

2019-06-25

Electrochemical Biosensors for Wastewater-Based Epidemiology

Yu-wei PAN

Kang MAO

Franziska TUERK

Zhu-gen YANG

School of Engineering, University of Glasgow, Glasgow G12 8LT, United Kingdom; Cranfield Water Science Institute, Cranfield University, Bedfords, MK 43 0AL, UK., zhugen.yang@cranfield.ac.uk

Recommended Citation

Yu-wei PAN, Kang MAO, Franziska TUERK, Zhu-gen YANG. Electrochemical Biosensors for Wastewater-Based Epidemiology[J]. *Journal of Electrochemistry*, 2019 , 25(3): 363-373.

DOI: 10.13208/j.electrochem.181050

Available at: <https://jelectrochem.xmu.edu.cn/journal/vol25/iss3/8>

This Review is brought to you for free and open access by Journal of Electrochemistry. It has been accepted for inclusion in Journal of Electrochemistry by an authorized editor of Journal of Electrochemistry.

DOI: 10.13208/j.electrochem.181050

Artical ID:1006-3471(2019)03-0363-11

Cite this: *J. Electrochem.* 2019, 25(3): 363-373

Http://electrochem.xmu.edu.cn

电化学生物传感器在污水分析及 污水流行病学中的应用进展

潘昱韡¹, 毛 康¹, Tuerk Franziska¹, 杨竹根^{1,2*}

(1. School of Engineering, University of Glasgow, Glasgow G12 8LT, United Kingdom;

2. Cranfield Water Science Institute, Cranfield University, Bedford, MK 43 0AL, UK)

摘要:近年来,污水流行病学(wastewater-based epidemiology, WBE)已被证明是用来监测社区毒品滥用和公共健康的一种有效评估方法,该方法通过定量分析指定社区污水回收站中污水的药物残留或者代谢物来反推社区中人们对毒品的消耗量并结合指定社区的人口数量对其进行归一化处理.电化学生物传感器具有响应时间快、成本低、分析样品需求量小、数据分辨率高以及能够现场快速测试等特点,已被广泛应用于疾病快速诊断、环境污染监测、食品安全以及毒品检测等领域.液相色谱-质谱联用是分析污水中的毒品及其代谢物的主要方法,但随着传感技术尤其是电化学传感器近来的快速发展,也开始被用于研究污水传染病学并可实现现场快速测量.本文综述了电化学生物传感器在污水中无机污染物(如重金属)、有机污染物(如农药、毒品)、生物分子(如 DNA)以及细菌等微生物分析中的最新进展,同时还论述了目前电化学传感器技术在污水流行病学领域的应用和未来所面临的主要挑战.

关键词:污水流行病学;电化学分析;生物传感器;毒品滥用;公众健康

中图分类号: O646

文献标识码: A

以污水为目标的分析和处理以及再生利用是分析化学和环境科学领域重要的课题,而污水中特定目标物的定量和定性评估尤为重要.近年来,用污水流行病学(wastewater-based epidemiology, WBE)来评估污水中标记物,即分析特定城市排出的污水中药物的代谢物来预知该城市中人群对某种毒品的消耗情况,已被证明是一种用于对特定目标物(如毒品)使用趋势进行经济有效评估的方法,且受到了公众的日益关注.例如,2018年《Nature》发表了一篇题为《中国扩大检测污水范围以监控毒品滥用》的文章^[1],文章介绍北京大学李喜青课题组与中国公安部门合作,成功地利用污水流行病学来评估污水中的毒品,从而评估所在区域的毒品滥用趋势.不仅如此,他们还成功地利用污水验毒技术,抓获吸毒贩毒人员.相较于目前世界上很多国家只是把污水分析结果用于流行病学研究,李喜青教授课题组最早将该技术从实验室引入到禁毒实务中.

污水流行病学的概念首先由意大利马里奥·内格里药物研究所的 Zuccato 等人提出^[2],该方法通过分析某一特定区域中进入污水回收站中的尿液和粪便里药物残留物和/或代谢物来评估该社区中人们对药物(如可卡因)的消耗. Zuccato 等人^[2]于 2004 年首次采用质谱对意大利的 4 个污水厂的可卡因代谢物进行了定量分析,揭示了居住在污水厂附近人群的可卡因的使用趋势.此后, Zuccato 等人^[3-5]又对欧洲毒品滥用比较严重的国家(如意大利、瑞士和英国等)进行同样的分析,利用该方法估算了几种较为常见毒品(冰毒、安非他命类、可卡因和大麻)的消耗量,并将得到的结果和联合国毒品与犯罪署发布的世界毒品报告(UNODC, 2006)中有关这 3 个国家对毒品滥用情况的百分比数据进行了比较.结果发现,用污水流行病学计算得到的毒品滥用水平,与经过社会调查得出的毒品滥用人口的分布趋势基本吻合^[5].在意大利米兰、瑞士卢加诺和英国伦敦这 3 个城市中,可卡

因等毒品的用量和这些国家各种毒品的使用人口存在明显的对应关系。

在过去十几年中, 相关研究人员分析了污水处理厂收集的污水中的各种化学药品, 如非法药物、处方药和新的药理活性物质, 旨在评估如非法药物、烟草和酒精等化学药品在社区内的使用趋势。用于评估药物使用趋势的分析工具主要是基于质谱的技术, 如液相色谱-质谱联用, 这是由于质谱技术具有较好的灵敏度和选择性。例如, 为了定量分析存在于污水中的各类有机化学物质或其代谢物, 首先对污水样本进行有效的浓缩和纯化(如采用固相萃取), 再结合目标物的氘代内标或者 C14 内标进行质谱的定量分析。

如上所述, 虽然这些传统分析技术具有一些优势, 但它们耗时且依赖于昂贵的仪器, 通常需要训练有素的技术人员进行数据采集和分析, 只能仅仅局限于实验室, 且基于质谱复杂的样品预处理不能满足对野外环境样本的实际检测需求。研究人员常使用液相质谱串联质谱对污水中有机目标物进行分析, 复杂的样品纯化过程、昂贵的仪器设备和对训练有素人员的培训训练都会增加分析过程的经济成本。此外, 在某些情况下, 人们也需要及时了解污水中的污染物随时间和地点的动态变化, 因而传统的实验室分析方法不能满足污水实时监测的需要。此外, 还需要降低污水流行病学评估过程的不确定性, 例如, 某些目标物的化学稳定性低, 在样本运输过程中可能会降解从而导致分析结果不准确。如果能开发针对污水中目标物的快速监测工具, 就可以最大限度地减少分析结果的不确定性。综上所述, 为了现场快速分析污水进行污水流行病学研究, 开发简单、易用并可实现用极少样本进行各种污染物的高灵敏度高选择性的现场检测的分析测试工具就显得尤为重要。

近年来, 生物传感器作为一种新颖有力的分析工具, 已经在食品安全、药物发现、医疗保健和环境监测领域发挥了越来越重要的作用。生物传感器是一种使用由分离的酶、免疫系统、组织、细胞器或全细胞介导的特定生化反应的装置。在目标物存在的情况下, 目标物跟特定生物受体相互作用, 其会产生如光学信号(比色、荧光、表面增强拉曼光谱等)、质量敏感信号、电化学信号和机械信号等^[6-7]。在这些生物传感器中, 以电化学信号作为响应信号的生物传感器尤其具有响应快、成本

低和能与其他便携设备一起小型化的特点, 可让非技术人员利用极少样品对目标物进行现场测量, 因而受到更广泛的关注。研究表明, 为了评估社区的药品使用趋势和公共健康情况, 该生物传感器在污水中化学药品、生物标志物和病原体的原位定量分析中起着至关重要的作用^[6]。不仅如此, 这种污水传感器还可为政府机构提供用于监测药物使用趋势的实时数据, 并建立有效的早期预警系统用以预防社区传播疾病的爆发。例如, 只金芳等人^[8-9]开发了一系列检测污水生物毒性的电化学生物传感器, 以研究包括重金属离子、苯酚和杀虫剂在内的污染物的单种毒性效应和联合毒性效应。因此, 利用此传感器得到的结果, 能够更合理地反映实际污水中存在的多种污染物的联合毒性效应。此外, 该生物传感器不仅灵敏度高、检测范围广, 而且操作简单, 成本低廉, 便于携带。这为污水毒性的在线检测和建立早期风险预警系统提供了强大的技术支撑。

本文论述了最近 5 年来采用电化学生物传感技术分析污水中各种污染物的研究进展, 以污水中 4 类常见分析物(如表 1 所示)为例, 包括无机离子、有机分子、生物分子以及细菌等微生物, 探讨其在预测社区毒品滥用和公共健康的应用。其中, 无机离子又分为金属离子和非金属离子, 有机分子包括农药、除草剂、药品、毒品以及其他有机小分子。

1 用于检测污水的电化学生物传感器

1.1 无机离子

1) 重金属离子

污水中的重金属污染通常与农业淤泥、化学制造、采矿、化妆品、核废料、金属加工、涂漆和其他工业污水有关。其中, 如铅(Pb)、汞(Hg)、砷(As)和银(Ag)的这些重金属是在环境中不可降解, 且即使在痕量水平也具有高毒性和致癌性。电化学生物传感器因为具有高灵敏度和高选择性, 已经成为检测污染水体中重金属离子的一个重要分析工具。此部分作者重点讨论用于监测重金属的电化学生物传感器。

由于不同的重金属离子能够跟 DNA 中对应的碱基或者某一段序列发生特异性的结合, 形成稳定的结构, 如胸腺嘧啶-二价汞离子-胸腺嘧啶(thymine-Hg²⁺-thymine, T-Hg²⁺-T) 和胞嘧啶-银离子-胞嘧啶(cytosine-Ag⁺-cytosine, C-Ag⁺-C) 结构,

表 1 电化学生物传感器在针对污水中的目标物的检测
Tab. 1 Target analysis based on electrochemical biosensors

Target	Electro-chemical signal	Biometric element	Detection range	Detection limit	Ref.
Heavy metal	CA	Microorganisms	-	-	[8]
Hg ²⁺	SWV/DPV	DNA	10 ~ 160 pmol·L ⁻¹ 50~1 μmol·L ⁻¹	6 pmol·L ⁻¹ 50 pmol·L ⁻¹	[10-11]
Sulfide	DPV	<i>E. coli</i> BL21/SQR	50~5000 μmol·L ⁻¹	2.55 μmol·L ⁻¹	[12]
Cyanide	Potential	Cyanide dihydrate	-	1 nmol·L ⁻¹	[13]
Ametry/Acephate	CA/Ampere	<i>E. coli</i> / <i>B. subtilis</i> / <i>S. cerevisiae</i>	-	-	[8, 14]
Carbofuran	SWV	<i>E. shearii</i> FREI-39	5.0~100.0 μg·L ⁻¹	1.69 μg·L ⁻¹	[15]
Carbamate	Ampere	AChE	-	-	[16]
Thiram	Ampere	Biofilm	-	-	[14]
Methyl parathion	Ampere	Organophosphorus hydrolase	0.1~200 μmol·L ⁻¹ 5.4~116.4 μmol·L ⁻¹	0.1 μmol·L ⁻¹ 29 nmol·L ⁻¹	[17-18]
Malathion	SWV	AChE	0.1~600 μg·L ⁻¹	0.01 μg·L ⁻¹	[19]
Cocaine	EIS	DNA	10~5000 nmol·L ⁻¹	10 n mol·L ⁻¹	[20]
Topotecan	DPV	DNA	-	0.37 μg·L ⁻¹	[21]
Paracetamol	Ampere	<i>B. subtilis</i>	5~630 μmol·L ⁻¹	2.9 mol·L ⁻¹	[22]
3,5-dichloro- phenol	CA/Ampere	<i>E. coli</i> / <i>B. subtilis</i> / <i>S. cerevisiae</i> /Biofilm	-	-	[8-9, 14, 23]
4-chlorophenol	CA/DPV	<i>S. cerevisiae</i> /Laccase	1.0~50 μmol·L ⁻¹	0.7 μmol·L ⁻¹	[9, 24]
Catechol	CA/Ampere	Laccase/Tyrosinase	2.5~50 μmol·L ⁻¹ 0.2~10 μmol·L ⁻¹ 39~250 μmol·L ⁻¹	0.01 μmol·L ⁻¹	[25-27]
Phenol	CA/SWV	<i>S. cerevisiae</i> /Tyrosinase	4.97~61 μmol·L ⁻¹	4.81 μmol·L ⁻¹	[9, 28]
Phenolics	CV	Laccase	5.0~500.0 μmol·L ⁻¹	1.0 μmol·L ⁻¹	[29]
Estradiol	SWV	DNA	1.0~230.0 pmol·L ⁻¹	0.5 fmol·L ⁻¹	[30]
mtDNA	DPV	DNA	10~100 nmol·L ⁻¹	10 pmol·L ⁻¹	[20]
Antigen	DPV	DNA	-	-	[20]
Glucose glutamic acid	Ampere	Activated sludge	1.0~100 mg·L ⁻¹	0.10 mg·L ⁻¹	[32]
Acetate	CV	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	1.0~20 mmol·L ⁻¹	1.0 mmol·L ⁻¹	[33]
Bacteriophage MS ₂	DPV	Antibody	-	6 pfu·L ⁻¹	[34-35]
H ₂ O ₂	Ampere	Peroxidase	0.5~1.5 mmol·L ⁻¹	0.09 μmol·L ⁻¹	[36]

* CA (chronoamperometry, 计时电流法); SWV (square wave voltammetry, 方波伏安法); DPV (differential pulse voltammetry, 微分脉冲伏安法); EIS (electrochemical impedance spectroscopy, 电化学阻抗谱); CV (cyclic voltammetry, 循环伏安法); AChE (acetylcholinesterase, 乙酰胆碱酯酶)

据此而开发出以 DNA 为识别受体的重金属离子检测的生物传感器被广泛报道^[37-38]。例如, Ferdaous

等人^[11]制作了基于 T-Hg²⁺-T 特异性识别作用为机理的电化学 DNA 生物传感器。该生物传感器不仅

能够测定污水中痕量汞离子,而且具有很好的重现性,因而可用于测定污水样品中低浓度 Hg^{2+} . 同样, Vilian 等人^[10]也报道了基于同样检测原理的 Hg^{2+} 电化学生物传感器(图 1). 不同的是,该传感器是基于 DNA-Ag@Au 核壳纳米颗粒作为新传感平台. 其中,核壳纳米颗粒用于 Hg^{2+} 无酶分析电化学传感器构建的电极材料. 他们提出的方法以及构建的新型电极材料对于加标污水样品中 Hg^{2+} 的测定结果切实可靠,为污染的环境样品和生物样品中测定 Hg^{2+} 提供了潜在的可能性.

除了以 DNA 为识别受体的金属离子电化学生物传感器以外,其他识别受体的传感器也有报道. 2016 年,只金芳等人^[39]通过简单的静电相互作用,首先报道了一种将硫堇(thionine, TH)直接包裹在大肠杆菌表面,并开发了一种制备无试剂电化学微生物传感器的有效方法. 该生物传感器被用于评估四种重金属离子(Cd^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+})以及其在真实污水样品的毒性. 与其他已报道的方法相比,该生物传感器在评估污水毒性方面具有优异的表现. 这项工作为无试剂电极的制备开辟了一条新途径,使电化学微生物传感器得以配备并实现在线检测.

除了开发新的金属离子电化学生物传感器,对于原有的传感器的优化,从而进一步改进也是必不可少的一部分. 2018 年,只金芳等人^[40]以重金

属离子为例,系统研究了目前介导电化学微生物传感器中存在的 3 种干扰因子. 该研究基于隔离设计的理念开发了一种新的介导生物传感器. 该生物传感器可以避免目前“one-pot”介导的电化学微生物传感器系统中存在的这 3 种干扰因素,从而提高稳定性和灵敏度. 4 个真实污水样品的检测结果表明该方法可应用于实际复杂样品中目标物的分析.

2) 非金属

虽然大多数先前报道的无机物目标物的分析检测的研究集中在对重金属离子的检测,但是人们对监测其他无机非金属元素的兴趣也在持续增长. 2017 年,荀鲁盈等人^[12]开发了一种基于过量表达醌氧化还原酶(quinone oxidoreductase, SQR)的重组大肠杆菌 BL21 (*Escherichia coli* BL21, *E. coli* BL21)和纳米金(nanoporous gold, NPG)的微生物传感器用于污水中硫化物的检测. 其中, SQR 是参与硫化物代谢起始阶段的重要酶,它能够把硫化物氧化为多硫化物,并将电子转移至电子传递链;而具有独特性能的 NPG 将作为 *E. coli* BL21 细胞的固定材料. 然后,利用所得的 *E. coli*/NPG 生物复合材料对玻碳电极(glassy carbon electrode, GCE)进行修饰,以构建 *E. coli*/NPG/GCE 生物电极. 由于 NPG 具有对硫化物的催化氧化性能, *E. coli*/NPG/GCE 生物电极的电化学反应将使得 SQR 和 NPG

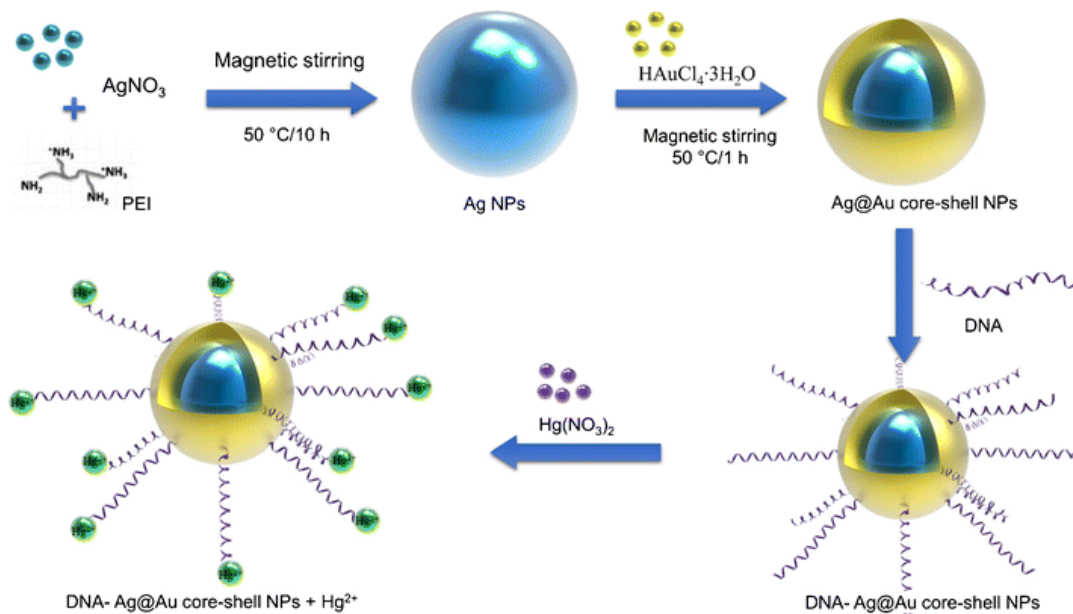


图 1 基于 DNA-Au@Ag 核壳纳米材料组装的汞离子检测电化学生物传感器^[10]

Fig. 1 Schematic illustration of the Hg^{2+} detection using the electrochemical biosensor based on oligomer-Ag@Au core-shell NPs^[10]

发生共催化作用,据此可以构建检测硫化物的电化学生物传感器.该传感器不仅具有较好的检测线性范围($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \sim 5 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)和较低的检测限($2.55 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),而且其抗干扰性能优于酶抑制性生物传感器.这些独特优势和特点可能使该生物电极成为污水中可靠硫化物检测的最佳选择.除了硫化物的检测,氰化物的检测也有报道.2018年,Kumar等人^[13]开发了一种用于氰化物检测的电位生物传感器.该生物传感器使用与铵离子选择性电极偶联的黄杆菌的全细胞氰化物二水合酶活性,可用于检测工业污水和食品中的氰化物,这是全细胞氰化物二水合酶固定化及其在构建用于检测氰化物的生物传感器中的首次报道.

1.2 有机分子

有机污染物既有天然来源,也有人来源,并且人们能在工业、农业和家庭污水中找到广泛的有机污染物.生活污水和工业污水中的有机化学品包括各种烃类、芳香物质、氯化物、二苯基甲烷、表面活性剂、有机杀虫剂和除草剂、可卡因等非法药物和其他有机物质.因此,通过监测污水中的这些污染物质,将能够得到一些有用的信息,比如农药的使用情况,毒品滥用情况等.针对污水中有机物含量的精确监测,特别是在污水处理和水回收过程中的精确监测,在环境和人类健康方面起着至关重要的作用.本节重点介绍最近旨在监测不同污水资源中的有机污染物的电化学生物传感技术,重点关注农药、除草剂、药品和毒品以及酚类物质的检测.

1) 农药类

在农药类中,有机磷农药由于难降解抑或是降解后容易造成水体富营养化,一直是一类重点关注的农药污染物.研究文献表明,针对有机磷农药的电化学生物传感器的构建在这一研究领域已受到高度关注^[16-19].2014年,Ashish等人^[17]从缺陷短波单胞菌细胞中提取和纯化了有机磷水解酶(organophosphorus hydrolase,OPH),并将酶键合固定在聚氯乙烯(polyvinyl chloride,PVC)表面而非工作电极上,然后将其用于电化学生物传感器的开发.构建方法的检测范围为 $0.1 \sim 200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,检测限也低至纳摩尔水平.比起之前报道的用乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase,AChE)构建的生物传感器,该方法将OPH用于生物识别元件和将碳纳米管电极用于安培测定,使得整个检测步骤

更少但是对有机磷农药检测的特异性却更强.此外,本方案中使用的PVC已成为酶固定化的理想基底,而且其在目前电化学电池设计中的应用已证明其优于其它报道的生物传感器,这将为生物传感器、诊断试剂盒以及相关的生物医学仪器的设计和制造开辟一条新途径.

同年,Balwinder等人^[19]也提出了一种基于AChE的生物传感器用于有机磷农药的检测(图2).在这个过程中,首先以丙基三乙氧基硅烷为添加剂,合成了纳米晶体钛硅酸盐和纳米沸石.然后通过共价作用将AChE固定在纳米晶体钛硅酸盐或者纳米沸石上,从而以此构建一个电化学生物传感器,用于马拉硫磷、甲基对硫磷、单菌灵和敌敌畏等有毒有机磷农药的超痕量检测.实验结果表明,以纳米晶体钛硅酸盐为固定基底的生物传感器拥有更高的催化活性.其检测范围为 $0.1 \sim 600 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,检测限低至 $0.01 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.该生物传感器在测定不同食品和水体中的有机磷农药方面具有很好的分析性能.在该研究调查过的基于沸石的生物传感器中,该生物传感器表现出最高的电催化活性,并具有优异的稳定性和灵敏度.

除了有机磷类农药,其他农药也日益受到关注^[14-15].例如,2015年,Gregory等人^[15]在埃洛石上分离了内生真菌酯酶*E. shearii* FREI-39,然后通过物理吸附构建了一个电化学生物传感器.该生物传感器通过使用方波伏安法来抑制酯酶,并将多壁碳纳米管等材料用于呋喃丹农药的测定,检测范围为 $5.0 \sim 100.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,检测限为 $1.69 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,低于美国环保署允许的呋喃丹在饮用水中的最大浓度.此外,报道中来自内生真菌的细胞外酯酶*E. shearii* FREI-39首次成功地应用于构建生物传感器,这拓宽了这些微生物的生物技术应用范围,同时也丰富了生物传感器识别元件的种类.只金芳等人^[14]制备了一种基于透化的啤酒酵母的全细胞安培生物传感器,可用于污水中农药的生物毒性评估.该生物传感器在30分钟内测量了50%抑制浓度(IC₅₀)的传统参数,其所得结果优于已报道的其它毒性生物测定.

2) 毒品和药品

毒品问题一直是一个全球性的问题,而由于其不合法性所导致的隐蔽性使得对其监管和评估一直很难.自从Zuccato通过污水流行病学来评估一个地区的毒品滥用趋势以来,越来越多的学者

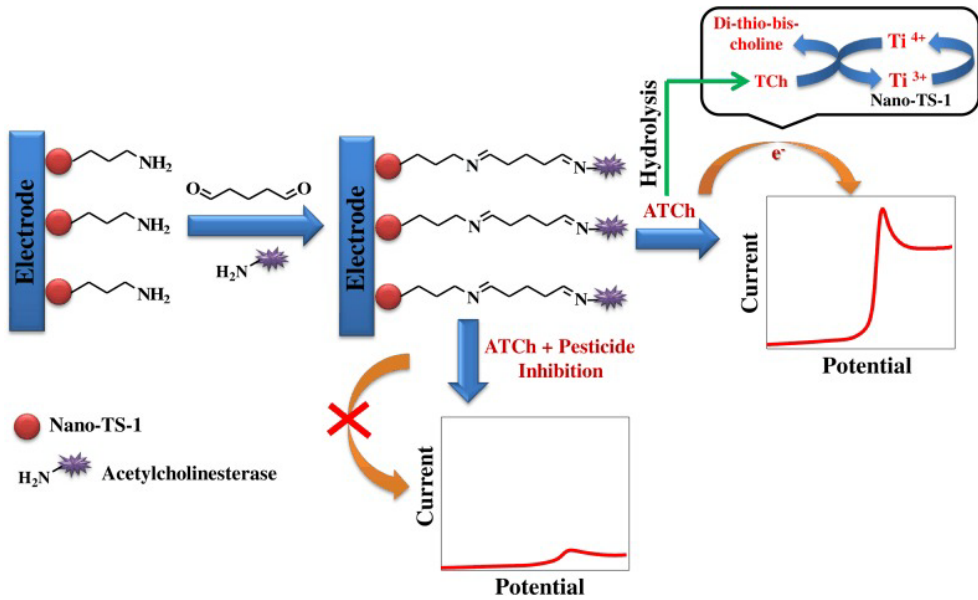


图 2 基于乙酰胆碱酯酶/纳米沸石/玻碳电极的电化学生物传感器的组装^[19]

Fig. 2 Scheme for the fabrication of AChE/Nano-TS-1-Pr-NH₂/GCE biosensor^[19]

开始关注这个新的技术，而传统的分析方法很难实时现场、实时监控某一个地区的毒品滥用情况。作者课题组率先研发可现场快速检测污水中毒品的传感技术^[7, 41-42]，并且致力于将电化学生物传感器用于实际污水中的毒品检测。

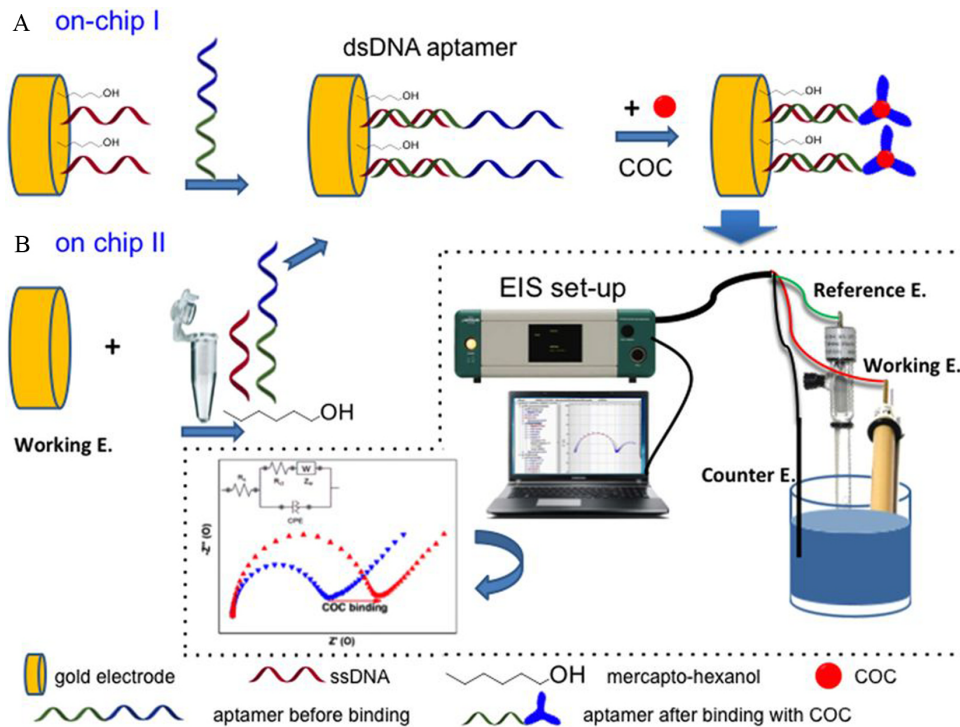
2016 年，作者课题组^[43]首次报道了一种新型的基于电化学的定量社区污水传感器，其传感原理如图 3 所示。将巯基修饰的单链 DNA 探针与 DNA 适配体在溶液中杂交，然后将其与 6-巯基己烷（用来控制 DNA 修饰在金电极上的表面密度）共同修饰固定在金电极上，从而可以有效地与可卡因结合，实现可卡因的定量检测。在优化条件下，该传感器对可卡因的检测范围为 $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} \sim 5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。和基于具有适配体构象变化的信号传感器的其他报道的可卡因传感器相比，作者研发的传感器对可卡因的检出限可达到 $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，并具有较宽的线性检测范围。此外，作者还用该传感器检测评估了英国西南某城市一周内污水中可卡因的浓度变化情况，结果发现周日浓度较工作日高，从而可用于现场快速评估该地区药物使用趋势。

除了非法药品，常规医用药品在污水中的赋存也日益受到关注。2015 年，Gulsah 等人^[21]通过将电化学技术和一次性电极结合，研究了抗癌药物拓扑替康（Topotecan, TPT）与双链 DNA (dou-

ble-stranded DNA, dsDNA) 之间的相互作用，并实现了 TPT 的检测。这是首次有人采用电化学技术，通过使用单壁碳纳米管（single-walled carbon nanotube, SWCNT）修饰过的铅笔石墨电极（pencil graphite electrodes, PGEs）表面来研究 TPT 和 dsDNA 的相互作用。这就使得这项技术具有很大的潜力，可被进一步用于识别作为药物和核酸的生物分子，以及药物-DNA 的相互作用。此外，Ezgi 和 Erol^[22]开发了一种基于枯草芽孢杆菌的新型微生物传感器，并将其用于扑热息痛的电化学测定。他们在金电极上用羧化多壁碳纳米管（carboxylated multi-walled carbon nanotube, cMWCNT）和导电聚合物聚苯胺（polyaniline, PANI）对微生物传感器进行了修饰。和其他用于扑热息痛测定的生物传感器相比，该微生物传感器不仅检测时间短而且整体性能非常优异。

3) 其他小分子

此外，作者发现针对酚类物质的电化学生物传感器的开发也异常活跃^[24-29]，这些传感器大多都是基于在生物活性酶（主要是漆酶和酪氨酸酶）的基础上构建起来的。2016 年，Alina 等人^[26]提出了一种新型丝网印刷漆酶微带阵列，可直接用于现场污水中的总酚估计和水质监测，无需额外的样品预处理。该报道首先采用有限元数值模拟方法对微型石墨电极进行表征，然后采用阳极氧化和

图 3 DDIAS 检测可卡因原理示意图^[43]Fig. 3 Schematic illustration of the DDIAS for detection of cocaine within “on-chip I” (A) and “on-chip II” (B) approaches using EIS^[43]

共价修饰的方法对漆酶电极进行功能化修饰,利用邻苯二酚来研究该微电极的官能化效率和电化学性能,并将其与宏观电极结构进行了比较.结果表明,当在优化的条件下使用时,酶生物传感器的尺寸的减小导致其分析特性效果显著改善.检测范围能够达到 $0.2 \sim 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,该研究首次证明适用于弱载体介质中酚的现场监测的新型漆酶传感器.此外,将该生物传感器得到的结果与污水样品总酚分析的标准方法进行比较,结果一致.

除了酚类物质,其他小分子也有报道^[23, 30-31].例如,2018年,Rather等人^[30]报道新的飞摩尔适配体电化学传感界面 (APT-ERGO/GCE) 用于 $17 \beta\text{-estradiol}$ (E2) 的检测.其组装原理如下:首先将合成好的氧化石墨烯 (graphene oxide, GO) 组装在 GCE 上,形成一个新的电极;然后将对氨基苯甲酸通过化学反应修饰到这个新的电极上;氨基修饰的 E2 适配体修饰通过与对氨基苯甲酸上的羧基发生 EDC 偶联反应,修饰到新的电极上.在 E2 的存在下,适配体会发生构象变化,从而导致电化学信号变化,据此来测试 E2.实验结果表明,该传感器测定 E2 有 $1.0 \times 10^{-15} \sim 9.0 \times 10^{-12} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 1.2

$\times 10^{-11} \sim 2.3 \times 10^{-10} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 两个不同的线性范围,检测限低至 $0.5 \times 10^{-15} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,这为污水中超低浓度的 E2 测定提供了一个可靠的方法.

1.3 生物分子的检测

一直以来,对于污水中的一些生物分子包括一些 DNA/RNA、生物标记物的测定一直是一个重要的关注点.研究人员希望通过对污水中的这些目标物的测定来评估当地的公共健康,而电化学生物传感器在检测污水生物标记物如线粒体 DNA 等生物分子的领域显示出巨大的前景.例如,作者最近开发了一种新的无标记电化学 DNA 生物传感器(如图 4 所示)^[20],利用合成的二茂铁嵌入剂作为电化学信号传递物(氧化还原标记物)检测污水中提取的人类特异性线粒体 DNA 分子,可以用做现场快速检测污水中人口 DNA 的有效工具.该研究还表明,使用生物传感器检测污水中人类 DNA 生物标记(例如细菌等)可以获知社区人群的健康状况,有利于进一步研究污水流行病学.作者还研发了一种用于检测蛋白质癌症标志物的电化学核酸适配体传感器,用以超灵敏地检测前列腺特异性抗原.通过比较设计的“in-solution”方法和“on

chip”方法可得,由于适配体和蛋白质的均相结合介质,“in solution”方法比“on chip”方法更有效.此外,假设有特定的 DNA 适配体候选者可用,那么所提出的策略可进一步用于检测多种蛋白质癌症生物标志物,例如肽、蛋白质或甚至小分子如药物^[44].

值得一提的是,最近作者开发了一种用于污水流行病学检测人源基因标记物的新方法^[45].该方法能够简单快速地现场定量检测基于社区污水中的基因标记物.其检测原理是基于环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)扩增从未经处理的原始污水中提取的人源 DNA.线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)作为一个模式人口标记物,与人的各种癌变信息相关,包括乳腺癌、肾癌和胃癌.因此,作者以此作为模式物质来研究新设计的方法.为实现样品现场测定要求,作者采用了可以现场提取污水中 DNA 的设备用以富集和纯化 DNA,对纯化的 DNA 进行恒温扩增,并用廉价的试纸条现场检测结果.对英国西南城市的污水进行了连续 7 天的测试,实验结果表明,该传感器可以灵敏地检测实现每反应体积 40 拷贝数人源基因组的 mtDNA.不仅该分析方法可以在样品收集现场进行并且快速完成

(45 分钟内得到结果),而且非专业人员也可以使用,这将为通过分析污水来评估公共健康提供了一个理想的分析工具.

1.4 细菌等微生物的检测

污水为不同类型的微生物如细菌、病毒、原生动物、藻类、真菌和酵母提供了理想的生长条件.微生物主要存在于家庭活动和食品工业的污水中,其特征在于其有机组成的巨大变化.致病性、非致病性、腐生性、自养和异养微生物的水平随其来源而变化.大范围的水生微生物疾病在全世界造成了显著的死亡率和发病率.因此,考虑公众健康,对微生物如细菌的检测就显得尤为重要.例如,为了能够测定受污水影响的供水中的噬菌体 MS₂,Prieto-Simón 等人^[39]开发了将捕获的抗体通过化学组装或磁捕获定向固定在用于噬菌体 MS₂ 的重氮盐-电接枝 SWCNT 上的一个免疫传感器.他们首先将羧基官能化的 SWCNT 共价键合在碳二酰亚胺偶联半胱胺修饰的金电极上,然后将抗体固定在 SWCNT 上,SWCNT 具有高导电性和大表面积.构建成的传感器检测范围为 10~10¹² pfu·mL⁻¹,检测限低至 9.3 pfu·mL⁻¹,其灵敏度足以将 MS₂ 的存在确定为在受污水影响的环境中经常遇到的水平,这是将该生物传感器用于环境分析的重要进

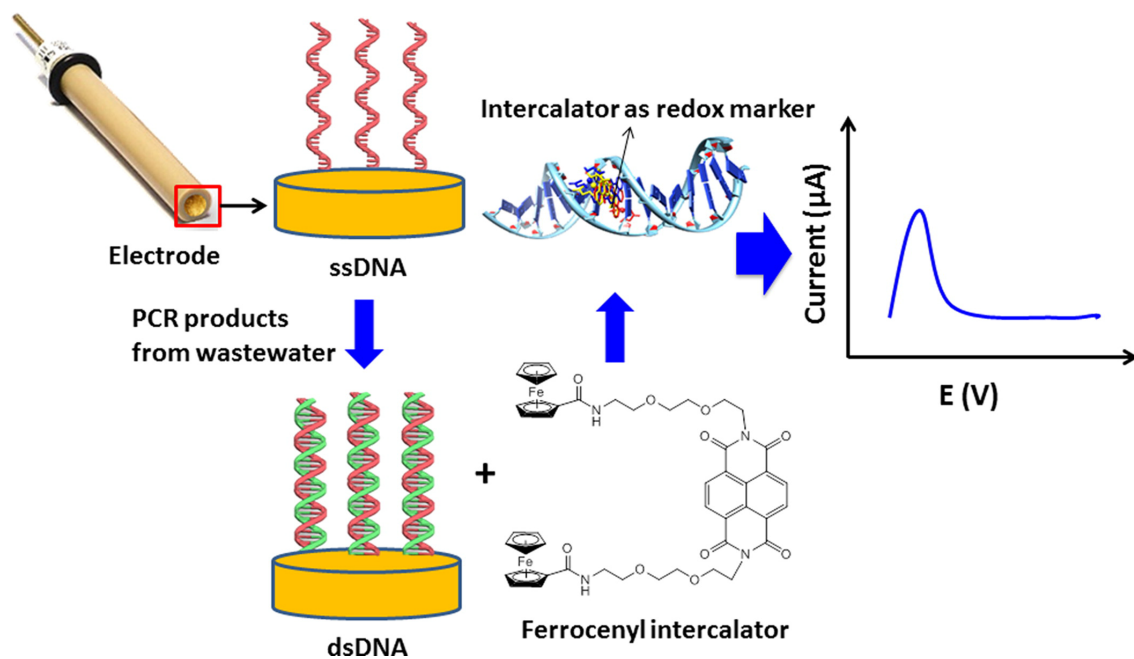


图 4 一种新的 DNA 电化学传感器用于污水中人体标记物的检测^[20]

Fig. 4 A novel DNA biosensor using a ferrocenyl intercalator applied to the potential detection of human population biomarkers in wastewater^[20]

展. 此后, 同样针对噬菌体 MS₂, Nekane 等人^[5]设计了用于噬菌体 MS₂ 检测的基于纳米多孔硅膜的无标记超灵敏电化学免疫传感器. 这是基于纳米多孔硅膜的生物传感器第一次利用纳米通道阻断效应来转导分析物结合, 该生物传感器能够在污水和受污水影响的湿地中噬菌体 MS₂ 的敏感检测.

2 结论与展望

污水水质广泛影响人类生活的各方面, 包括健康、食物、能源和经济. 正如作者所论述的, 电化学生物传感器是追踪环境污染物的检测各种目标物的可靠分析方法. 由于其监测不同类型污染物时展现的简单性和高选择性, 越来越多基于电化学生物传感器的方法被陆续建立.

尽管它们在污水监测中具有广阔的应用前景, 但仍有许多因素限制了它们在实际工业污水和下水道污水测试中的应用. 第一、不同时间和不同情况下污水的不同成分在预测其物理化学性质时造成困难, 污水的复杂基质可能影响样品中的预测参数并干扰所需元素的检测. 第二、为了实现检测各种污水污染物的目标, 设计具有更大检测范围和同时检测几种混合物的能力的新型传感系统是非常必要的. 第三、通过装运、储存和使用条件的固定的生物元素(如酶、细胞、抗体和组织等)的稳定性是应该考虑的另一个主要方面. 第四、这种现代技术也需要通过与水和污水的常见分析系统监测进行比较来评估. 此外, 定量和定性验证指南也需要被建立. 根据这些客观事实, 该方法的确存在一些技术限制、实践限制和复杂性. 在未来的工作中, 人们应该去克服它们以开发更有效的和面向实际应用的电化学生物传感器.

为了解决这些技术限制, 各国科学家正在努力攻关. 例如, 为了保证电化学生物传感器在较低浓度范围内的检测限以及具有长期储存的稳定性, 两项主要的关于克服使用生物分子作为识别元素而产生的主要障碍的战略正在进行中, 即重组靶特异性片段的产生及抗体和酶的定点固定, 以促进污水中有机污染物的快速、廉价和原位筛选, 以及通过纳米材料的结合来提高生物传感器的灵敏度和精度, 还有通过小型化和引入多传感器阵列器件来提高检测效率. 纳米技术领域的当前进展在改进生物传感器的某些方面上显示出巨大的前景, 并且可以开辟实现更好检测性能的新

机会. 电化学污水生物传感器将为污水中各种目标物的简单快速监测甚至现场检测带来新的革新, 为环境污染评价、药物滥用趋势评估和公共健康的评估等领域开辟了一个新方向.

参考文献(References):

- [1] Cyranoski D. China expands surveillance of sewage to police illegal drug use[J]. *Nature*, 2018, 7(559): 330-331.
- [2] Zuccato E, Chiabrando C, Castiglioni S, et al. Cocaine in surface waters: a new evidence-based tool to monitor community drug abuse[J]. *Environmental Health*, 2015, 4(1): 1-14.
- [3] Castiglioni S, Bagnati R, Melis M, et al. Identification of cocaine and its metabolites in urban wastewater and comparison with the human excretion profile in urine[J]. *Water Research*, 2011, 45(16): 5141-5150.
- [4] van Nuijs A, Castiglioni S, Tarcomnicu I, et al. Illicit drug consumption estimations derived from wastewater analysis: A critical review[J]. *Science of the Total Environment*, 2011, 409(19): 3564-3577.
- [5] Zuccato E, Chiabrando C, Castiglioni S, et al. Estimating community drug abuse by wastewater analysis[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2008, 116(8): 1027-1032.
- [6] Yang Z G, Kasprzyk-Hordern B, Frost C, et al. Community sewage sensors for monitoring public health[J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(10): 5845-5846.
- [7] Mao K, Yang Z G, Li J R, et al. A novel colorimetric biosensor based on non-aggregated Au@Ag core-shell nanoparticles for methamphetamine and cocaine detection [J]. *Talanta*, 2017, 175(1): 338-346.
- [8] Gao G Y, Qian J, Fang D Y, et al. Development of a mediated whole cell-based electrochemical biosensor for joint toxicity assessment of multi-pollutants using a mixed microbial consortium[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2016, 924(6): 21-28.
- [9] Gao G Y, Fang D Y, Yu Y, et al. A double-mediator based whole cell electrochemical biosensor for acute biotoxicity assessment of wastewater[J]. *Talanta*, 2017, 167(5): 208-216.
- [10] Vilian A T E, Shahzad A, Chung J, et al. Square voltammetric sensing of mercury at very low working potential by using oligomer-functionalized Ag@Au core-shell nanoparticles[J]. *Microchimica Acta*, 2017, 184(9): 3547-3556.
- [11] Maatouk F, Maatouk M, Bekir K, et al. An electrochemical DNA biosensor for trace amounts of mercury ion quantification[J]. *Journal of Water and Health*, 2016, 14(5):

- 808-815.
- [12] Liu Z, Ma H Y, Sun H H, et al. Nanoporous gold-based microbial biosensor for direct determination of sulfide[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2017, 98(12): 29-35.
- [13] Kumar V, Singh A, Verma N, et al. A potentiometric biosensor for cyanide detection using immobilized whole cell cyanide dihydratase of flavobacterium indicum MTCC 6936[J]. *Journal of Analytical Chemistry*, 2018, 73(10): 1014-1019.
- [14] Qian J, Li J M, Fang D Y, et al. A disposable biofilm-modified amperometric biosensor for the sensitive determination of pesticide biotoxicity in water[J]. *RSC Advances*, 2014, 4(98): 55473-55482.
- [15] Grawe G F, de Oliveira T R, Narciso E D, et al. Electrochemical biosensor for carbofuran pesticide based on esterases from *Eupenicillium shearii* FREI-39 endophytic fungus[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2015, 63(1): 407-413.
- [16] Montes R, Cespedes F, Gabriel D, et al. Electrochemical biosensor based on optimized biocomposite for organophosphorus and carbamates pesticides detection[J]. *Journal of Nanomaterials*, 2018, 2018(3): 7093606-7093619.
- [17] Gothwal A, Beniwal P, Dhull V, et al. Preparation of electrochemical biosensor for detection of organophosphorus pesticides[J]. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2014, 12: 303641.
- [18] Bao J, Hou C J, Huo D Q, et al. Sensitive and selective electrochemical biosensor based on ELP-OPH/BSA/TiO₂NFs/AuNPs for determination of organophosphate pesticides with p-nitrophenyl substituent[J]. *Journal of The Electrochemical Society*, 2017, 164(2): 17-22.
- [19] Kaur B, Srivastava R, Satpati B. Nanocrystalline titanosilicate-acetylcholinesterase electrochemical biosensor for the ultra-trace detection of toxic organophosphate pesticides[J]. *ChemElectroChem*, 2015, 2(8): 1164-1173.
- [20] Yang Z G, d'Auriac, M A, Goggins S, et al. A novel DNA biosensor using a ferrocenyl intercalator applied to the potential detection of human population biomarkers in wastewater [J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(9): 5609-5617.
- [21] Congur G, Erdem A, Mese F. Electrochemical investigation of the interaction between topotecan and DNA at disposable graphite electrodes [J]. *Bioelectrochemistry*, 2015, 102 (5): 21-28.
- [22] Bayram E, Akyilmaz E. Development of a new microbial biosensor based on conductive polymer/multiwalled carbon nanotube and its application to paracetamol determination[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2016, 233 (10): 409-418.
- [23] Liu C, Xu Y C, Han X, et al. The fabrication and the use of immobilized cells as test organisms in a ferricyanide-based toxicity biosensor[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2018, 37(2): 329-335.
- [24] Mendes R, Arruda B, Souza E, et al. Determination of chlorophenol in environmental samples using a voltammetric biosensor based on hybrid nanocomposite[J]. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2017, 28 (7): 1212-1219.
- [25] Akbulut H, Bozokalfa G, Asker D, et al. Polythiophene-g-poly(ethylene glycol) with lateral amino groups as a novel matrix for biosensor construction[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015, 7(37): 20612-20622.
- [26] Sekretaryova A, Volkov A, Zozoulenko I, et al. Total phenol analysis of weakly supported water using a laccase-based microband biosensor[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2016, 907(2) : 45-53.
- [27] Lopez M, Lopez-Ruiz B. Electrochemical biosensor based on ionic liquid polymeric microparticles. An analytical platform for catechol[J]. *Microchemical Journal*, 2018, 138(5): 173-179.
- [28] Oliveira D, Ribeiro F, Becker H, et al. An electrochemical biosensor based on the tyrosinase enzyme for the determination of phenol in wastewater[J]. *Química Nova*, 2015, 38 (7): 924-931.
- [29] Zhang Z, Zhang Z M, Hu Y G, et al. Phenol biosensor based on glassy carbon electrode directly absorbed *Escherichia coli* cells with surface-displayed bacterial laccase[M]. *Procedia Technology*, 2017, 27: 137-138.
- [30] Rather J, Khudaish E, Kannan P. Graphene-amplified femtosensitive aptasensing of estradiol, an endocrine disruptor[J]. *Analyst*, 2018, 143(8): 1835-1845.
- [31] Yuan Q L, Liu Y, Ye C, et al. Highly stable and regenerative graphene-diamond hybrid electrochemical biosensor for fouling target dopamine detection[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2018, 111(7) : 117-123.
- [32] Niyomdech S, Limbut W, Numnuam A, et al. A novel BOD biosensor based on entrapped activated sludge in a porous chitosan-albumin cryogel incorporated with graphene and methylene blue[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2017, 241(3): 473-481.
- [33] Estevez-Canales M, Berna A, Borjas Z, et al. Screen-printed electrodes: new tools for developing microbial electrochemistry at microscale level[J]. *Energies*, 2015, 8 (11): 13211-13221.
- [34] Prieto-Simón B, Bandaru N, Saint C, et al. Tailored carbon nanotube immunosensors for the detection of micro-

- bial contamination[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 67(5): 642-648.
- [35] Reta N, Michelmore A, Saint C, et al. Porous silicon membrane-modified electrodes for label-free voltammetric detection of MS₂ bacteriophage[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 80(6): 47-53.
- [36] Chen W W, Yang W S, Lu Y L, et al. Encapsulation of enzyme into mesoporous cages of metal-organic frameworks for the development of highly stable electrochemical biosensors[J]. *Analytical Methods*, 2017, 9(21): 3213-3220.
- [37] Song L L, Mao K, Zhou X D, et al. A novel biosensor based on Au@Ag core-shell nanoparticles for SERS detection of arsenic(III)[J]. *Talanta*, 2016, 146(1): 285-290.
- [38] Mao K, Wu Z T, Chen Y R, et al. A novel biosensor based on single-layer MoS₂ nanosheets for detection of Ag⁺[J]. *Talanta*, 2015, 132(1): 658-663.
- [39] Fang D Y, Gao G Y, Shen J, et al. A reagentless electrochemical biosensor based on thionine wrapped *E-coli* and chitosan-entrapped carbon nanodots film modified glassy carbon electrode for wastewater toxicity assessment [J]. *Electrochimica Acta*, 2016, 222(12): 303-311.
- [40] Yang Y J, Fang D Y, Liu Y R, et al. Problems analysis and new fabrication strategies of mediated electrochemical biosensors for wastewater toxicity assessment [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2018, 108(6): 82-88.
- [41] Mao K, Yang Z G, Du P, et al. G-quadruplex-hemin DNAzyme molecular beacon probe for the detection of methamphetamine[J]. *RSC Advances*, 2016, 6(67): 62754-62759.
- [42] Mao K, Zhou Z L, Han S, et al. A novel biosensor based on Au@Ag core-shell nanoparticles for sensitive detection of methylamphetamine with surface enhanced Raman scattering[J]. *Talanta*, 2018, 190(12): 263-268.
- [43] Yang Z G, Castrignano E, Estrela P, et al. Community sewage sensors towards evaluation of drug use trends: detection of cocaine in wastewater with DNA-directed immobilization aptamer sensors [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 21024.
- [44] Yang Z, Kasprzyk-Hordern B, Goggins S, et al. A novel immobilization strategy for electrochemical detection of cancer biomarkers: DNA-directed immobilization of aptamer sensors for sensitive detection of prostate specific antigens[J]. *Analyst*, 2015, 140(8): 2628-2633.

Electrochemical Biosensors for Wastewater-Based Epidemiology

PAN Yu-wei¹, MAO Kang¹, TUERK Franziska¹, YANG Zhu-gen^{1,2*}

(1. School of Engineering, University of Glasgow, Glasgow G12 8LT, United Kingdom;

2. Cranfield Water Science Institute, Cranfield University, Bedford, MK 43 0AL, UK)

Abstract: Wastewater-based epidemiology (WBE) has been shown to be an innovative approach for evaluation of drug use trends and public health assessment by quantifying drug residues and/or metabolites (so-called biomarkers) in wastewater collected in a local treatment plant. Community sewage sensors have been proposed and demonstrated to be powerful tools for the analysis of sewage biomarkers. In particular, electrochemical biosensors have emerged as a rapid method for the analysis of biomarkers and pathogens in wastewater due to low cost, minimal sample processing and the ability to test in the field. It has been widely used for biomedical diagnosis, environmental monitoring and food safety, but still at early stage for wastewater analysis. Compared to traditional analytical methods such as liquid chromatography - mass spectrometry (LC-MS), biosensors have advantages of fast responding time and enable analysis at the point-of-need for wastewater. This paper reviews the most recent progress on the analysis of biomarkers in wastewater using electrochemical biosensors. The electrochemical biosensors for the detection of important inorganic chemicals (heavy metals), organic chemicals such as illicit drug and pesticides, biomolecules and microorganisms in wastewater are discussed. This will give an insight to the wastewater-based epidemiology and its application for community-wide drug abuse and public health assessment.

Key words: wastewater-based epidemiology; electrochemical analysis; biosensor; illicit drug of abuse; public health