

# BOD 快速测定传感器的微生物膜 固定方法研究\*

刘宝红 孔继烈 陈 蕾 邓家祺\*\*

(复旦大学化学系, 上海 200433)

**摘要** 分别采用海藻酸钠包埋法、醋酸纤维素夹层法、戊二醛-牛血清白蛋白交联法等几种物理、化学方法制备固定化微生物膜, 并采用自制的微生物 BOD 传感器试验了各种膜对电极响应灵敏度、线性范围、响应时间、稳定性和寿命等性能的影响。比较了不同 pH、温度和交联剂、包埋剂用量下该传感器的性能, 获得了较满意的结果。实验表明, 以交联法制备的传感器性能最佳, 电极寿命达 40d, 测定 BOD 值时间为 10—15min, 方法的重现性和精密度均达 BOD 测定要求。本研究对于实现快速测定 BOD 传感器的商品化具有重要意义。

**关键词** 生物传感器, 生物耗氧量(BOD), 微生物电极。

生物耗氧量(BOD)表示水中所含有机物的污染程度, 是水质评价的重要指标。目前, 大多数环保部门对水样的检测均采用经典的 BOD<sub>5</sub> 测定方法, 需耗时 5d, 因此快速测定 BOD 的方法的研究在国际上引起了重视。

I. Karube 等<sup>[1]</sup>利用微生物耗氧量的原理首次研制成快速测定 BOD 传感器, 在日本已应用于工厂污水的实际测定<sup>[2]</sup>。我国在这方面的的工作还开展得较少, 近几年, 黄克服<sup>[3]</sup>、张先恩<sup>[4]</sup>、孙裕生等<sup>[5]</sup>先后发表过有关快速测定 BOD 传感器的报道。但如何优化微生物膜的制作条件以提高 BOD 微生物传感器的响应性能, 仍需进行深入的研究。

笔者曾报道了伏安法快速测定 BOD 微生物传感器的研制<sup>[6]</sup>, 为了获得响应迅速、稳定、使用寿命更长、线性范围更宽的微生物膜, 以期尽快实现快速测定 BOD 微生物传感器的商品化, 本实验对微生物敏感膜的固定方法作了进一步的研究, 获得了令人满意的结果。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

伏安式测氧仪(复旦大学科教仪器厂)、由伏安仪和自制大面积金氧电极(图 1)构成; X-Y 函数记录仪(重庆自动化仪表厂, 3086 型);

BOD 标准溶液 ( $2200 \pm 37 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ): 由 37.5mg 葡萄糖和 37.5mg 谷氨酸与 0.05mol/L 磷酸缓冲溶液(pH=7.28)配制而成(总体积为 25ml);

细菌培养液(LB 培养液): 葡萄糖(1%), 蛋白胨(1%), 氯化钠(0.5%), 谷氨酸(0.1%)和 pH=6.0 的磷酸缓冲液配成(总体积 100ml); 4%海藻酸钠, 醋酸纤维素薄膜; 戊二醛; 牛血清白蛋白。

### 1.2 微生物膜的固定方法

从斜面接菌种于 LB 培养液中, 恒温 30℃下振荡培养 24h, 5000r/min 条件下离心 15min, 用 0.85%NaCl 溶液洗涤 2 次并离心, 得到约 500mg 湿菌体, 保存于冰箱中(-25℃)待用。

(1)海藻酸钠包埋法 将培养好的湿菌体与 4%海藻酸钠以 1:1(W/W)混合在玻片上, 涂成均匀薄层(约 1mm 厚), 再用 4%CaCl<sub>2</sub> 溶液固化 1h 成膜, 取出洗净, 浸于 25%(V/V)甘油中, 4℃冰箱保存。

(2)醋酸纤维素薄膜夹层法 将培养好的湿菌体:(a)直接涂于醋酸纤维素薄膜上;(b)湿菌体以丝蛋白固定;(c)湿菌体以淀粉和聚乙烯醇固

\* 上海市科委资助研究课题 \*\* 联系人

收稿日期:1994-03-18

定,以 3 种方法涂在醋酸纤维素薄膜上,室温减压干燥成膜,于 4℃ 冰箱保存。

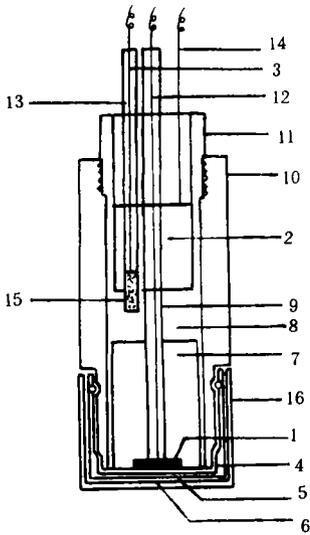


图 1 BOD 传感器电极构造

1. 工作电极(金圆盘电极)
2. 对极
3. Ag 丝
4. 氧透膜
5. 固定化微生物膜
6. 醋酸纤维素膜
7. 工作电极底座
8. 内电解液(0.1 mol · L<sup>-1</sup> KCl)
9. 绝缘管
10. 电极外套
11. 电极帽
12. 工作电极引出线
13. 参比电极(Ag/AgCl)
14. 对极引出线
15. 烧结瓷
16. 电极盖

(3) 戊二醛-牛血清白蛋白交联法 先将湿菌体与牛血清白蛋白混合,再加入戊二醛进行交联,在致密的尼龙网(80—300 目)上涂成均匀薄层,室温减压干燥成膜,于 4℃ 冰箱中保存。

### 1.3 测定步骤

以自制的 φ14mm 大面积金电极作阴极,覆上聚乙烯透氧膜和按上述方法制备的微生物膜,外覆醋酸纤维素膜构成氧电极,以钛电极作阳极,Ag/AgCl 电极作参比电极,内参液为 0.1 mol · L<sup>-1</sup> KCl,将制备好的氧电极插入恒温槽(30℃)中盛有 10ml 缓冲液的小烧杯中,待电位平衡后,用微量注射器注入 BOD 标准溶液,控制阴极电位 -0.70V(VS. 0.1 mol · L<sup>-1</sup> Ag/AgCl),测量电极的输出电流(仪器输出以“mV”显示)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 2 种电极性能比较

对 2 种电极进行比较结果见表 1。一种是市

场上销售的氧电极(铂电极 φ0.3mm),由于电极面积很小,平衡时间较长,响应值较小,且工作线性欠佳。另外用自制的大面积金电极作工作电极,则平衡时间短,响应值大,线性范围宽,电极性能明显优于市售电极。

表 1 2 种氧电极性能比较

电极	平衡时间 (min)	线性范围 (mg/L)	斜率 (mV/10mg · L <sup>-1</sup> )	响应时间 (min)
市售氧电极	60	10—40	54	15
自制氧电极	15—20	5—60	97	10

### 2.2 包埋剂和交联剂对电极响应的影响

由于包埋剂和交联剂用量直接影响到膜内的细菌量,分别对它们的用量考察结果见表 2、表 3。实验表明,随着细菌量的增加,响应也逐渐增大,但细菌量过多会导致膜的厚度增加,影响底物向电极的扩散,并影响细菌的固定效率,使响应时间延长,寿命缩短。综合实验结果,选择湿菌体与海藻酸钠以 1:1(W/W)混合成膜,以及湿菌体与 20μl 牛血清白蛋白和 10μl 戊二醛交联成膜的方法,所得的电极性能最佳。

表 2 细菌-海藻酸钠用量对电极的影响

细菌:海藻酸钠	线性范围 (mg/L)	斜率 <sup>1)</sup> (mV/10mg · L <sup>-1</sup> )	响应时间 (min)	寿命 (d)
3:1	5—60	98	11	7
2:1	5—60	102	8	10
1:1	5—60	97	10	25
1:2	5—50	79	12	25
1:3	10—50	71	15	20

1) 斜率(mV/10mg · L<sup>-1</sup>)表示每增加 10mg · L<sup>-1</sup> BOD 电压的变化量,它反映了电极响应的灵敏度。下文中的斜率均代表此物理意义。

### 2.3 温度、介质及 pH 对电极的影响

在 15℃—38℃ 范围内,考察了电极的响应特性,结果见图 2。在 25℃—35℃ 时,响应较大,结合考虑电极的使用寿命以及微生物的活性,选取 30℃ 为实验工作温度。

在磷酸盐-硼砂缓冲介质中,pH3.0—9.0 范围内对电极考察结果见图 3。在 pH6.0—7.5 时电极响应较大,选 pH7.0 为工作 pH 值。此外,分

别在 pH7.0 的几种不同缓冲介质中测试了电极 介质时电极性能较好,故选用 pH7.0 的该缓冲 液的响应性能,由表 4 可见使用磷酸盐-硼砂缓冲

表 3 细菌-戊二醛-牛血清白蛋白用量对电极影响

细菌 (mg)	戊二醛 (μl)	牛血清白蛋白 (μl)	线性范围 (mg · L <sup>-1</sup> )	斜率 (mV/10mg · L <sup>-1</sup> )	响应时间 (min)	寿命 (d)
50	0	0	5—70	81	10	7
50	5	15	5—20	28	12	14
50	10	30	5—20	21	15	14
50	10	20	5—70	87	10	40
50	10	15	5—60	48	10	35
50	15	30	5—60	70	15	30
50	20	20	5—45	37	15	30

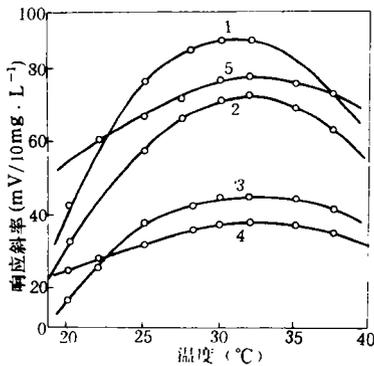


图 2 温度对电极响应的影响

- 1. 海藻酸钠包埋法
- 2. 直接醋酸纤维素夹层法
- 3. 丝蛋白固定法
- 4. 淀粉-PVA 固定法
- 5. 戊二醛-牛血清白蛋白交联法

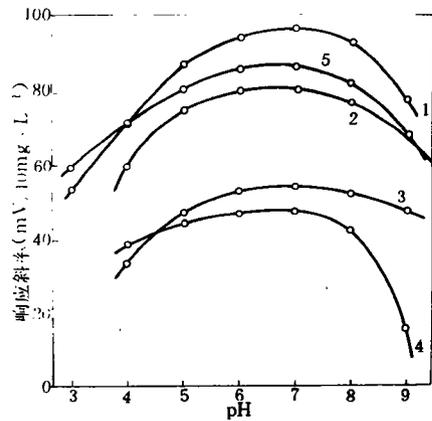


图 3 pH 对电极响应的影响

图中 1,2,3,4,5 含义同图 2

表 4 缓冲介质的影响

性能	缓冲介质			
	磷酸盐-硼砂	B-R	磷酸-柠檬酸	tris-HCl
线性范围 (mg · L <sup>-1</sup> )	5—60	5—50	5—60	10—50
斜率 (mV/10mg · L <sup>-1</sup> )	97	54	87	51
响应时间 (min)	10	15	12	15

### 2.4 不同方法固定微生物膜的响应及线性范围比较

由对各种膜响应考察的工作曲线(见图 4) 得出,海藻酸钠包埋法固定的膜斜率最大,即响 应最好,但结合考虑线性响应范围,其中以戊二 醛-牛血清白蛋白交联法固定的膜线性范围最 宽,而且响应斜率也较大。

### 2.5 不同微生物膜响应时间的比较

在对各种微生物膜的性能考察中(表 5)发 现,不同膜在不同温度的缓冲液中活化时间不 同,即使在相同温度的介质中也稍有差异,这可 能与膜的厚度、包埋剂和交联剂有关。由于海藻 酸钠包埋法固定的膜是湿膜,故活化时间较短, 只需 0.5h 左右,而干膜的活化时间较湿膜长。

将各种膜均在 34℃ 下活化后,对 BOD 的响 应时间基本相同,大约需要 5—15min 达到平衡,

由于反应受动力学控制,因此实验时将每次读数 间隔选为 10min。

表 5 电极的活化和响应时间比较<sup>1)</sup>

固定方法	活化时间(min)			响应时间 (min)
	T <sub>1</sub> (25℃)	T <sub>2</sub> (30℃)	T <sub>3</sub> (34℃)	
海藻酸钠包埋法	70	45	35	8
醋酸纤维涂层法	75	60	45	10
丝蛋白固定法	90	75	50	12
淀粉-PVA 固定法	90	75	50	10
戊二醛-牛血清白蛋白交联法	120	80	45	10

1) 表中数据均为 3 次实验平均值

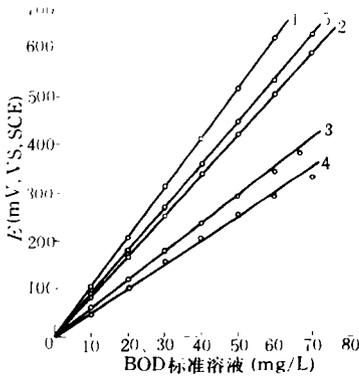


图 4 工作曲线

图中 1,2,3,4 和 5 的含义同图 2

活性迅速衰减;此外,由于海藻酸钠易溶于磷酸盐溶液,所以也不适于长期使用,因此以化学方法固定的微生物膜稳定性要比物理方法好。

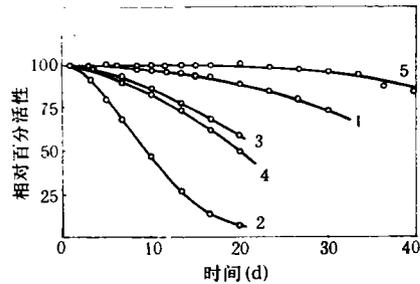


图 5 电极稳定性曲线

图中 1,2,3,4 和 5 含义同图 2

2.6 不同微生物膜的稳定性比较

通过对各种膜的稳定性和使用寿命考察(图 5)发现,戊二醛-牛血清白蛋白交联法固定的膜稳定性较好,寿命可达 40d,此时其相对活性仍保持 90%;而醋酸纤维素夹层法固定的膜稳定性较差,极易流失,在一个星期内活性较高,以后

2.7 不同微生物膜回收率测定的比较

采用标准曲线法,对 5 个样品进行回收实验,结果见表 6。戊二醛-牛血清白蛋白交联法固定的膜平均回收率为 100.2%,且相对标准偏差较小,即这种方法的精密度和准确度较好。

表 6 回收率测定<sup>1)</sup>

加入量 (mg · L <sup>-1</sup> )	检出量(mg · L <sup>-1</sup> )					回收率(%)				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
5.5	5.8	6.0	5.7	5.7	5.6	105	109	104	104	104
11.0	11.5	11.7	11.7	11.8	11.2	105	106	106	107	102
27.5	27.6	27.7	27.6	27.8	27.4	100	101	100	101	99
40.5	40.1	40.6	39.5	40.3	40.3	99	100	98	99	99
57.0	55.2	55.0	53.1	54.2	56.3	97	96	93	95	99
平均回收率(%)						101.2	102.4	100.2	101.2	100.2
相对标准偏差(s)						3.63	5.13	6.00	6.00	1.64

1)1,2,3,4 和 5 含义同图 2

(下转第 27 页)

表 7 污染特点和绿化模式配置

类型	范围 (m)	污染特点 <sup>1)</sup>					绿化植物	模式
		SO <sub>2</sub>	TSP	HCl	Cl <sub>2</sub>	NH <sub>3</sub>		
I	<300	+	+	++	++	++	大叶黄杨, 木槿, 丁香, 美人蕉, 草等	草+灌
II	300—1500	+	+	+++	+++	+++	女贞, 海桐, 大叶黄杨, 草等	草+灌
III-1	1500—3000	+++	+++	+++	++	++	大叶黄杨, 白腊, 女贞, 构树, 加杨, 草等	乔+灌+草
III-2	3000—4000	+++	+++	+	+	+	加杨, 合欢, 悬铃木, 银杏, 丁香, 木槿等	乔+灌+草
IV, I	>4000	++	++	+	+	+	大叶黄杨, 毛白杨, 加杨, 核桃, 木槿, 丁香等	乔+草或 纯乔木林

1) + 轻污染 ++ 中污染 +++ 重污染

I、II 类型区为 HCl、Cl<sub>2</sub>、NH<sub>3</sub> 污染区, 其中 II 类型污染重于 I 类型。在绿化植物选择时依抗性而论 II 类要高于 I 类区。由于该 2 种类型均在厂区范围内, 因此不应种植高大树木, 以免影响污染物扩散。最好选用草+灌绿化模式。III-1 类型是 5 种污染物复合污染重发区, 绿化植物以综合指数高的种类效果较好。III-2 类型区应选择抗 SO<sub>2</sub> 和 TSP 高的植物。这 2 个类型绿化模式以净化能力强的乔、灌、草相结合形式较好。距污染源 4000m 以远属 IV 类和 I 类 (>12000m) 区, 该区内污染物明显降低, 污染较轻, 绿化时充分注意其多种效应, 模式以纯乔木林或乔草式较好。

### 3 小结

(1) 该项工程投产后, 按污染程度可分为 4 个类型。其中 300—4000m 是污染重发区, SO<sub>2</sub>、TSP 最大浓度超标严重, 最大地面浓度 c<sub>m</sub> 出现位置在 1000—1500m 处。

(2) 经对 26 种常见绿化植物综合评价, 有 9 种植物综合性能较好, 可作为第 I 类绿化植物选

用。

(3) 在厂区内, 绿化模式以草灌式为宜, 厂区以外乔灌草或乔草式等均可选用。

(4) 由于植物减污效果随时间、树种、位置不同而变化, 因此各绿化模式随上述因素减污效果变化尚需进一步研究。

### 参考文献

- 1 国家环保局编. 空气与废气分析方法. 北京: 中国环境科学出版社, 1990: 75—126
- 2 蒋志学等. 环境生物学. 北京: 中国环境科学出版社, 1987: 132—184
- 3 冯采芹等. 绿化环境效应研究. 北京: 中国环境科学出版社, 1992: 15—62
- 4 孔国辉等. 大气污染与植物. 北京: 中国林业出版社, 1986: 158—191
- 5 黄会一等. 生态学报. 1981, 1(4): 315
- 6 孔国辉等. 中国环境科学. 1983, 3(6): 241—
- 7 李宗恺等. 空气污染气象学原理及应用. 北京: 气象出版社, 1985: 532—556
- 8 郝吉明等. 大气污染控制工程. 北京: 高等教育出版社, 1989: 110—134

(上接第 11 页)

### 3 结论

通过对各种方法固定的微生物膜比较可见, 海藻酸钠包埋法固定的微生物膜必须浸于甘油中, 保存比较困难, 且测定时容易发生溶胀和流失现象, 不适于实际应用; 而戊二醛-牛血清白蛋白交联法固定的膜各方面性能较好, 又易于保存和使用, 故目前笔者采用交联法来制备 BOD 敏感膜, 并用自制的氧电极采用伏安法用于一些实际污水中 BOD 的快速测定, 获得了满意的结

果<sup>[7]</sup>。所以 BOD 微生物传感器这种快速测定方法可望应用于环境监测、食品卫生、临床医疗等实际工作中。

### 参考文献

- 1 Isao Karube et al. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. . 1979, 7: 745
- 2 铃木周一. 生物传感器. 北京: 科学出版社, 1988: 379
- 3 黄克服等. 微生物通报. 1988, 6(1): 32
- 4 张先恩. 环境科学学报. 1986, 6(2): 184
- 5 孙裕生等. 环境科学. 1989, 10(6): 53
- 6 邓家祺, 孔继烈等. 上海环境科学. 1991, 10(3): 25

## Abstracts

Chinese Journal of Environmental Science

**Semiconductor Photocatalytic Degradation of Anionic Sodium Dodecylbenzenesulphonate in Aqueous Solutions.** Jiang Weichuan and Wang Qiquan (Dept. of Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310027); *Chin. J. Environ. Sci.*, 15(6), 1994, pp. 1—3

Anionic sodium dodecylbenzenesulphonate (DBS) can be photodegraded in aqueous suspension of  $\text{TiO}_2$  powder by irradiation with a 300W high pressure mercury lamp. The photocatalytic ability of anatase and rutile  $\text{TiO}_2$  in the solutions at different pH values has been studied. The effects of adding  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{Cu}^{2+}$  on the photodegradation have also been discussed. The results show that anatase  $\text{TiO}_2$  has a more efficiently catalytic ability than rutile  $\text{TiO}_2$ .  $\text{H}_2\text{O}_2$  can reduce the rate of degradation in a basic solution.  $\text{Cu}^{2+}$  can increase the rate of degradation in an acidic solution.

**Key words:** semiconductor, photocatalysis, sodium dodecylbenzenesulphonate.

**Application of the  $\text{H}_2\text{O}_2$ - $\text{O}_3$  Process for the Treatment of Wastewaters from the Production Process of Naphthalene-sulfonate and Anthraquinone Sulfonic Acid Dye Intermediates.** Yang Zhihua, Zhu Wanpeng et al. (Dept. of Environ. Eng., Tsinghua University, Beijing 100084); *Chin. J. Environ. Sci.*, 15(6), 1994, pp. 4—7

A  $\text{H}_2\text{O}_2$ - $\text{O}_3$  process in which hydroxyl free radical ( $\text{OH}$ ) is generated and acts as a non-selectively strong oxidizer was developed and applied to treating refractory wastewaters from the production process of naphthalenesulfonate and anthraquinone sulfonic acid dye intermediates before a biological treatment.

It was found that this treatment process could quickly decompose refractory organics in the wastewaters and had a higher ability to improve their biodegradabilities than other conventional methods. Thus treated wastewaters could also be coagulated and flocculated more effectively. It is also found that some groups of the aromatic compounds in the effluents from this treatment process were substituted with one or more OH groups, indicating that the decomposition of organics in the treatment with this newly developed process may follow a hydroxyl free radical mechanism.

**Key words:** dye intermediates, wastewater treatment,  $\text{O}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , hydroxyl free radical, biodegradability.

**Study on the Microbial Film Immobilization Methods for Preparing the Biosensors for Rapid BOD Determination.** Liu Baohong et al. (Dept. of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200433); *Chin. J. Environ. Sci.*, 15(6), 1994, pp. 8—11

Several physical and chemical methods, such as the sodium alginate-calcium chloride embedding process, the cellulose acetate sandwiching process and the bovine serum albumen-glutaraldehyde cross-linking process, were used to prepare the immobilized microbial films which were then combined with an oxygen electrode to make the newly developed biosensors for rapid BOD determination. The tests were carried out for the effects of different films on the performances of electrode, including its response sensitivity, linearity ranges, response time, stability and life-time. The performances of the biosensors which were formed under different process conditions such as pH values, temperatures, cross-linking agents and the amounts of embedding agents used were also compared. The results show that the biosensors prepared with the cross-linking process have the most preferred performances, including an electrode life-time of up to 40 days, a BOD determination time of 10 to 15 minutes, and the reproducibility and accuracy of determinations both in compliance with the requirements of standard BOD determination.

**Key words:** biosensor, biological oxygen demand (BOD), microbial electrode.

**Formation of Hydrogen Peroxide in Gaseous Phase and the Determination of Its Atmospheric Concentrations.** Zhang Jianbo and Tang Xiaoyan (Center for Environ. Sci., Peking University, Beijing 100871); *Chin. J. Environ. Sci.*, 15(6), 1994, pp. 12—15

Studies on the formations of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and organic hydrogen peroxides in the HC- $\text{NO}_2$ -dry air systems were carried out in an indoor smog chamber. The results from simulated experiments show that the maximum concentrations of  $\text{H}_2\text{O}_2$  formed are directly proportional to the initial concentrations of hydrocarbons ( $\text{HC}$ )<sub>0</sub>;  $\text{H}_2\text{O}_2$  is formed by following a similar rule to that of ozone ( $\text{O}_3$ ), and the ratio of ( $\text{O}_3$ )<sub>max</sub> / ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )<sub>max</sub> decreases with increasing ( $\text{HC}$ )<sub>0</sub>. In the system of ethylene or pentane, the ratio of  $\text{H}_2\text{O}_2$  to total hydroperoxides (THP) is about 0.6; and in the system of propylene, more organic hydrogen peroxides are formed with extending irradiation time. The results from atmospheric monitoring show that the formation of  $\text{H}_2\text{O}_2$  is dependent on emission of pollutants, sunshine and temperature, and it has a lower concentration in both morning and evening and a peak concentration occurred after noon, following a daily change pattern similar to that of ozone. The atmospheric  $\text{H}_2\text{O}_2$  was found to have a maximum concentration of  $1.3 \times 10^{-9}$  in spring and of  $0.64 \times 10^{-9}$  in autumn as monitored in Beijing in 1991.

**Key words:** hydrogen peroxide, simulated