

长寿命 BOD 微生物传感器的研究

孙裕生 刘宪梅 崔建升 祁建珍

(河北轻化工学院环境工程系, 石家庄 050018)

摘要 本研究将从淀粉厂活性污泥中分离筛选出的一种性能优良的腊状芽孢杆菌 (*Bacillus Cereus*) 用高分子等材料包埋制成薄膜, 与氧电极组合成 BOD 传感器。经对其技术性能进行测试表明, 间断使用寿命已达 16 个月以上; 对 BOD 标准物质线性响应范围 5—60mg/L; 响应时间不大于 8min; 测定环境标样平均误差 1%, 变异系数 5.1; 与 BOD₅ 经典法同步测定废水样品结果相关性良好。

关键词 BOD 传感器, 微生物传感器, BOD 测定, 微生物固定化。

用微生物传感器法测定废水 BOD, 与 BOD₅ 经典法、库仑法、差压法、活性污泥法等比较, 具有快速、简便、适于废水处理工程控制监测等优点。对该方法的研究进展已有综述^[1,2], 主要存在两个问题, 一是传感器寿命短, 最长为两个月^[3]; 二是多用夹层法固定微生物^[4-5], 微生物层松散, 易流失, 且只能一次性使用。虽然也有用单一材料包埋制膜^[1,6], 但膜强度差, 也是一次性使用。

本研究筛选出的微生物菌株性能优良, 用混合材料在常温下包埋, 制成机械强度、韧性和透气性均较理想的微生物膜。膜的制作方法简便, 同一膜可多次更换使用, 间断使用寿命已超过 16 个月以上。

一、传感器制备及实验方法

(一) 仪器及主要试剂

1. 仪器

(1) 由极谱式溶氧测定仪改制的 BOD 速测仪实验样机;

(2) 3066 型记录仪

2. 试剂

(1) 磷酸盐缓冲溶液 (0.05 mol/L, pH 7.2), 由 KH_2PO_4 和 Na_2HPO_4 (均为分析纯) 配制;

(2) BOD 标准溶液 称取葡萄糖 (分析纯)、谷氨酸 (生化试剂) 各 0.250g, 于 500ml 容量瓶中用磷酸盐缓冲溶液定容 (下称 GGA 标液);

(3) 环境标准样品 中国环境监测总站水质标样 (BOD₅-3200205, GSBZ50002-88)。准确移取 10ml, 用蒸馏水稀释至 250ml, 其保证值为 110.9mg/L, 不准确度 ± 5.4 。

(二) 传感器制备

1. 菌种及培养

(1) 菌种 从淀粉厂活性污泥中分离筛选得到。经鉴定, 为腊状芽孢杆菌 (*Bacillus Cereus*)。

(2) 液体培养基 牛肉膏 2%, 蛋白胨 1%, 淀粉 2%, 加适量磷酸盐缓冲溶液配成营养液。将营养液与城市污水按 1:1 体积比混合, 调节至 pH 7.0。

收稿日期: 1991 年 8 月 10 日

参 考 文 献

- 1 Degrassi F et al. *Mut Res*, 1982, 97:19
- 2 陈光荣等. 中国环境科学, 1985, 5(4): 2
- 3 阮萃才等. 环境科学, 1988, 9(3): 39
- 4 Vig B K. *Environ Health Perspect*, 1978, 27:27

- 5 阮萃才等. 广西医学, 1986, 8(3): 131
- 6 阮萃才等. 环境科学, 1990, 11(3): 41
- 7 阮萃才等. 自然杂志, 1991, 14(10): 774
- 8 阮萃才等. 环境杂志, 1986, 5(5): 26
- 9 阮萃才等. 上海环境科学, 1987, 6(4): 34
- 10 阮萃才等. 中华预防医学杂志, 1991, 25(5): 228

(3) 培养方法 将在固体斜面培养基上分离得到的单菌落接于液体培养基中,于 30℃ 摇动培养 20h,经离心分离,磷酸盐缓冲溶液洗涤,再分离,获得湿菌体,镜检纯度后再连续培养两次。最后洗涤、分离得到的菌体即可用于制膜,或 4℃ 保存备用。

2. 微生物膜的制备

将少量纤维素等填料加入用菌体和磷酸盐缓冲液调制的菌液中,充分搅匀后,转入适量高分子物质溶液中,电磁搅拌几分钟,将其铺于平面玻璃板上,碾平,放在 30℃ 的防尘环境中自然固化成膜,固化后的膜厚约 130 μm。将干膜用磷酸盐缓冲液润湿,切成适合装配尺寸的圆形片,保存备用。

经试验,微生物膜可采用常温下在磷酸盐缓冲液中湿放,也可干放。较长时间不用时,宜采用 4℃ 冷藏箱存放,或者干湿法交替存放。

3. 传感器的组装

将微生物膜用磷酸盐缓冲溶液润湿,置于氧电极的塑料膜上(一般光滑面向塑料膜),放上垫圈,轻轻旋紧电极帽,使两层膜紧密接触。如图 1 所示。装配好的传感器于常温下在磷酸盐-葡萄糖缓冲溶液中活化后即可用于测定,也可以将膜活化后再装在氧电极上。

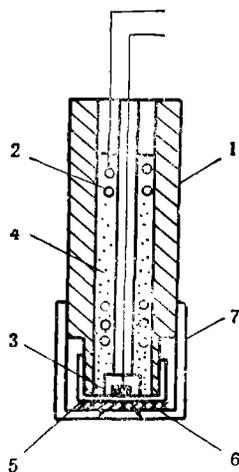


图 1 传感器结构示意图

- 1. 塑料管 2. Ag-AgCl 电极 3. Au 电极 4. KCl-Na₂B₄O₇ 溶液 5. 聚四氟乙烯薄膜 6. 微生物膜 7. 电极帽

4. 实验样机结构及实验方法

(1) 实验样机结构 示于图 2。

(2) 实验方法 先将 BOD 传感器浸入恒温、溶解氧浓度保持不变的磷酸盐缓冲溶液中,由于膜内微生物活性一定,溶液中的溶解氧分子通过微生物膜扩散进入氧电极的速率一定,故传感器输出一恒定电流。再将 GGA 标液加入上述磷酸盐缓冲液中,则因微生物对有机物质发生同化作用,呼吸活性增强,致使扩散进入氧电极的氧分子速率减小,传感器输出电流迅速降低,但几分钟之内,微生物活性达到新的稳态值,传感器输出电流也达新的恒定值,便可得到该 GGA 浓度下的传感器输出电流降低值 (ΔI)。试验表明,在一定 GGA 浓度范围内,传感器输出电流降低值 ΔI 与溶液 GGA 浓度 c 呈线性关系。因此,根据对系列 GGA 浓度的溶液测定得到的相应电流降低值,可绘制出 $\Delta I-c$ 关系曲线,再由加入本底磷酸盐缓冲液中的水样体积和测得的电流降低值,从 $\Delta I-c$ 曲线上查知水样相当于 GGA 的浓度。根据 GGA 浓度与 BOD 的关系,便可计算出水样的 BOD 值。

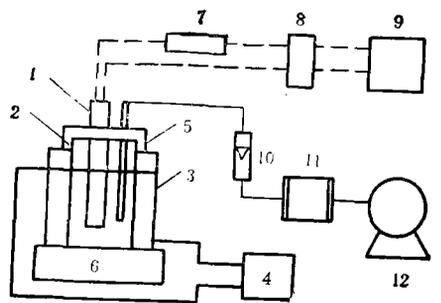


图 2 实验样机结构示意图

- 1. 传感器 2. 测量池 3. 水浴套 4. 恒温循环水浴 5. 传感器固定盖 6. 托座 7. 微安计 8. 阻抗及 I-V 转换器 9. 记录仪 10. 流量计 11. 缓冲稳压器 12. 鼓气泵

二、实验结果与讨论

(一) 实验溶液温度和 pH 值的选择

温度影响曲线示于图 3。可见,温度增高,传感器输出电流降低值增加,升至约 46℃ 时,

输出电流值达最大。本实验选择 $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 。

实验溶液 pH 值的影响曲线示于图 4。可见, pH6.5—8.5 范围内影响平缓, 本实验选择 pH7.2。

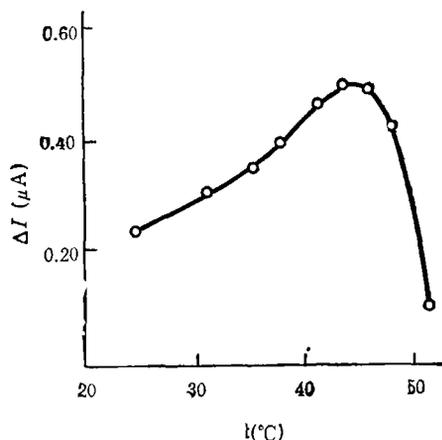


图 3 温度影响曲线 (GGA 29.1mg/L, pH7.2)

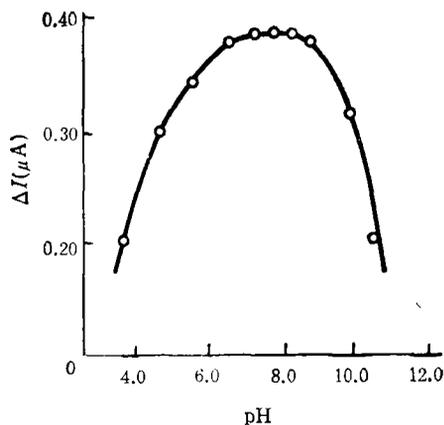


图 4 pH 影响曲线 (GGA 29.1mg/L, 30°C)

(二) 传感器响应时间及线性响应范围

1. 响应时间

实验表明, 用微生物传感器测定 9.9mg/L 的 GGA 溶液, 响应时间为 4min; 测定 56.6mg/L 的 GGA 溶液, 响应时间不超过 8min。

2. 线性响应范围

用传感器测定系列 GGA 标准溶液, 其响应曲线示于图 5。可见, 线性响应范围为 5—60 mg/L。

(三) 重金属离子及盐度的影响

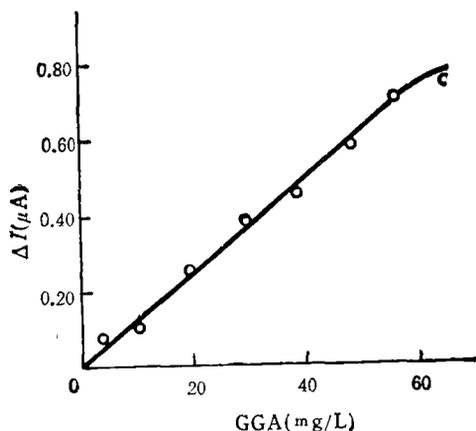


图 5 传感器响应曲线 (30°C, pH7.2)

重金属离子的存在, 可能对微生物的活性产生抑制和毒害作用, 特选择废水中常见离子进行影响实验, 结果列于表 1。可见, 只有 Hg^{2+} 和 $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ 浓度较高时对微生物活性产生抑制作用, 这表明对实验金属离子浓度的可忍受范围远高于废水排放最高允许浓度。

在溶液中加入 NaCl 进行盐度影响实验,

表 1 重金属离子对传感器响应的影响*

金属离子	浓度 (mg/L)	响应变化 (μA)	金属离子	浓度 (mg/L)	响应变化 (μA)
空白	0	0.39	Pb^{2+}	有沉淀生成	0.40
Cu^{2+}	50	0.40	Hg^{2+}	10	0.38
Cu^{2+}	有沉淀生成	0.40	Hg^{2+}	有沉淀生成	0.35
Zn^{2+}	50	0.39	$\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$	10	0.38
Zn^{2+}	有沉淀生成	0.40	$\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$	40	0.34
Fe^{3+}	有沉淀生成	0.40	Mn^{2+}	有沉淀生成	0.39
Cd^{2+}	有沉淀生成	0.39			

* 测定底液为 29.1mg/L GGA 磷酸盐缓冲液 (pH7.2)

结果表明,当溶液 NaCl 浓度大于 5% 时,对传感器微生物活性产生抑制作用。

(四) 微生物膜的寿命和稳定性

微生物膜的保存和使用寿命主要决定于微生物的性能和固定化技术。本研究所选菌种的适应性和生命力强,而良好的包埋固定化方法又为其提供了利于生存和进行新陈代谢的环境,故使用寿命长。图 6 为经 4℃ 存放并间断使用一年的微生物膜,多次测定 38.5 mg/L GGA 磷酸盐缓冲溶液 (pH7.2, 30℃) 得到的代表响应值与测定时间的关系曲线。可见,四

个月内响应值波动范围在 ±10% 之内。

表 2 列出用某一微生物膜 11 次测定环境标准样品的结果,表明重现性良好。

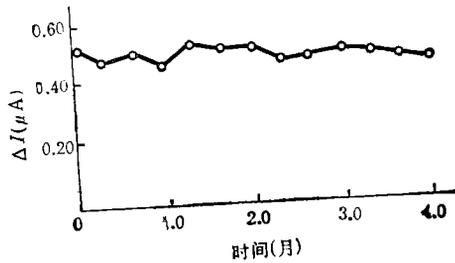


图 6 传感器响应-测定时间关系曲线

表 2 微生物膜法测定环境标准 BOD 结果 (标样 BOD 保证值 277mg/L)

次 数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	平均值	变异系数
测定结果 (mg/L)	269	258	293	258	264	293	272	287	287	276	258	274	5.1
相对误差 (%)	-2	-6.8	6.6	-6.8	-4.7	6.6	-1.8	3.6	3.6	-0.4	-6.0	1.0	

表 3 两种方法同步测定废水 BOD 结果

废 水	采样次数	BOD _s 法 (mg/L)	BOD _M 法 (mg/L)	ΔBOD	ΔBOD/BOD _s (%)
石家庄啤酒厂废水	1	522	537	-15	-2.9
	2	419	486	-67	-16
	3	550	505	45	8.2
	4	595	614	-19	-3.2
	5	899	816	83	9.2
	6	1089	1062	27	2.5
石家庄城市污水 (槐底泵站)	1	109	110	-1	-0.9
	2	90	98.5	-8.5	-9.4
	3	183	187	-4	-2.1
	4	194	221	-27	13.9
	5	232	226	6	2.6
	6	179	167	12	6.7

(五) 废水样品的测定

用本传感器与 BOD_s 经典法^[7] 同步测定废水样品,结果列于表 3。可见,二者的相关性是令人满意的。

三、结 论

本研究制备的传感器,采用了优良菌种及利于生存和新陈代谢的固定化方法,与报道的

同类研究相比,具有使用寿命长、微生物膜机械强度和性能好、可多次更换使用等特点。用于测定环境标准样品,相对误差 1%;与 BOD_s 经典法同步测定城市污水和啤酒厂废水,结果相关性较好,是一种具有实用意义的传感器。

致谢 王泽海、赵国华、郭江涛、阎春霞、黄涛和贾道玲参加了部分实验工作,表示感谢。

高灵敏度光度法测定地表水中硝酸盐和亚硝酸盐氮

丘星初 朱盈权

李萃昇

(江西省赣州地区环境科学研究所, 赣州市 341000)

(江西省赣州地区林业科学研究所, 赣州市 341000)

摘要 本文详细研究了在硫酸介质中, 邻苯氨基苯甲酸与 NO_3^- 和 NO_2^- 离子显色体系的光度性质与形成条件。结果表明, 显色产物的最大吸收 λ_{max} 位于 560—565nm。在此波长下, 表观摩尔吸光系数分别为: $\epsilon'_{\text{NO}_3^-} = 1.07 \times 10^5$ 和 $\epsilon'_{\text{NO}_2^-} = 1.77 \times 10^5$ 。符合 Beer 定律的浓度范围为: 0.03—0.15 $\mu\text{g}/\text{ml}(\text{NO}_3^--\text{N})$ 和 0.05—0.20 $\mu\text{g}/\text{ml}(\text{NO}_2^--\text{N})$ 。据此, 拟定了分光光度联合测定 NO_3^--N 和 NO_2^--N 的新方法, 应用于地表水的测定, 得到了满意的结果。

关键词 硝酸盐和亚硝酸盐氮联合测定, 分光光度法, 邻苯氨基苯甲酸, 地表水。

迄今为止, 常用于测定 NO_2^- 离子的光度法仍首推经典的 Griess 法。其次是一些形成偶氮染料的方法^[1-5]。Griess 法的 $\epsilon_{520} = 4.0 \times 10^4$ 。而用于测定 NO_3^- 离子的光度法, 一般可分为:

(1) 硝化或氧化某些有机试剂, 以形成有色化合物;

(2) 将 NO_3^- 离子还原成 NO_2^- 或 NH_3 后再测定等两大类^[2,3]。

其中的酚二磺酸法 ($\epsilon_{410} = 9.4 \times 10^3$), 便是大家所熟知并广泛采用的。但无论是 Griess 法还是酚二磺酸法, 当用于测定痕量水平的 NO_2^- 和 NO_3^- 离子时, 均因其灵敏度低而难于满足分析要求。

邻苯氨基苯甲酸, 系一常用的氧化还原指示剂。但用于显色剂, 尤其用于 NO_2^- 和 NO_3^- 离子的联合光度测定, 则似尚未见。我们在实验中发现, 在硫酸介质中, 邻苯氨基苯甲酸能与 NO_3^- 和 NO_2^- 生成有色产物, 灵敏度高达 10^5 数量级。显然, 这是 Griess 法的四倍多, 酚二磺酸法的 11.4 倍。我们详细研究了此显色体系的

光度性质与形成条件, 据此拟定了地表水中 NO_3^- 和 NO_2^- 离子的联合光度测定的新方法。

一、实验部分

1. 仪器和试剂

721 型分光光度计, 0.5cm 比色皿

邻苯氨基苯甲酸溶液 (0.1% w/v): 100mg 邻苯氨基苯甲酸(A.R 级, 上海试剂厂产品)溶于 50ml 浓硫酸中。小心用水稀释并混匀, 冷却后用水稀释至 100ml。贮于阴凉处, 至少可稳定一个月。

硫酸银溶液: 称取 4.397g 硫酸银置于 1L 容量瓶, 加水溶解后, 稀释至刻度, 混匀。此溶液 1.00ml 可去除 1.00mg 氯离子。

氢氧化铝悬浮液: 溶解 125g 硫酸铝钾 $[\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}]$ 于 1L 蒸馏水中, 加热至 60°C, 然后边搅拌边缓缓加入 55ml 氨水。放置约 1h 后, 移至一个大瓶中, 用倾斜法反复洗涤沉淀物, 直到洗涤液不含氯离子为止。加水

收稿日期: 1991 年 11 月 5 日

参 考 文 献

- 1 Riedel K et al. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 1989, **44**:85
- 2 吴元喜. 传感技术学报. 1991, **4**(1): 37
- 3 Karube I et al. *Analytica Chimica Acta.* 1988,

213:69

- 4 Strand S E et al. *JWPCF*, 1984, **56**(5):464
- 5 李友荣等. 生物工程学报. 1989, **5**: 235
- 6 Riedel K. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1988, **28**: 316
- 7 中华人民共和国国家标准. GB7488-87, 五日生化需氧量 (BOD₅) 的测定。

10 mine dust samples. AFB 1 and 15 fungal extracts. The results showed that 10 (100%) mine dust, AFB₁ and 5(33.3%) fungal extracts significantly increased the frequency of micronucleated cells in *vicia faba* root tips with a clear dose-effect relationship suggesting that these samples had mutagenic activity and the relevant environmental factors might be responsible for the incidence of lung cancer in the mine area and liver cancer in Fu-shui county. Thus micronucleus test in *vicia faba* root tips proved to be an effective method in the research of environmental mutagens.

Key words: *vicia faba* root tips, micronucleus, mine dust, fungal extracts, mutagenicity.

Study on a Long Life BOD Microbial Sensor. Sun Yusheng, Liu Xianmei et al. (Hebei Institute of Chemical Technology and Light Industry, Shijiazhuang 010050): *Chin. J. Environ. Sci.*, **13(4)**, 1992, pp.59—63
A microbial sensor consisting of thin membrane which was prepared by using *Bacillus cereus* cells (isolated from active sludge) immobilized in synthetic polymers and oxygen electrode combined with the sensor were used for the estimation of BOD. The lifetime of the sensor was determined to be more than 16 months. A linear relationship was observed between the relative current decrease and the level of BOD of the standard solution (GGA) in a range of 5—60mg/L. The response time of the biosensor is less than 8 minutes and the average relative error is 1% when an environmental standard sample was used to test the sensor, BOD values determined with the sensor were identical to those determined with the conventional method for the same water samples.

Key words: BOD sensor, BOD electrode, microbial sensor.

Determination of Nitrate-N and Nitrite-N in Surface Water by Highly Sensitive Spectrophotometric Method. Qiu Xingchu, Zhu Yingquan, (Environmental Science Research Institute of Ganzhou Prefecture, Ganzhou 341000, Jiangxi Province), Li Cui-sheng (Forestry Science Research Institute of Ganzhou Prefecture, Ganzhou 341000, Jiangxi Province.): *Chin. J. Environ. Sci.*, **13(4)**, 1992, pp. 63—66

The conditions of the reaction of nitrate-N and nitrite-N with N-phenylanthranilic acid (N-PAA) were studied in detail and a highly sensitive spectrophotometric method was developed for the determination of trace amount of nitrate-N and nitrite-N in surface water. Maximum absorptions of both the colour products (N-PAA-NO₃⁻-N and N-PAA-NO₂⁻-N) appeared at wavelengths of 560—565 nm and the corresponding molar absorptivities were found to be 1.07×10^4 (NO₃⁻-N) and 1.77×10^4 l. mol⁻¹. cm⁻¹ (NO₂⁻-N). Beer's law was obeyed, in a concentration range of 0.03—0.15 μg/ml for NO₃⁻-N and 0.05—0.20 μg/ml for NO₂⁻-N. The interferences of foreign ions were examined and the method has been used to determine NO₃⁻-N and NO₂⁻-N in surface water with satis-

factory results obtained.

Key words: Nitrate-N, nitrite-N, spectrophotometry, N-phenylanthranilic acid, water pollution.

Identification of Spilled Oil at Sea Surface with Fuzzy Maximum Matrix Method. Xu Hengzhen, Li Zongping (Institute of Marine Environmental Protection, SOA, Dalian 116023): *Chin. J. Environ. Sci.* **13(4)**, 1992, pp. 67—69

A model of fuzzy maximum matrix for the identification of spilled oil at sea surface is established. the concept of fuzzy area of confidence level λ_i for identifying types of oil was introduced. Fuzzy dynamic clustering charts of fourteen common types of oil, two types of weathered oil and oil spill at sea surface are given out. Confidence level λ_i was found to be greatly influenced by weathering. After 30 days weathering, confidence levels for differentiating Ron Qiu Crude oil and 35# heavy diesel oil, from other thirteen types of oil, are in the ranges of $0.99939 > \lambda_i > 0.99725$ and $0.99791 > \lambda_i > 0.99026$, respectively. The method proved to be able to give more accurate result than the fingerprint recognition method.

Key words: fuzzy maximum matrix, fuzzy dynamic clustering chart, oil spills at sea.

Study on Soil Environmental Background Values in Fujian Province. Chen Zhenjin, Chen Chunsui, Liu Yongqing (Fujian Institute of Environment Protection 350003); Wu Yudian, Yang Sunkai, Lu Changyi (Institute of Environment Protection, Xiamen University 361005): *Chin. J. Environ. Sci.*, **13(4)**, 1992, pp. 70—75

With the methods of network and systematic layers, 123 typical sampling sections were selected and soil environmental background values for 61 elements were determined in the whole region of Fujian province. The results show that the soil background values for 15 rare-earth elements in Fujian are higher than those in the country, that the background values for sulphophilic and siderophilic elements in Fujian are also higher compared with those of the same elements in the country and that the background value of Se in the soil of Fujian is 0.55mg/kg, 2.5 times as high as the level of the country. The major factors affecting soil environmental background values in the province are analyzed and suggestions for reasonable development of soil resource proposed.

Key words: soil environmental background value, earth elements, Fujian province.

Chemical Speciation and Pollution of Heavy Metals in Rivers, Reservoirs and Waste Water in Urumqi Area. Chen Xibao et al. (Institute of Geography, Academia Sinica Beijing 100012): *Chin. J. Environ. Sci.*, **13(4)**, 1992, pp. 75—81

A research on physico-chemical speciation and characteristics of pollution of heavy metals Cd, Zn, Pb and Cu in certain water bodies in Urumqi area was carried out with a view of developing water resource as well as evaluating water quality in this area. The physico-chemical speciation of the heavy metals in water samples were determined by means