

微生物传感器测定水中 BOD 的研究进展

张国伟,李捷,刘泽浩,李永强

(青岛理工大学环境与市政工程学院,山东 青岛 266033)

摘要: 详细介绍了 BOD 微生物传感器的构造、基本工作原理以及微生物膜的制备和固定化技术;分析了近年来 BOD 微生物传感器的发展情况及其使用过程中的存在问题。根据 BOD 传感器的研究现状提出今后的研究方向和工作重点。

关键词: BOD 生物传感器;微生物固定化技术;微生物膜

中图分类号: X853

文献标识码: A

文章编号: 1674-6732(2010)-05-0015-04

Study on the Microbial Sensor Determining BOD in Water

ZHANG Guo-wei, LI Jie, LIU Ze-hao, LI Yong-qiang

(Institute of Environment & Municipal Engineering, Qingdao Technological University, Qingdao, Shandong 266033, China)

ABSTRACT: The structure, working principle and microbial immobilization methods of BOD microbial sensors were introduced. Based on the current development of BOD microbial sensor, the problems existed in working process was discussed. According to the current study status of BOD biosensors, we also suggested the possible research direction and the key points in future work.

KEY WORDS: BOD biosensor; microbial immobilization; biofilms

生化需氧量(BOD)是环境监测最基本的水质污染指标之一,现在测定 BOD 的标准方法是 5 日生化需氧量法,即样品在 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 的条件下培养 5 d,测定样品培养前后的溶解氧,两者之差即为 5 日生化需氧量。此方法存在着耗时耗力、易受干扰、结果重复性差等缺点,而且对操作人员的技术要求较高。为此,各国环境科学工作者开展了快速测定 BOD 方法的研究,焦点集中在缩短测定时间上,1977 年, KARUBE 等首先研发出基于微生物传感器法的 BOD 测定仪^[1],在其后的几十年间, BOD 快速测定仪的研究取得了长足的发展。

1 BOD 微生物传感器及其工作原理

1.1 BOD 微生物传感器的组成

生物传感器由生物识别元件和物理换能器组成,它可以将被测物浓度与可测量的物理化学信号关联起来。生物识别元件(微生物膜)是生物传感器的核心部分,很大程度上决定了 BOD 传感器的性能和测定的准确性。BOD 传感器的换能器的主要作用是将微生物降解水中有机物产生的变化转化成可以定量表示的信号输出。BOD 传感器的换

能器大致有溶解氧(DO)电极、光纤换能器、压电晶体(SPQC)系统^[2],以及以生物燃料电池(MFC)构建的换能器等,目前应用最广泛的换能器是 Clark 溶解氧探针。

1.2 BOD 微生物传感器的工作原理

BOD 微生物传感器一般是由固定化的微生物膜与氧电极紧密结合而组成。当传感器处于氧饱和的磷酸盐缓冲溶液中时,微生物处于内源呼吸阶段,其呼吸活性是恒定的,当溶解氧扩散进入氧电极表面的速率达到恒定时, BOD 电极输出的电流达到稳定。当含有一定浓度缓冲液的 BOD 标样(或水样)加入时,水样中溶解性可生化降解的有机物被微生物作为营养源所利用,同时微生物呼吸活性加强,消耗溶液中的溶解氧,相应其扩散进入电极表面的速率减小,输出电流值降低,并在几分钟内达到新的稳定态,上述两种稳定电流值之差,

收稿日期: 2010-04-06; 修订日期: 2010-05-01

基金项目: 国家建设部科技项目(05-K2-6),青岛理工大学博士基金项目(C2007-006)。

作者简介: 张国伟(1984—),女,硕士在读,从事环境微生物学研究工作。

与被测试样浓度呈线性关系,借此可以进行 BOD 值的测定^[4]。

2 BOD 微生物传感器的研究进展

2.1 BOD 微生物传感器的主要类型

30 多年来, BOD 传感器在微生物、换能器、测量原理等方面有了许多改进,大致有这样几种类型:

(1) 以溶氧电极为基础的微生物电极。2005 年,李捷等研制了 BOD 微生物传感流动注射检测仪,其测量周期为 15 min,误差率 < 5%,偏差 < 5%,自动化程度高,准确度、稳定性均达到国家标准,具有良好的适应性^[4]。流通式 BOD 微生物传感器检测仪的研制实现了加样与充氧的同步化,解决了人工加样的误差,可以适用于不同来源的水样测定^[5]。

(2) 利用固定化微生物颗粒作为生物识别元件。使用这种高灵敏度生物传感器的 BOD 快速测定仪,可以检测 BOD 质量浓度低于 1 mg/L 的水样,该仪器采用多孔高分子凝胶材料包埋固定化微生物技术,制备出不同直径不同微生物量的颗粒,仪器采用反应器式测量方式,广谱性好^[6]。2002 年,李花子等采用固定化微生物分散悬浮的方法进行了 BOD 微生物传感器的研究,成功解决了夹膜法菌体易流失、响应小、稳定性差的问题,传感器在 BOD 质量浓度 0 ~ 500 mg/L 的范围内具有很好的线性关系,相关系数可达到 0.99 以上,响应时间在 12 min 内^[7]。

(3) 以燃料电池电极与固定化微生物膜组成的微生物电极。2004 年,CHANG 报道了一种无需电子媒介物的微生物燃料电池型传感器,响应重现性标准偏差 < 10%。该传感器可稳定运行 5a 以上^[8]。2005 年,CHANG 又报道了一种新型的微生物燃料电池 BOD 传感器,加入叠氮化物和氰化物作为抑制剂,以减少由于硝酸盐和氧气等高氧化还原电子受体的存在对传感器输出信号产生的干扰,该传感器适用于测定含有硝酸盐或氧气的水样,可以提高其测量的准确性,省去对样品预处理的麻烦^[9]。

此外,2000 年,CHEE 报导一种光导纤维作为换能器的生物传感器,用于测定低 BOD 值,响应值与 BOD₅ 法有很好的相关性^[10]。

2.2 BOD 传感器微生物的类型

不同的菌种对不同的微生物的降解能力不同,选择时可根据污水的具体情况而定。CHEE 等利用嗜盐菌 (*Pseudomonas putida*) 检测低浓度的 BOD,其不受氯化物及重金属的影响^[11]。利用耐渗透压的酵母菌作为敏感材料进行 BOD 的快速测定,其结果具有较好的稳定性^[12]。使用溶胶凝胶法固定二高氯酸 4,7-二苯基-1,10-邻菲咯啉钌作为氧敏感材料所制得测量淡水样品的光化学 BOD 微生物传感器,在 2 ~ 30 mg/L 范围内其线性相关系数达到 0.97 以上^[13]。RASTOGI 报道使用从活性污泥中筛选出多种具有协同代谢功能的合成微生物菌团作为电极响应菌株,所测的 BOD 值重现性在 5% 以内,传感器可以稳定工作 180 d^[14]。REISS 等将 α 淀粉酶与 *Trichosporon cutaneum* 一起固定化,制备生物识别元件,可以提高 BOD 传感器在测定高含量淀粉废水时的响应能力及准确度^[15]。

2.3 BOD 微生物膜的固定化技术

微生物固定化技术是微生物传感器制作的核心技术和关键环节,影响着微生物传感器的准确度、稳定性、使用寿命等性能。目前,国内外普遍采用的用于 BOD 微生物传感器上的微生物固定化技术主要有吸附法、包埋法、交联法、夹层法。由于各种固定化方法都有其独特的优缺点,故目前还没有一种理想的、普遍适用的方法,在实际工作中,还须根据研究目标选择合适的微生物固定技术,使其达到最理想的效果。采用聚乙烯醇包埋法对耐高渗透压的酵母菌进行包埋,可在 15 min 内完成一个海水 BOD 标准样品的测量,测定结果具有很好的线性关系^[16]。采用有机改性溶胶凝胶-PVA 包埋技术包埋菌种,以光化学氧传感膜为二次传感制备的光化学 BOD 微生物传感器响应良好,菌膜荧光强度变化速率最大值与测定液种 BOD 值在一定范围内呈良好的线性关系^[17]。

2.4 BOD 微生物传感器的商业现状

1983 年,Nissh in Denki 公司成功研制了世界上第一台商业化 BOD 传感器,现在美国、日本、德国、比利时等国家已有商品化的 BOD 快速测定仪应用于各种水体的 BOD 测定。中国对 BOD 生物传感器的研究和探索始于 20 世纪 80 年代,2002 年 7 月,国家正式公布 BOD 微生物传感器快速测定的国家标准^[18]。

3 BOD 微生物传感器的优点及存在的问题

BOD 生物传感器用于水样 BOD 测定,具有以下优点:

(1) 仪器面板配有按钮,可进行简易的操作。并可与电脑连接,生物传感器产生的信号可用计算机处理,直接显示或者打印测定结果,避免了稀释法繁琐的操作和计算^[19],实现智能化监测。

(2) 相对于稀释法,只要保持微生物活性相对稳定且测定过程中其他条件不变,其结果重现性高,测试周期低。李洛娜等利用聚乙烯醇包埋枯草芽孢杆菌,制作 BOD 生物传感器微生物膜,对国家标准品及几种典型水样的检测结果表明,该微生物传感器的响应时间为 8 min,测试结果准确度较高,相对误差 $\leq 5\%$,可连续稳定测试 10 d 以上,与 5 日法的测试结果有良好的相关性^[20]。

(3) 对于可生化性好的水样,测量稳定,重现性好。BOD 快速测定仪的温控精度好,其测量过程在恒温条件下进行^[21]。

(4) 不使用任何危险试剂,排出的废液都无害。

(5) 相对于标准稀释法,节省了人力、物力,为环境监测的连续性提供了可能,降低了环境监测成本。

BOD 微生物传感器的出现为环境监测的连续化和自动化提供了可能,但目前大部分传感器还处于研究阶段,监测过程中仍存在着一些问题。

传统的 5 日法所反映的是微生物菌群 5d 内代谢污水中易降解有机物及高分子聚合物等各种代谢活动的综合结果,而 BOD 微生物传感器则反映的是所固定的微生物在短时间(几分钟)内的代谢活性,所以两种方法所测得的结果不会达到完全一致;微生物培养的不稳定性会影响传感器的稳定性;并且微生物的活性会随着使用时间的累积而逐步降低;对于含有高浓度聚合物的废水、含重金属水样、农药类以及高浓度杀菌剂类废水,会对菌膜中的微生物起到毒害作用,所测结果与 5 日法没有可比性,故不适合此类废水的测定。

综上所述,目前急需解决的问题是如何提高微生物膜的稳定性及其广谱性。

基于以上的种种不足,今后的研究重点应放在如何制备广谱、高效、对特殊测定环境适应性强的微生物膜和开发新的固定化材料和固定化技术,提高微生物膜的稳定性和使用寿命上。

4 BOD 微生物传感器的研究展望

BOD 微生物传感器提供了快捷方便的检测水中 BOD 的方法,但由于其存在各种缺陷,故目前还不能完全替代 5 日法应用于环境监测,今后的研究方向将集中在以下几个方面:① 制作活性高、选择性强的微生物膜,提高生物传感器的响应范围及稳定性。由于不同菌种对于不同有机物的降解能力不同,可考虑针对不同的污水选择专门的菌种进行培养、驯化、制膜,并通过筛选、驯化以获得适应特殊水质的菌种。② 考虑使用几种微生物混合制作微生物膜。但由于不同菌种之间存在相互干扰性,混合菌种之间可能会有竞争、捕食等关系,影响传感器的测量稳定性。③ 对微生物活性降低的微生物膜进行再生研究,刘建昌对微生物膜的再利用进行了初步的探索研究,对失去大部分活性的微生物膜进行再培养,实验结果初步表明,在 1/2 MS 培养基中加入一定量的植物激素,不仅可以使膜的电位值显著升高,且活性强,稳定性好,可重复利用,降低检测成本^[22]。④ 改进微生物固定化技术,解决微生物膜种菌株易流失等问题。

微生物传感器的推广具有较好的环境效益与社会效益,是环境研究工作者的重点研究课题及迫切需要解决的实际难题。研究重点应放在如何制作活性高、重现性好、具有良好的稳定性且适用污水范围广泛的微生物膜上。

[参考文献]

- [1] KARUBE I, MATSUNAGA T, MITSUDA S, et al. Microbial electrode BOD sensors[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1977, 102(19): 1535-1547.
- [2] ZHANG J Z, BAO L L, YAO S Z, et al. A series piezoelectric quartz crystal microbial sensing technique used for biochemical oxygen demand Assay[J]. *Assay Microchemical Journal*, 1999(62): 405-412.
- [3] 李海燕, 王乐恒. BOD 生物传感器(BOD₅)的研究及应用现状[J]. *北京建筑工程学院学报*, 2004, 20(3): 13-16.
- [4] 李捷, 宋志文, 孙新成, 等. 新型 BOD 微生物传感流动注射检测仪的研制[J]. *环境污染治理技术与设备*, 2005, 6(3): 91-93.
- [5] 李捷, 吴昊, 李洛娜. 流通式 BOD 微生物传感检测仪的研制[J]. *水资源保护*, 2009, 25(4): 55-57.
- [6] 徐润华, 戴猷元, 张华龙, 等. 高灵敏度生物传感器 BOD 快速测定仪的产业化进展[J]. *应用科技*, 2008, 16(16): 18-20.
- [7] 李花子, 施汉昌, 王建龙, 等. 微生物传感器检测方法的研究[J]. *上海环境科学*, 2002, 21(7): 405-407.

(下转第 22 页)

2.3.2 参数修改

进入岛津 TNP-4110 服务菜单可以进行参数修改,有时会收到事半功倍的效果。下面举3个例子说明。

(1) ANALOG ADJUST 模拟信号输出调整:仪器运行满2年后一般会出现远程监控数据与现场数据存在偏差的现象。其原因是元器件老化引起的非线性失真,导致原有4~20 mA 模拟信号漂移,只需调整该参数使上下位机数据一致即可解决。

(2) SMPL TN OXIDIED TIME(MIN) 总氮氧化时间:TN 是很难测准的,原因是 TN 测量过程易受浊度影响。适当增加总氮氧化时间,可降低浊度影响。

(3) ENABLE WATCHDOG RESET 看门狗自动复位:将其设为1,可在操作软件死机情况下自动进行复位,设备无需断电。

2.3.3 经验共享

(1) 试剂问题:

a. 氢氧化钠不能用塑料瓶来装,否则会在瓶底出现强碱氧化反应产生的白色絮状物,严重干扰 TN 测量。

b. 更换试剂时要保留好原有试剂,待新试剂

测量通过后,旧试剂才能处理掉。否则一旦新更换的试剂上机出现问题,你无法很快判断出是试剂问题还是其他原因引起。

c. 切忌将新老试剂混用,这样反而缩短新试剂使用时间。有时在解决试剂失效问题时,更新全部试剂、纯净水往往能最终解决问题。

d. 稀释、溶解、清洗用纯水最好为纯度较高的去离子水,否则时间长了结垢会直接导致光强下降影响测量精度。

(2) 做好仪器电源单独接地,这直接关系到 TN 测量曲线零点漂移大小。

(3) 仪器本身输入电压是 AC 100 ± 10 V,需要通过稳压器转换而不是直接将其插入 220 V 插座。

[参考文献]

- [1] 胡雪峰,方圣琼,秦荣,等. 长江口南槽水域污染物迁移和分布规律[J]. 环境污染与防治,2004,26(3):179-181.
- [2] 桑艳红,李恒,周鹏,等. 使用岛津在线 TNP-4110 分析仪需注意的问题[J]. 环境监测管理与技术,2006(4):48.
- [3] 岛津在线 TNP-4110 分析仪原厂使用说明书[Z].
- (上接第17页)
- [8] CHANG I S, JANG J K, GIL G C, et al. Continuous determination of biochemical oxygen demand using microbial fuel cell type biosensor[J]. Biosensors and Bioelectronics,2004,19(6):607-613.
- [9] CHANG I S, MOON H, JANG J K, et al. Improvement of a microbial fuel cell performance as a BOD sensor using respiratory inhibitors[J]. Biosensors and Bioelectronics,2005,20(9):1856-1859.
- [10] CHEE G J, NOMURA Y, IKEBUKURO K, et al. Optical fiber biosensor for the determination of low biochemical oxygen demand [J]. Biosensors and Bioelectronics,2000,15(7-8):371-376.
- [11] CHEE G J, NOMURA Y, KARUBE I, et al. Biosensor for the estimation of low biochemical oxygen demand[J]. Analytica Chimica Acta, 1999,379(1-2):185-191.
- [12] 张悦,王建龙,李花子,等. 生物传感器快速测定 BOD 的研究[J]. 高技术通讯,2001,11(8):37-39.
- [13] 周廷尧,王旭东,赵赞,等. 基于氧猝灭原理的淡水 BOD 微生物传感器[J]. 厦门大学学报:自然科学版,2008,47(2):208-212.
- [14] RASTOGI S, KUMAR A, MEHRA N K, et al. Development and Characterization of a Novel Immobilized microbial Membrane for Rapid Determination of Biochemical Oxygen Demand Load in Industrial Waste-waters[J]. Biosensors Bioelectron,2003,18(1):23-29.
- [15] REISS M, HEIBGES A, MMTZGER J, et al. Determination of BOD-values of starch-containing waste water by a BOD-biosensor [J]. Biosensors Bioelectron,1998,13(10):1083-1090.
- [16] 李花子,张悦,施汉昌,等. BOD 生物传感器在海洋监测中的应用[J]. 海洋环境科学,2002,21(3):14-17.
- [17] 戴媛静,钟振明,陈曦,等. 基于氧猝灭的有机改性溶胶-凝胶微生物传感器测定 BOD 的研究[J]. 环境科学学报,2003,23(5):683-688.
- [18] 王德龙. 微生物传感器快速测定 BOD 的标准方法颁布实施 [J]. 中国给排水,2003,20(4):13-16.
- [19] 李花子,施汉昌,王建龙. BOD 微生物传感器的研究与发展 [J]. 重庆环境学报,2003,25(1):43-46.
- [20] 李洛娜,钮玉龙,李捷,等. BOD 微生物传感检测仪中高效微生物膜的研究[J]. 环境工程学报,2009,3(3):437-441.
- [21] 胡笑妍. 微生物传感器快速测定水中 BOD 的研究与讨论[J]. 职业圈,2007(10):160-161.
- [22] 刘建昌. BOD 微生物膜的再利用研究初探[J]. 环境科学导刊,2007,26(2):94-96.