究的热点^[6-8]。尽管缓蚀细菌为未来金属材料防护技术的开发提供了新的思路, 但是要制备具有高效缓蚀作用的生物缓蚀剂还要实现细菌数量的快速检测, 了解不同浓度条件下细菌缓蚀能力的差别。细菌数量的检测方法有传统的培养法、光学检测和电化学检测等, 传统的培养法耗时较长, 浪费人力; 光学法对被测的样品要求较高, 检测结果也不够准确; 而电化学检测技术由于具有检测快速、重复性好等优点已

经被用于临床医学、食品卫生等领域的微生物检测^[9-11], 尤其阻抗生物传感器具有不需纯化样品、不用示踪标记物、分析快速灵敏等优点, 广泛用于生物传感领域^[12-14]。

本课题组从青岛海域挂片实验的碳钢表面分离出 1 株弧菌(S-59), 与之前报道的具有高度缓蚀作用的新喀里多尼亚弧菌^[7]具有 >98% 的相似性, 因此本文中对该弧菌(S-59)的生长性能、缓蚀性能等进行分析, 并采用金电极自组装膜固载凝集素分子, 通过电化学阻抗技术对该弧菌的数量检测进行初步研究, 为制备高效、环保的生物金属缓蚀剂奠定基础。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

高温高压灭菌锅(上海一恒科技有限公司);

收稿日期: 2020-10-23; 修回日期: 2021-06-29

基金项目: 甘肃省大学生创新创业训练计划项目(201610733003)

作者简介: 王治文(1994-), 男, 本科生; 李永娟(1982-), 女, 博士, 高级实验师, 研究方向为生物电化学, 通讯联系人, flyinglyj@126.com。

LRH-70 生化培养箱(上海精宏实验设备有限公司);振荡培养箱(上海跃进医疗器械有限公司);SW-CJ-2FD 型超净工作台(上海申安医疗器械厂);JJ1000 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);CHI660E 电化学工作站(上海辰华仪器有限公司);UV-3802 紫外-可见分光光度计(上海奥普勒仪器有限公司);电热恒温培养箱(湖北恒丰医疗器械有限公司);KQ5200B 超声波清洗机(上海精密仪器有限公司)。

11-巯基十一烷酸(MUA)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、*N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、凝聚素(ConA)均购自北京百灵威科技有限公司,其他试剂[无水乙醇、酵母膏、蛋白胨、 $K_3Fe(CN)_6$ 、 H_2SO_4 、 HCl 、 $K_4Fe(CN)_6$ 、 Na_2HPO_4 、 NaH_2PO_4 、 $CaCl_2$ 、 $NaCl$ 、 KCl 等]均为分析纯,实验用水为超纯水。

1.2 实验方法

1.2.1 弧菌样品的制备

本实验所用弧菌样品(S-59)从青岛海域挂片实验 14 d 的碳钢表面附着微生物中分离获得,所用海水培养基为人工海水与培养基 1:1 配成,实验前将液体海水培养基及实验所需的试管、移液枪、枪头在高温高压蒸汽灭菌锅中 121℃ 下高温灭菌 20 min,冷却后紫外灯照射下灭菌 30 min。将原菌液与培养液 1:100 进行接种,即为有菌介质,然后在摇床培养 12 h 后取出放于 4℃ 冰箱备用。菌液稀释采用 PBS 缓冲溶液,细菌数目通过 MPN 计数法获得。

1.2.2 细菌生长曲线的测定

本实验采用比浊法测定弧菌(S-59)的生长曲线。将弧菌(S-59)接种在盛有海水培养基的锥形瓶中,再将接种后的菌液取样,平行 3 组实验,放入恒温摇床中培养,每隔 2 h 取一次样,连续测量 36 h,利用紫外-可见分光光度计测定光密度值($OD_{600\text{nm}}$)确定细菌生长曲线。

1.2.3 阻抗生物传感器的构建

参照文献[12]构建生物传感器。首先将金圆盘电极(直径 2 mm)用 1.0、0.05 μm 铝粉打磨,每次均用乙醇和超纯水清洗干净,然后用吹风机冷风吹干得到清洁的裸金电极。将裸金电极在 0.05 mol/L 硫酸介质中以 10 V/s 的扫速从 -0.2 ~ 1.6 V 之间循环扫描活化金电极,直至获得稳定的循环伏安图。将预处理过的金电极浸泡在

0.05 mol/L 的 MUA 中 4 h 获得 MUA-Au 电极,清洗电极并干燥后,滴加 5 μL 0.04 mol/L 的 EDC 水溶液和 5 μL 0.01 mol/L 的 NHS 水溶液到电极表面,混合 7 min,然后清洗、干燥;滴加 5 μL 的 ConA 修饰到活化好的电极表面。清洗干燥。

1.2.4 电化学测试

电化学测试均为三电极系统,参比电极为 Ag/AgCl 电极,铂丝作为辅助电极。缓蚀性能测试工作电极为 Q235 碳钢圆盘电极(直径 5 mm),主要成分如下(质量分数):0.1% C、0.4% Mn、0.12% Si、0.02% S、0.05% P,其余成分为 Fe。传感器测试以 PBS 缓冲溶液中添加 5 mmol/L $K_3Fe(CN)_6$ 和 5 mmol/L $K_4Fe(CN)_6$ 作为电解液进行,将预处理的金工作电极浸泡在待测液中 2 h,等微生物结合到电极表面后,测试电化学阻抗谱。阻抗谱测试振幅为 10 mV,频率从 10^{-1} Hz 到 10^5 Hz。

2 结果与讨论

2.1 弧菌(S-59)的生长曲线

图 1 为弧菌(S-59)在培养基中通过浊度法测得的细菌生长曲线。从图中可以看出,0~2 h 为迟缓期,细菌接种后的短暂适应阶段,细菌繁殖较少;2~12 h 为对数增长期,生长速度最快代谢旺盛;14 h 后细菌生长趋于稳定;24 h 后, $OD_{600\text{nm}}$ 值维持在一个相对稳定的范围。由于分光光度法测定对于死亡的菌体也会产生一定的吸光度,因此在图 1 中没有观察到明显的衰亡期。为保证后续实验检测细菌的活动状态和数量,选择将培养至 12 h 的菌液作为检测菌液体系,同时将培养至 12 h 的菌液接种入人工海水中进行腐蚀实验并每 24 h 更换一次菌液。

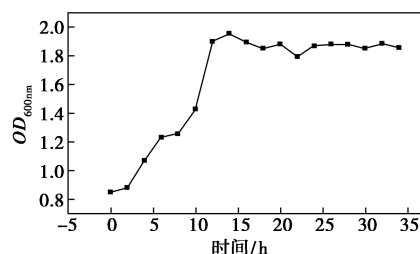


图 1 弧菌(S-59)的生长曲线

2.2 弧菌的缓蚀性能

图 2 为 Q235 碳钢电极在无菌和有菌介质中分别浸泡 1、3、7、14 d 的电化学阻抗谱。从图中可看

出,在连续 14 d 的实验中,Q235 碳钢在有菌介质中的容抗弧半径始终明显大于无菌介质中的容抗弧半径,说明在有弧菌(S-59)存在的情况下,碳钢的腐蚀受到了明显抑制。

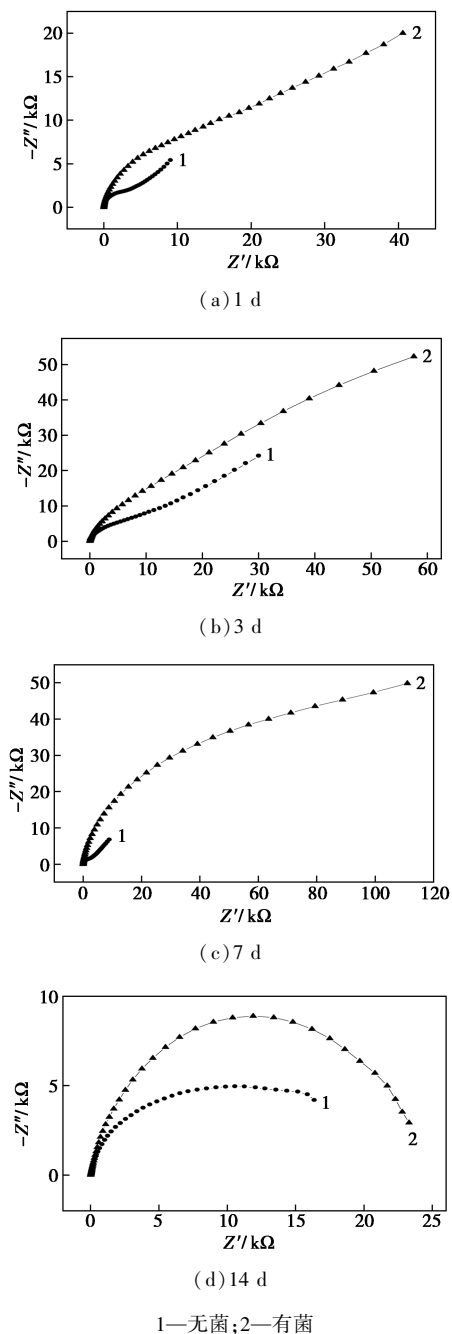


图 2 Q235 钢在无菌和有菌介质中浸泡 1、3、7、14 d 的电化学阻抗谱

2.3 阻抗型传感器的构建与检测

将处理好的裸金电极、MUA-Au 电极、EDC/NHS 活化羧基电极、ConA-Au 修饰电极分别浸泡在 1×10^7 cfu/mL 细菌溶液中 2 h 后进行电化学阻抗测试。从图 3 可以看出,裸金电极、MUA-Au 电极、

EDC/NHS 活化羧基电极、ConA-Au 修饰电极的容抗弧半径依次增大;通过等效电路(图 4)拟合得到的电荷转移电阻 (R_{ct}) 分别为:裸金电极 50Ω ; MUA-Au 电极 125Ω ; EDC/NHS 修饰金电极 132Ω ; CoA-Au 电极 142Ω ,电信号强度依次增强。从以上结果可以看出该巯基自组装电极检测弧菌(S-59)有较高的响应信号。

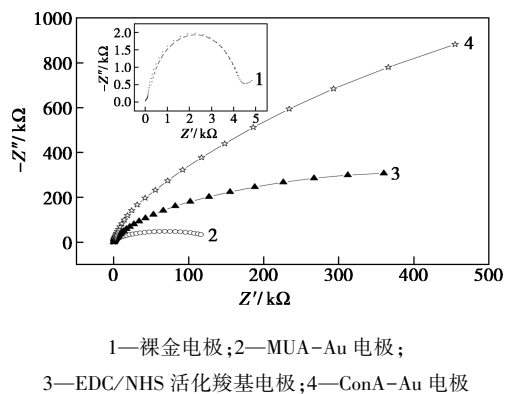


图 3 不同修饰传感器的电化学阻抗谱

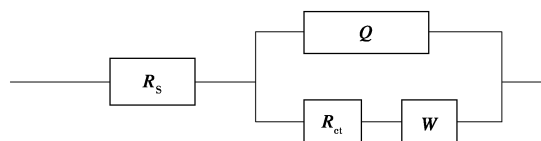
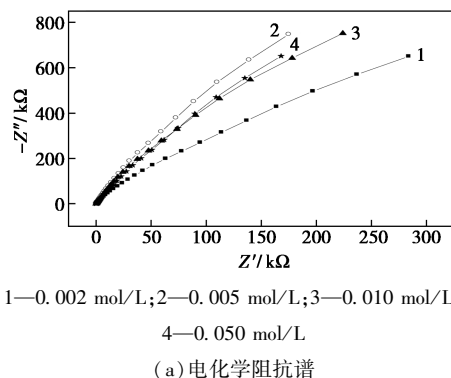


图 4 等效电路

2.4 电化学阻抗型传感器工作条件的优化

2.4.1 MUA 浓度的影响

为获得更好的测试信号,控制其他条件不变,分别将处理好的裸金电极在 0.002、0.005、0.010、0.050 mol/L MUA 中浸泡 4 h,然后依次将修饰固载后的电极置于菌液中进行电化学阻抗检测,结果如图 5 所示。从图中可以明显看出在浓度为 0.005 mol/L MUA 时容抗弧半径最大,通过等效电路拟合得到的 R_{ct} 值也最高,因此选择 0.005 mol/L MUA 来进行分子自组装。



1—0.002 mol/L; 2—0.005 mol/L; 3—0.010 mol/L; 4—0.050 mol/L
(a) 电化学阻抗谱

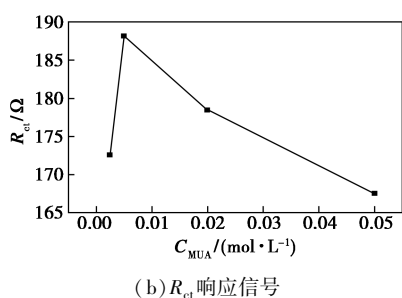
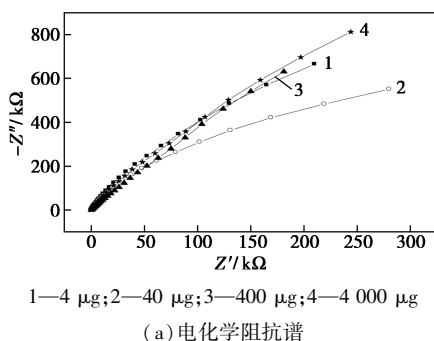


图 5 不同 MUA 浓度自组装金电极的
电化学阻抗响应

2.4.2 凝集素浓度的影响

控制其他条件不变,分别用 4、40、400、4 000 $\mu\text{g/L}$ ConA 来进行电极的固载,然后进行电化学阻抗检测,从图 6 中可看出,在 ConA 浓度为 400 $\mu\text{g/L}$ 时拟合得到的 R_{ct} 最大,电化学响应信号最好,因此选择 ConA 浓度 400 $\mu\text{g/L}$ 为最佳浓度。



1—4 μg ; 2—40 μg ; 3—400 μg ; 4—4 000 μg
(a) 电化学阻抗谱

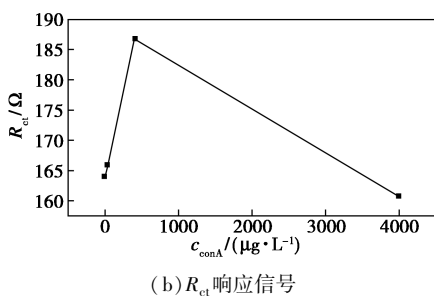
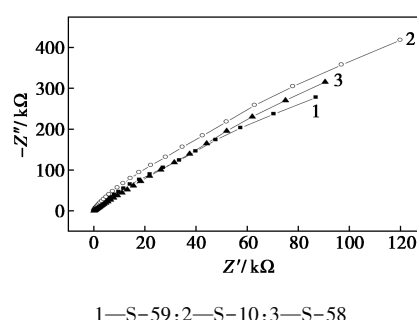


图 6 不同 ConA 浓度修饰金电极的
电化学阻抗响应

2.5 特异性检验

控制其他条件不变,用 ConA 修饰金电极检测弧菌(S-59)、溶藻弧菌(S-10)、副溶藻弧菌(S-58)(均为同批次钢片上分离获得),从图 7 和表 1 中可以看出,ConA 修饰金电极在不同细菌中电化学响应信号不同。S-59 弧菌的响应信号最强,达到了 226 Ω ,而另外 2 种菌的响应值均低于 100 Ω ,这表明该传感器具有很好的检测特异性。



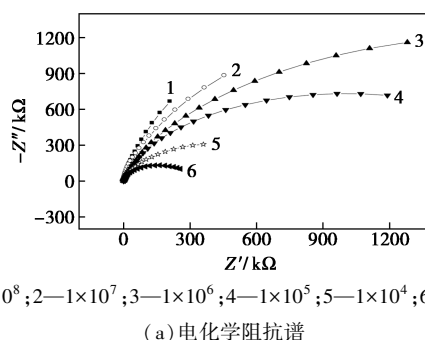
1—S-59; 2—S-10; 3—S-58
图 7 修饰金电极在不同细菌中的电化学阻抗谱

表 1 修饰金电极在不同细菌中的 R_{ct} 响应信号

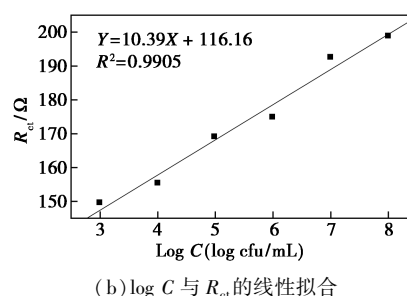
细菌种类	S-10	S-59	S-58
R_{ct}/Ω	93.4	226.65	83.2

2.6 弧菌的检测分析

通过以上条件优化下确定该电化学阻抗型生物传感器的制备条件为:0.005 mol/L MUA、0.4 mol/L EDC、0.1 mol/L NHS、400 $\mu\text{g/L}$ COA,用 PBS 缓冲溶液稀释菌液浓度(C)分别为 1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 cfu/mL 进行修饰金电极的电化学阻抗检测,从图 8 中可以看出,随着弧菌浓度的增加,电化学阻抗谱的容抗弧半径逐渐增大,通过等效电路拟合得到不同浓度下的 R_{ct} 值,将 $\log C$ 与 R_{ct} 做图得到弧菌浓度与 R_{ct} 之间的线性函数关系式为 $R_{ct} = 10.39 \times \log C + 116.16$,相关系数 $R^2 = 0.9905$,表现出良好的线性关系,线性检测范围为 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^8$ cfu/mL。



1— 1×10^8 ; 2— 1×10^7 ; 3— 1×10^6 ; 4— 1×10^5 ; 5— 1×10^4 ; 6— 1×10^3
(a) 电化学阻抗谱



(b) $\log C$ 与 R_{ct} 的线性拟合

图 8 修饰金电极对不同浓度细菌的检测

2.7 重现性与稳定性测试

同时制备5支修饰金电极,在PBS缓冲溶液中对同一浓度的弧菌(S-59)溶液进行检测,结果表明, R_{ct} 的相对标准偏差为6.38%,说明该电极具有较好的重现性;同时将制备好的3支修饰金电极对无菌PBS溶液进行阻抗测试,检测完毕后放入冰箱保存于PBS溶液中,7d后再次进行阻抗测试, R_{ct} 平均响应值下降了7.65%,说明该电极具有较好的稳定性。

3 结论

验证了一株弧菌(S-59)的缓蚀性能,基于自组装膜固载凝集素分子,构建了弧菌(S-59)数量检测的修饰金电极生物传感器,通过对不同浓度弧菌(S-59)进行阻抗测试,等效电路拟合得到 R_{ct} 值与弧菌(S-59)浓度($10^3 \sim 10^8$ cfu/mL)的对数呈线性关系,同时验证了该传感器的特异性、稳定性和重复性。

参考文献

- [1] Detlinger P, Utri B, do Prado Banczek E. Corrosion resistance of niobium-coated carbon steel[J]. Journal of Bio- and Tribo-Corrosion, 2019, 5: 10-17.
- [2] Awan A, Pasha R A, Butt M S, et al. Corrosion and wear behavior of TiN PVD coated 304 stainless-steel[J]. Journal of Mechanical Science and Technology, 2020, 34: 3227-3232.
- [3] Li Z, Xiao K, Dong C, et al. Atmospheric corrosion behavior of low-alloy steels in a tropical marine environment[J]. Journal of Iron and Steel Research International, 2019, 26: 1315-1328.
- [4] Ollik K, Lieder M. Review of the application of graphene-based coatings as anticorrosion layers[J]. Coatings, 2020, 10(9): 883-909.
- [5] Ammar S, Ma I A W, Muhammad F M S, et al. Electrochemical studies of 1,2,3-Benzotriazole inhibitor for acrylic-based coating in different acidic media systems[J]. Journal of Polymer Research, 2020, 27(6): 142-150.
- [6] Guo N, Wang Y, Hui X, et al. Marine bacteria inhibit corrosion of steel via synergistic biomineralization[J]. Journal of Materials Science & Technology, 2021, 66: 82-90.
- [7] Masoumeh M, Song Z, Tao X. Introducing a novel bacterium, *Vibrio neocaledonicus* sp., with the highest corrosion inhibition efficiency[J]. Electrochemistry Communications, 2015, 51: 64-68.
- [8] 闫涛, 宋振纶, 杨丽景, 等. 新喀里多尼亚弧菌对Cu在人工海水中腐蚀行为的影响[J]. 中国腐蚀与防护学报, 2016, 36(2): 157-164.
- [9] 王刚. 新型电化学传感器能快速完成细菌抗药性检测[J]. 物联网技术, 2020, 10(2): 3.
- [10] 王劲松, 裴振华. 基于聚吡咯阵列/纳米金电化学免疫传感器检测牙周细菌的研究[J]. 山西医科大学学报, 2018, 49(10): 1264-1269.
- [11] 王春皓, 崔传金, 谷学静, 等. 检测金黄色葡萄球菌的微叉指电极阻抗生物传感器研究[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(10): 184-192.
- [12] Wan Y, Zhang D, Hou B. Monitoring microbial populations of sulfate-reducing bacteria using an impedimetric immunosensor based on agglutination assay[J]. Talanta, 2010, 80(1): 218-223.
- [13] Samanta N, Kundu O, Chaudhuri C R. A simple low power electronic readout for rapid bacteria detection with impedance biosensor[J]. IEEE Sensors Journal, 2013, 13(12): 4716-4724.
- [14] Wang Y, Ye Z, Ying Y. New trends in impedimetric biosensors for the detection of foodborne pathogenic bacteria[J]. Sensors: Basel, Switzerland, 2012, 12(3): 3449-3471. ■

巴斯夫 Forward AM 携手极致盛放在上海成立全新增材制造技术中心

巴斯夫 3D 打印品牌 Forward AM 携手中国 3D 打印设计服务公司极致盛放(Xuberance), 在上海成立了全新增材制造技术中心(AMTC), 新的技术中心将汇聚增材制造(AM)解决方案和材料领域的专业知识, 服务于中国和亚洲其他地区的增材制造市场。

Forward AM 能够提供广泛的高性能 3D 打印材料和深厚的设计专知, 而极致盛放则是 3D 打印服务和设计解决方案领域的专家。通过联合成立技术中心, 两家公司实现了优势互补, 为本土客户提供更全面的 3D 打印解决方案。

增材制造技术中心成立后有望为客户提供全新的增值技术服务, 与亚太区客户实现共同创新。Forward AM 为该中心配备了 20 多台 3D 打印机, 并使用所有当下主流的 3D 打印技术, 包括: 选择性激光烧结技术、光敏聚合物 3D 打印技术和熔丝制造技术, 以强调对全球主要设备制造商的共同承诺。该中心落户于上海临港松江科技城, 此处汇集了众多增材制造领域的企业, 能充分发挥当地合作伙伴和客户的协同效应。

此外, 巴斯夫风险投资有限公司对极致盛放的投资进一步巩固了 Forward AM 和极致盛放之间的合作关系。该风险投资加强了巴斯夫在增材制造领域的战略推进, 也进一步加快了极致盛放在亚太地区的业务增长。

巴斯夫 3D 打印解决方案有限公司董事总经理 François Minec 表示: “在上海建立全新增材制造技术中心是我们战略规划中的重要一步, 让我们能为亚太区客户提供更全面的 3D 打印服务, 从咨询服务, 到利用我们的高性能材料直接进行部件打印, 以及提供专业设计服务以实现成功的 3D 打印。我们相信, 该增材制造技术中心会成为亚太区增材制造行业的关键枢纽, 增强我们与客户共同创新的能力。”

极致盛放总经理王蕾补充道: “巴斯夫 Forward AM 拥有先进材料和对行业的深厚专知, 尤其是力学仿真和表面处理技术, 这将与我们的服务和设计能力形成积极有益的互补。我们很荣幸能与巴斯夫共同为客户开发一体化、创新的增材制造解决方案, 从而满足亚太客户的不同需求。” (马春宇)