

doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2015.01.023

基于微流控芯片的圆褐固氮菌浓度快速检测方法*

郭建江^{1,2} 张荣标¹ 杨宁¹ 徐佩锋¹

(1. 江苏大学电气与信息工程学院, 镇江 212013; 2. 常州工学院电子信息与电气工程学院, 常州 213002)

摘要: 针对当前微生物肥料中圆褐固氮菌浓度检测方法耗时长、自动化程度低等缺点, 提出了一种基于微流控芯片的圆褐固氮菌浓度检测方法。设计了具有自动进样、混合稀释以及电化学循环伏安检测等功能的微流控芯片, 构建了微流控检测系统实验平台, 优化了系统中的进样速度、扫描速率等工艺参数, 并对检测系统的性能指标进行了实验验证。结果表明, 与国标平板计数法相比, 所提出方法不仅能够满足微生物肥料检测的精度要求, 而且具备较快的检测速度及较高的检测自动化程度。

关键词: 微生物肥料 圆褐固氮菌 微流控芯片 快速检测

中图分类号: TP2; S144 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2015)01-0155-05

Rapid Detection of *Azotobacter chroococcum* Concentration Based on Microfluidic Chip

Guo Jianjiang^{1,2} Zhang Rongbiao¹ Yang Ning¹ Xu Peifeng¹

(1. School of Electrical and Information Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

2. School of Electronic Information and Electric Engineering, Changzhou Institute of Technology, Changzhou 213002, China)

Abstract: Aiming at the problem that the concentration detection of *Azotobacter chroococcum* in microbial fertilizer suffers from time-consuming and low automation level, a detecting method of *Azotobacter chroococcum* concentration based on microfluidic chip was proposed. A dedicated microfluidic chip with automatic sample injecting, dilution and cyclic voltammetry detection was designed, and the experiment platform based on microfluidic detection system was built. The optimum scan rate and feed rate of concentration detection in the microfluidic detection system were determined, and the performance index of the system was experimentally verified. Experiment results showed that, compared with plate counting method, the proposed method met the requirement of microbial fertilizer detection and realized rapid detection with increased automation.

Key words: Microbial fertilizer *Azotobacter chroococcum* Microfluidic chip Rapid detection

引言

微生物肥料以其改良土壤、增加产量、提高农作物品质且保护环境等优点而成为当前土壤肥料的研究重点^[1-4]。其中圆褐固氮菌(简称固氮菌)是微生物复合肥料中一种常用的重要组分。当前微生物肥料(简称菌肥)的菌种鉴别、浓度检测等检测环节是菌肥质量控制的关键,也是当前研究的热点。常用菌肥检测方法有平板计数法^[5]、图像检测法^[6]和

分子生态学法^[7-8]等,其中平板计数法、图像检测法需要对菌肥样本进行增菌培养,耗时长;分子生态学法检测精度高,但工艺复杂,以上检测方法都存在自动化程度较低、难以快速检测的缺点,严重制约微生物肥料的研究、生产和推广应用。

以微机电加工(MEMS)为基础的微流控检测技术将生化样品检测中的进样、反应以及检测等过程集成到微小芯片上构建“芯片实验室”,具有微型化、自动化的特点,是当前微生物检测领域的一项国

收稿日期: 2014-03-06 修回日期: 2014-05-12

* 江苏省自然科学基金资助项目(BK20131250)和江苏省高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)(苏政办发(2011)6号)

作者简介: 郭建江, 博士生, 常州工学院副教授, 主要从事农业电气化与自动化研究, E-mail: 474820848@qq.com

通讯作者: 张荣标, 教授, 博士生导师, 主要从事自动化与智能检测技术研究, E-mail: zrb@ujs.edu.cn

际前沿技术。微流控芯片上微生物浓度检测主要采用光学检测法和电化学检测法。光学检测法灵敏度高,但设备复杂成本高,而电化学检测方法灵敏度高,体积小,装置简单,易于微型化与自动化^[9-13]。

本文提出一种基于微流控芯片的固氮菌浓度快速检测方法,并对所提出的方法进行实验验证。

1 固氮菌微流控检测系统

1.1 固氮菌电化学检测机理

电化学循环伏安法是一种常用的微生物浓度检测方法,在液态培养基中微生物会通过细胞外新陈代谢实现自身与电化学检测电极之间的电子传递,从而在检测电路中形成电流。理论上微生物的能量增益为

$$\Delta G = -nFE_{emf} \quad (1)$$

式中 n ——反应中发生转移的电子数量

F ——法拉第常数

E_{emf} ——电子供体与受体间的电势差^[14]

微生物新陈代谢往往是吸收电子获得能量,因此产生的电子流动不同于化合物离子产生的电极反应电流,电极反应是完全不可逆过程。对于完全不可逆的电极反应,电化学极化和浓差极化同时存在。循环伏安法扩散方程的第2个边界条件为

$$\frac{i}{FA} = D_o \left(\frac{\partial C_o(x,t)}{\partial x} \right) = k^0 C_o(x,t) \exp \left(-\frac{\alpha F}{RT} (E(t) - E^0) \right) \quad (2)$$

式中 i ——电极电流

A ——电极的真实面积

D_o ——微生物的扩散系数

$C_o(x,t)$ ——离电极 x 位置的微生物浓度

E^0 ——形式电势

k^0 —— E^0 下的标准反应速率常数

α ——电极反应传递系数

R ——气体常数 T ——绝对温度

$E(t)$ ——电极电势

令 $b = [\alpha F / (RT)] v$, 电极电流 i 同无因次电流函数 $\pi^{1/2} \chi(bt)$ 之间存在关系

$$i = FAC_o^* D_o^{1/2} v^{1/2} \left(\frac{\alpha F}{RT} \right)^{1/2} \pi^{1/2} \chi(bt) \quad (3)$$

式中 v ——电极扫描速率

C_o^* ——样本中微生物浓度

由式(3)可知,电极电流 i 正比于 C_o^* 和电极扫描速率的平方根 $v^{1/2}$ 。在 $\chi(bt)$ 有最大值时得电极峰值电流 i_p 为

$$i_p = 2.99 \times 10^5 \alpha^{1/2} AC_o^* D_o^{1/2} v^{1/2} \quad (4)$$

定义检测常数 $K = 2.99 \times 10^5 (\alpha D_o)^{1/2} A$, 则有

$$C_o^* = \frac{i_p}{Kv^{1/2}} \quad (5)$$

由式(5)可知,对于具有确定检测常数 K 的检测平台,当电极扫描速度 v 一定时,电极峰值电流 i_p 与样本中微生物浓度呈正比。即可通过循环伏安法检测电极峰值电流,实现对样本中微生物浓度的测量。

1.2 微流控芯片设计

为了满足微流控系统对样本中固氮菌浓度的快速检测要求,为设计的微流控芯片构建了具有自动进样、混合稀释以及电化学循环伏安检测功能的结构,如图1所示。a区为芯片自动进样区,设计为Y型通道,通过注射泵同时注入无菌蒸馏水和固氮菌样本实现自动快速进样;b区为混合稀释区,主要用于混合稀释得到不同浓度的固氮菌合成样本,混合稀释是微流控电化学检测的关键环节,混合稀释不充分会导致检测数据产生较大的检测误差,芯片设计为内肋形微混合结构,课题组在文献[15-16]中实验验证了此微混合结构可对进入通道的同相流体产生有效拉伸和折叠,相对于主动式混合方式,具有混合速度快、混合效率高等优点,是目前微流控芯片中常用的混合方式之一^[15]。c区为电化学检测区,由于芯片电极属于微尺度超微电极,因此将3电极简化为2电极电化学检测体系,如图1所示c区,研究电极(W)和辅助参比电极(R/C)布置在通道两侧,设计为双排多电极结构,电极材料为透明半导体氧化锡锡(ITO),单个微电极宽度 $400 \mu\text{m}$, F 为废液区。

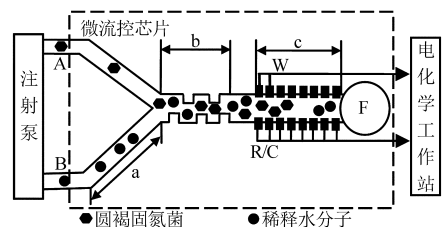


图1 微流控检测实验平台原理图

Fig. 1 Principle diagram of microfluidic detection experiment platform

芯片实物照片如图2所示,芯片材料为聚二甲基硅氧烷(PDMS),粘合在玻璃基片上。芯片微通道体积设计为 $5.43 \times 10^{-3} \text{ mL}$ 。该芯片设计采用自动注射进样、被动式快速混合以及2电极电化学检测体系结构,不仅减少造成检测误差的因素,而且提高了检测自动化程度。

1.3 微流控检测系统实验平台

系统实验平台原理框图如图1所示,包括双通道注射泵(速度 $0.098 \mu\text{m}/\text{步}$, CVs 流量精度小于1%)、微流控芯片和电化学工作站(上海辰华

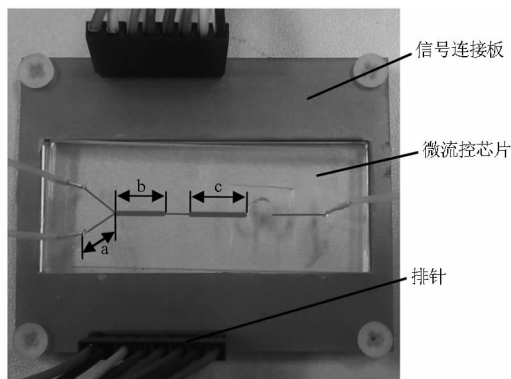


图 2 微流控芯片照片

Fig. 2 Photo of microfluidic chip

CHI660E 型, 电流测量下限小于 10^{-11} A。可直接用于超微电极上的稳态电流测量)。在进行固氮菌浓度检测时, 注射泵通过不同容量的微量注射器将无菌蒸馏水和固氮菌样本以一定的进样速度注入芯片微通道。通过芯片混合区稀释合成不同浓度的检测样本进入电化学检测区, 芯片中的研究电极 W、辅助参比电极 R/C 和固氮菌样本菌液组成电化学极化测量回路, 通过电化学工作站循环伏安法扫描得到检测电极峰值电流与样本中固氮菌浓度之间的定量关系。

2 实验方法

圆褐固氮菌属于菌肥重要组成成分, 国家标准采用平板计数法作为圆褐固氮菌浓度的检测方法, 有效活菌数检出限指标为 2×10^8 CFU/mL^[5]。其具体方法是将检测样本接种在高温灭菌培养基上^[5], 放入恒温振荡培养箱 (37°C , 200 r/min) 中 48 h 完成增菌培养, 然后采用平板菌落计数得到样本固氮菌浓度。平板计数法检测精度高, 但是耗时长, 检测效率低。

实验所用的圆褐固氮菌种由广东省微生物研究所提供。将菌种调配成固氮菌溶液, 并采用平板计数法获得固氮菌浓度为 1.2×10^8 CFU/mL 的样本, 取 1 mL 样本以及定量稀释的蒸馏水同时注入微流控芯片进行混合稀释以及固氮菌浓度检测, 检测后取废液区样本进行平板菌落计数, 获得该条件下样本检测电极峰值电流与固氮菌浓度的定量对应关系。

实验先对微流控检测系统主要条件参数进行测定优化, 然后在最优检测条件下对系列浓度的固氮菌样本进行微流控循环伏安法检测, 建立检测电极峰值电流与样本中固氮菌浓度之间定量关系曲线, 并确定检出限, 最后取任意浓度的固氮菌样本, 采用微流控检测方法对比平板计数法检测, 验证该微流控检测系统检测性能的优劣。

3 结果与讨论

3.1 系统主要条件参数测定与优化

固氮菌微流控检测系统的主要检测条件参数包括进样速度、电压扫描速率以及样本 pH 值等。实验分取 1 mL 菌液与 1.6 倍稀释量的蒸馏水注入微流控芯片混合稀释得到固氮菌参数测定样本, 分别采用不同条件参数进行循环伏安法检测, 确定系统在最佳检测效果下的条件参数。

3.1.1 进样速度

自动进样是微流控系统检测的开端, 其进样速度直接影响系统后续的混合稀释效果和电化学检测精度及效率。进样速度过慢混合稀释充分, 但检测效率会大大降低; 进样速度过快则会造成混合稀释不完全从而带来较大的检测误差。参数测定实验采用 $0.20 \sim 0.03 \text{ mm/s}$ 共 7 种进样速度对检测样本进行循环伏安法检测, 图 3 结果表明进样速度小于 0.08 mm/s 后, 检测样本的电极峰值电流变化不明显, 说明采取此进样速度系统的混合稀释效果较好, 此时固氮菌样本浓度检测误差较小。因此可确定系统最佳进样速度为 0.08 mm/s 。

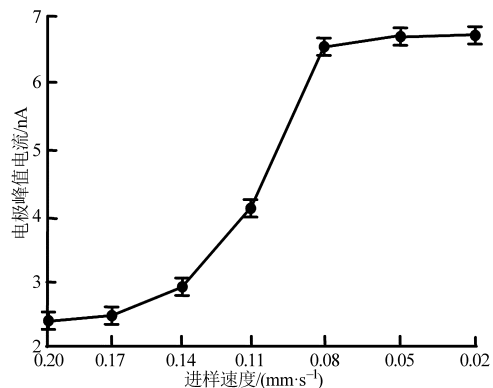


图 3 电极峰值电流随进样速度的变化

Fig. 3 Electrode peak current vs. feedrate

3.1.2 电压扫描速率

由式(4)可知, 对于具有确定浓度的固氮菌样本, 检测电极电流峰值 i_p 与电压扫描速率的平方根 $v^{1/2}$ 呈正比, 即提高电压扫描速率可以提高电极电流峰值从而提高检测灵敏度, 且超微电极在较高电压扫描速率时溶液欧姆压降和双电层充电电流较小, 由此导致的电极峰值电流检测误差也较小。实验中采用 $30, 50, 70, 90, 100, 110, 130 \text{ mV/s}$ 共 7 种电压扫描速率对检测样本进行循环伏安法检测, 图 4 显示样本检测电极电流峰值 i_p 与电压扫描速率 v 的平方根呈正比例关系, 当扫描速率大于 100 mV/s 时, i_p 变化不明显, 说明此时电压扫描频率对固氮菌浓度检测精度影响较小, 因此可确定系统最佳扫描速率为 100 mV/s 。

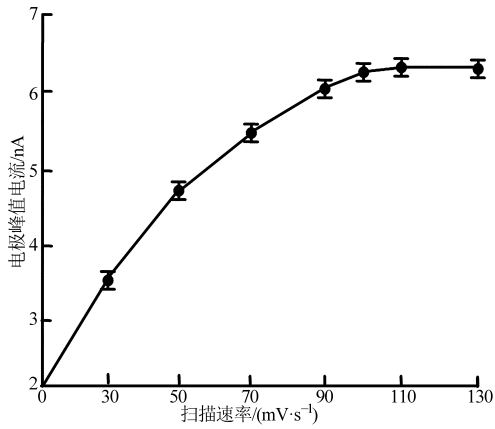


图4 电极峰值电流随电压扫描速率的变化

Fig. 4 Electrode peak current vs. voltage scan rate

3.1.3 pH值

检测样本 pH 值的改变会影响固氮菌的生长代谢,从而改变样本中固氮菌浓度。微流控芯片内样本容量多为 nL,微小的 pH 值变化会引起检测电极电流峰值变化。实验分别取 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 共 6 种不同 pH 值蒸馏水与固氮菌检测样本分别注入微流控芯片混合后进行循环伏安法检测。如图 5 所示,当 pH 值为 7.0 时检测电极峰值电流最高,表明此 pH 值对样本固氮菌浓度检测误差最小。

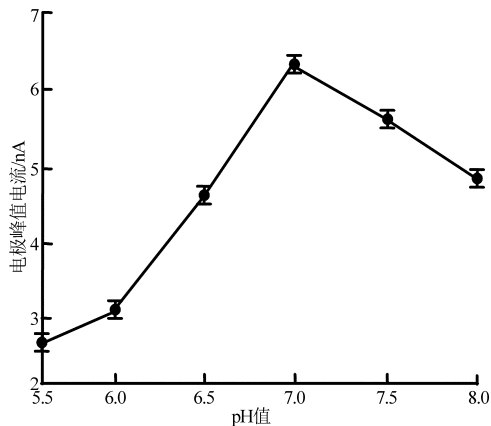


图5 电极峰值电流随样本 pH 值的变化

Fig. 5 Electrode peak current vs. pH value of samples

3.2 系统性能分析与验证

微流控检测系统性能指标主要体现在检测精度、检测速度以及自动化程度等方面。本文利用测定获得的系统最佳检测条件参数对不同浓度固氮菌样本作出检测结果分析,并与菌肥检测国家标准的平板计数法进行比较验证。

图 6 为最佳检测条件下参数测定样本固氮菌浓度检测循环伏安图。从图中可以看出只有阴极峰值无阳极峰值,属于完全不可逆电化学过程,可确定样本中只存在同一微生物菌种,且扫描 3 次后阴极电极峰值电流变化不大,平均值为 6.3 nA,检测后取

废液区菌液平板菌落计数得该样本固氮菌浓度为 7.6×10^7 CFU/mL,可确定此样本检测的电极峰值电流对应的固氮菌浓度为 7.6×10^7 CFU/mL。

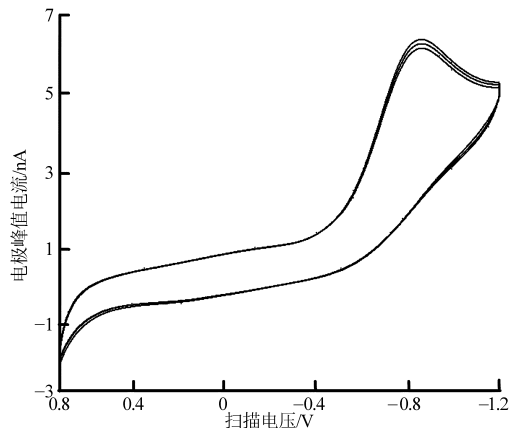


图6 固氮菌浓度检测循环伏安图

Fig. 6 Cyclic voltammograms of concentration detectin of *Azotobacter chroococcum*

取 1 mL 固氮菌浓度为 1.2×10^8 CFU/mL 的样本和 9 种稀释倍数蒸馏水分别注入微流控芯片混合稀释得到 9 种不同浓度的固氮菌检测样本,在系统测定的最佳条件参数下进行循环伏安法定量检测,得到检测电极峰值电流与样本中固氮菌浓度定量关系,如图 7 所示。结果表明测定固氮菌浓度在 $5.8 \times 10^6 \sim 1.2 \times 10^8$ CFU/mL 范围内,检测电极峰值电流与固氮菌浓度呈线性关系,检测线性回归模型为 $y = 1.169 + 0.066x$,相关系数为 0.983,当固氮菌浓度小于 5.8×10^6 CFU/mL 时,系统检测电极峰值电流变化已经不明显,故检出限可确定为 5.8×10^6 CFU/mL。

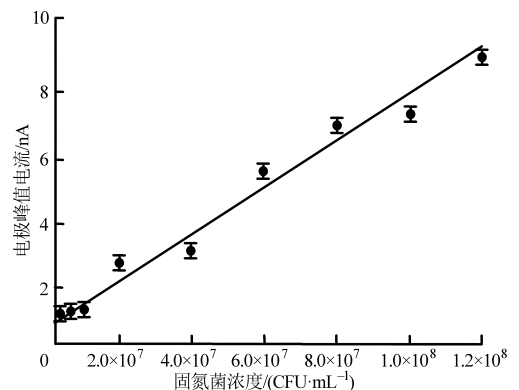


图7 电极峰值电流随固氮菌浓度的变化

Fig. 7 Detect peak current vs. concentration of *Azotobacter chroococcum*

为了分析验证所设计的微流控系统的检测性能,分别取 1 mL 固氮菌浓度为 1.2×10^8 CFU/mL 的样本以及 12 种稀释比例的蒸馏水同时注入微流控芯片进行固氮菌浓度检测,将检测结果与国标平板计数法检测结果进行相关度分析。图 8 为采用 2 种方法进行圆褐固氮菌浓度检测获得的结果散点图。

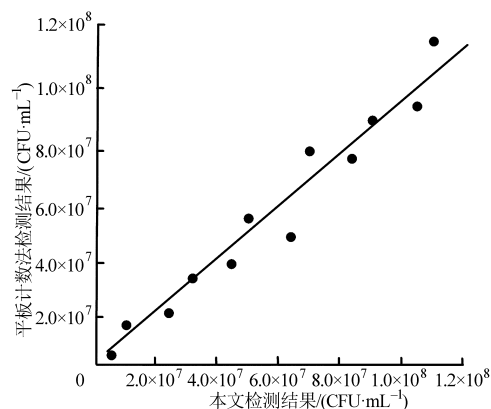


图 8 本文方法与平板计数法回归分析

Fig. 8 Regression analysis for proposed method and plate counting method

运用回归分析法得到两组数据的相关系数达 0.972。此数据表明,本文所提出方法与国标平板计

数法相比,在检测精度上基本相同,且检测时间约为 30 min,大大少于平板计数增菌培养 48 h,实现了固氮菌浓度的快速检测。

4 结束语

本文将圆褐固氮菌浓度检测中进样、稀释以及电化学循环伏安检测等环节集成于专用微流控芯片上,建立了微流控检测系统,并对检测中的进样速度、扫描速率等条件参数进行了测定与优化,与国标平板计数法相比,检测精度基本相同,满足了农业微生物肥料生产和应用检测的精度要求,同时由于检测过程的快速自动进行,避免了检测中的人工增菌培养,使得检测时间减少到约为 30 min,实现了农业微生物肥料浓度的快速检测,所提出的方法为微生物肥料自动化生产和应用设备的研制提供了参考。

参 考 文 献

- 刘鹏,刘训理. 中国微生物肥料的研究现状及前景展望[J]. 农学报,2013,3(3): 26-31.
Liu Peng, Liu Xunli. Current research status and prospect of microbial fertilizer in china[J]. Journal of Agriculture, 2013,3(3): 26-31. (in Chinese)
- Mohammadi K, Heidari G, Khalesro S, et al. Soil management, microorganisms and organic matter interactions: a review[J]. African Journal of Biotechnology, 2012, 86(10): 19840-19849.
- 李俊,姜昕,李力,等. 微生物肥料的发展与土壤生物肥力的维持[J]. 中国土壤与肥料,2006(4): 1-5.
Li Jun, Jiang Xin, Li Li, et al. Development of microbial fertilizer and maintaining of soil biological fertility[J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2006(4): 1-5. (in Chinese)
- 刘丽丽. 微生物肥料的生物学及生产技术[M]. 北京:科学出版社, 2008.
- GB 20287—2006 农用微生物菌剂[S]. 2006.
- 张荣标,黄义振,孙晓军,等. 基于图像处理的圆褐固氮菌浓度快速检测方法[J]. 农业机械学报, 2012, 43(10): 174-178.
Zhang Rongbiao, Huang Yizhen, Sun Xiaojun, et al. Rapid detection of azotobacter chroococcum concentration based on image processing[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2012,43(10): 174-178. (in Chinese)
- 李武,王凌华,赵勇,等. 分子生态学方法在微生物肥料质量监测中的应用[J]. 微生物学通报,2006(1): 53-58.
Li Wu, Wang Linghua, Zhao Yong, et al. The use of molecular ecological methods in the quality control of biofertilizers[J]. Microbiology China,2006(1): 53-58. (in Chinese)
- 李朔. 利用 DGGE 法研究微生物肥料培养过程中菌群的变化[D]. 北京:北京化工大学, 2012.
- Settingington E B, Alocilja E C. Rapid electrochemical detection of polyaniline-labeled Escherichia coli O157: H7[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2011, 26(5): 2208-2214.
- Foudeh A M, Didar T F, Veres T, et al. Microfluidic designs and techniques using lab-on-a-chip devices for pathogen detection for point-of-care diagnostics[J]. Lab on a Chip, 2012, 12(18): 3249-3266.
- Velusamy V, Arshak K, Korostynska O, et al. An overview of foodborne pathogen detection: in the perspective of biosensors[J]. Biotechnology Advances, 2010, 28(2): 232-254.
- Choi J, Sung J H, Shuler M L, et al. Investigation of portable in situ fluorescence optical detection for microfluidic 3D cell culture assays[J]. Optics Letters, 2010, 35(9): 1374-1376.
- Boehm D A, Gottlieb P A, Hua S Z. On-chip microfluidic biosensor for bacterial detection and identification[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2007, 126(2): 508-514.
- Korneel Rabaey. Bioelectrochemical systems: from extracellular electron transfer to biotechnological application[M]. London: IWA Publishing, 2010.
- 杨宁,张荣标,徐佩锋,等. 基于微流控芯片的乳胶免疫凝集光电检测方法[J]. 仪器仪表学报, 2013, 34(6): 1395-1400.
Yang Ning, Zhang Rongbiao, Xu Peifeng, et al. Latex immunoagglutination photoelectric detection based on microfluidic device [J]. Chinese Journal of Scientific Instrument,2013,34(6): 1395-1400. (in Chinese)
- 杨宁. 电控混合微流控芯片免疫凝集定量检测关键技术研究[D]. 镇江:江苏大学, 2013.