

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

戴媛静¹, 钟振明¹, 陈曦^{1*}, 王小如¹, KWOKYIN WONG² (1. 厦门大学化学化工学院分析科学教育部重点实验室, 厦门 361005; 2. 香港理工大学应用生物与化学科技系, 香港九龙)

摘要: 通过有机改性溶胶凝胶 PVA 包埋方法固定微生物菌株, 以氧光化学传感器作为二次传感, 制备了响应良好的光化学 BOD 微生物传感器。在此基础上, 考察了微生物传感膜的活化浓度、温度、pH、无机盐及部分金属离子对传感器响应的影响, 并对传感器的重现性、储存稳定性和线性范围进行了考察, 实验结果表明 BOD 含量在 0—100 mg/L 浓度范围内与传感器的荧光值成线性关系, 传感膜的响应活性保持较好, 具有较长的使用寿命和良好的稳定性。

关键词: 光化学传感器; 微生物菌膜; 溶胶-凝胶; BOD 检测

Ormosils-PVA BOD sensing film based on oxygen luminescence quenching

DAI Yuanjing¹, ZHONG Zhenming¹, CHEN Xi¹, WANG Xiaoru¹, KWOKYIN WONG² (1. The Key Laboratory of Analytical Sciences of MOE and Department of Chemistry, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Department of Applied Biology and Chemical Technology, The Hong Kong Polytechnic University, Hunghom, Kowloon, Hong Kong, China)

Abstract: An organically modified silica (ormosil)-PVA as an immobilization material for *Hansenula anomala* was investigated to develop an optochemical BOD sensor for the determination of BOD. After preconditioning, the BOD sensing film can be steadily used for two months. The linear fluctuant coefficient (R^2) in the ranges of 0—100 mg/L and 0—40 mg/L was 0.9950 and 0.9604, respectively. The effects of activated concentration, temperature, pH, sodium chloride concentration and coexisting metal ions to BOD determination were investigated.

Keywords: Optochemical sensor; Microbe membrane; Ormosil; BOD determination

水体中有机物的含量表征着水体的质量, 人们常用生化需氧量(BOD)来反映水体有机污染的程度。目前大多数环保部门对水样的检测均采用经典的 BOD₅ 测定方法。但 BOD₅ 法以及后来出现的检压式库仑法、BOD 测压法、瓦勃呼吸计法、短时日法等, 均存在着耗时长、操作繁琐等缺陷^[1, 2]。

近二三十年来, 随着光纤技术的兴起与发展, 光纤光化学传感器在环境监测方面的研究与应用受到国内外研究者的关注^[3]。通常光纤光化学传感器的工作过程为: 由光源发出的光经过光纤送入光纤敏感探头(固定有敏感试剂)处, 被测物质与试剂相作用, 引起光的强度、波长、频率、相位、偏振态等光学特性发生变化, 被调制的信号经过光纤送入光检测器和信号处理装置, 最终获得待测分析物的信息^[3]。若将微生物敏感膜固定在光纤敏感探头上, 通过氧敏感膜作为二次传感, 即可形成光纤光化学 BOD 微生物传感器, 并可应用于检测水体中 BOD 的含量。用

收稿日期: 2002-10-28; 修订日期: 2002-12-16

基金项目: 国家 863 计划环境与资源领域 2001AA635100 课题和国家自然科学基金委员会与香港研究资助局联合科研基金资助项目。

作者简介: 戴媛静(1977—), 女, 硕士研究生 * 通讯联系人 E-mail: xichen@xmu.edu.cn

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www>

微生物传感器法测定 BOD 具有快速、简便和可重复性等特点. 1977 年 Karube^[4] 等人首次报道了用微生物固定化技术制成微生物传感器测定污水的 BOD. 其中细菌的固定化技术是提高微生物传感器性能的关键因素之一. 目前常用的细菌固定化方法有海藻酸钠包埋法^[5]、夹层法^[6]、聚乙烯醇包埋法^[7]和溶胶凝胶包埋法^[8]等. 利用海藻酸钠包埋法和纯 PVA 包埋, 微生物膜干燥后成型较佳, 但在磷酸盐缓冲液中海藻酸钙会逐渐溶解, 而 PVA 膜易产生水溶胀现象. 夹层法操作简单, 但膜在水溶液中极易发生菌体流失, 膜的稳定性较差. 为了克服以上固化方法的不足, 本文利用硅酸盐有机改性 PVA 的溶胶凝胶有机杂化包埋方法固化微生物菌株, 以氧光化学传感器作为二次传感, 制备了基于氧光导检测的 BOD 微生物传感器. 在此基础上, 对此光化学 BOD 微生物传感器用于 BOD 测定的工作条件以及影响因素进行了研究.

1 实验方法

1.1 仪器

GD-1 型微光测量仪(西安瑞科电子设备有限公司), 自制样品池, R928 光电倍增管(Hamamatsu, Japan), Echrom98 色谱数据处理工作站(大连依利特科学仪器有限公司), WH-2 微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂).

1.2 试剂

实验所用硅氧烷偶联剂正硅酸甲酯(TMOS)(分析纯)购自中国医药(集团)上海试剂化学公司, 甲基三甲氧基硅烷(Me-TriMOS)购自 Fluka(Switzerland), 聚乙烯醇购自 Aldrich(USA), 4,7-二苯基-1,10-邻菲咯啉钌 $[Ru(dpp)_3^{2+}]$ 由香港理工大学应用生物与化学科技系合成.

5% PVA 水溶液: 称取一定量聚乙烯醇粉末, 用热水溶解配制成 5% (W/V) 的 PVA 水溶液. 磷酸盐缓冲溶液(pH=7.2)用 KH_2PO_4 和 Na_2HPO_4 (均为分析纯) 配制. BOD 标准溶液: 称取葡萄糖和谷氨酸(均为分析纯)各 0.0750 g, 用磷酸缓冲溶液定容至 100 mL (GGA 溶液), 其 BOD 值为 1000 ± 185 mg/L. 其它试剂均为分析纯. 实验用水为石英亚沸蒸馏水.

1.3 菌种及培养

菌种: 异常汉逊酵母(北京微生物研究所); 液体培养基: 麦芽汁琼脂(12Brix 麦芽汁 1.0 L, 琼脂 15.0 g); 培养方法: 将菌种接种到盛有液体培养基的三角瓶中, 25 °C 下振荡培养 24 h, 经 3000 r/min 离心分离, 用磷酸盐缓冲溶液 3 次洗涤、分离, 获得湿菌种. 储于磷酸盐缓冲溶液中用于制膜. 4 °C 下保存备用.

1.4 氧敏感膜与微生物膜的制备

氧敏感膜: 按一定体积比量取 TMOS 和 Me-TriMOS 于 5 mL 平底反应瓶中, 加入饱和的 $[Ru(dpp)_3^{2+}]$ 的 THF 溶液, 旋涡振荡 1 min 后, 再逐滴振荡加入 0.01 mol/L HCl, 60 °C 下敞口磁力搅拌水浴加热 3 h. 取所得凝胶液于经乙醇和硝酸预处理过的玻片上均匀涂布成膜, 烘箱中干燥 12 h 备用^[9].

微生物膜: 量取一定体积的 TMOS 与 Me-TriMOS 于 5 mL 平底反应瓶中, 振匀后加入一定体积 0.01 mol/L HCl, 水浴磁力搅拌 1 h. 取所得凝胶液与 5% PVA 水溶液按一定比例混合, 并加入一定体积的菌液. 充分振荡均匀, 在氧传感膜表面均匀涂布成膜, 并于室温通风处干燥.

1.5 微生物传感器工作系统及测定

BOD 光纤光化学传感装置采用单支光纤传导荧光信号. 蓝色发光二极管作为激发光(LED, $\lambda_{max} = 460$ nm) 直接照射在样品池中的菌膜上, 响应后产生的荧光信号通过光纤传导进

入光电倍增管. 由光电倍增管输出的电流信号经微光测量仪转化为电压信号, 再由色谱工作站转换为数字信号, 由计算机记录, 分析和处理(图 1). 为了获得更好的分辨率, 实验利用数据处理工作站的一阶导数功能, 对记录的信号进行处理, 获得一阶导数响应图谱. 系统中 LED 与光纤呈 90° 放置, 这样可以有效消除激发光的干扰, 以实现高的测量精度和准确性.

测量步骤: 取实验菌膜于样品池中, 空气中静置至输出一恒定数字信号. 此时, 向样品池中加入一定体积的 GGA 标准溶液, 在不搅拌、不通空气和测量槽密封的条件下, 测定液中菌膜周围的溶解氧将被迅速地消耗, 而溶液中溶解氧来不及扩散补充, 导致菌膜周围呈现一种局部缺氧的状态, 经氧敏感膜二次传感表现为氧膜的荧光强度值逐渐升高. 这种荧光强度变化速率的大小, 随测量池中有机物浓度的不同而变化, 在一定 BOD 浓度范围内, 两者之间存在着一定的线性关系.

2 结果与讨论

2.1 细菌固定方法的选择

实验研究了 3 种细菌的固定方法: 溶胶凝胶包埋法、PVA 包埋法和有机改性溶胶凝胶-PVA 包埋法. 实验结果表明, 有机改性溶胶凝胶-PVA 包埋法所制得的膜机械性能较好, 响应较快, 能够克服 PVA 的溶胀问题, 能获得剩余活性高、稳定性较好的传感膜(表 1). 因此, 实验选择有机改性溶胶凝胶-PVA 包埋法进行进一步的研究.

表 1 不同细菌包埋方法的比较

Table 1 Comparison of different immobilization methods of *Harsenmulla anomala*

包埋方法	膜成分	响应平衡时间 [*] , min	机械性能
溶胶凝胶法	TMOS, Me-TriMOS、菌液	~ 60	较好, 不易从氧膜上剥离
PVA 包埋法	PVA、菌液	~ 10	泡水易溶胀, 易从氧膜上剥离
有机改性溶胶凝胶-PVA 包埋法	TMOS, Me-TriMOS、PVA、菌液	~ 15	良好, 不易剥离, 不溶胀

* 从加入 GGA 溶液至荧光响应信号值即氧膜的荧光强度值达到最大.

2.2 有机改性溶胶凝胶-PVA 包埋法的优化

PVA 的加入顺序对膜性能有很大的影响. 实验表明: 加入 PVA 溶液与 TMOS、Me-TriMOS 一起水解缩聚所制得的膜易产生 PVA 相与凝胶相的分离, 且易产生水溶胀; 而 TMOS、Me-TriMOS 先水解缩聚, 取其产物与 PVA 有机杂化所制得的膜不会产生两相的分离, 与氧膜的附着牢固, 不产生水溶胀现象, 机械性能良好.

醇类对菌类有一定的毒害作用. 为尽可能保证膜内细菌的活性, 制膜过程中应避免醇类的引入, 反应起始液中不加入互溶剂乙醇, 而是利用水解反应产生的甲醇作为互溶剂, 并保证水解缩聚时反应瓶的敞口与通气, 以便尽快使甲醇在菌体加入前就已基本挥发完全.

菌体采用磷酸盐缓冲溶液悬浮保存, 加入凝胶液中时此缓冲液起到了良好的缓冲混合液酸度的效果, 以维持体系的酸度在细菌适应的范围之内.

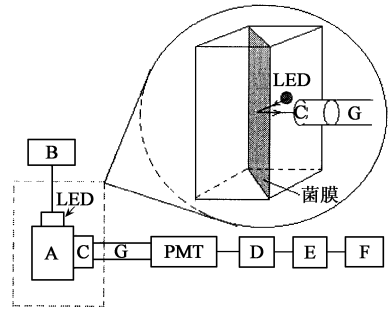


图 1 微生物传感器工作系统图示

A: 样品池 B: 电源 C: 光窗 D: 微光测量仪 E: 色谱工作站 F: 计算机 G: 光纤 LED: 发光二极管 PMT: 光电倍增管

Fig. 1 Flow chart of optochemical BOD sensor

2.3 影响传感器响应的因素

2.3.1 菌膜活化浓度 菌膜一般于冰箱中 4℃下冷藏储存,此时细菌处于休眠状态,活性较低.因此菌膜进行测量之前需放置于一定浓度的 GGA 溶液中进行活化.活化浓度不同,细菌恢复的活性不同,菌膜的响应速度也有所差异.温度 30℃、pH 7.2 时采用不同活化浓度活化的菌膜对 BOD 为 100mg/L GGA 溶液的响应变化曲线见图 2.选择 $C_{GGA} = 200 \text{ mg/L}$ 为最佳活化浓度.

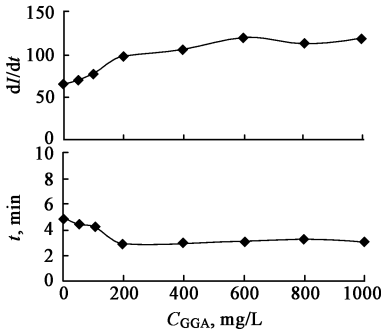


图 2 活化浓度对菌膜响应信号及平衡时间的影响

Fig. 2 Effect of activated concentration on microbe membrane

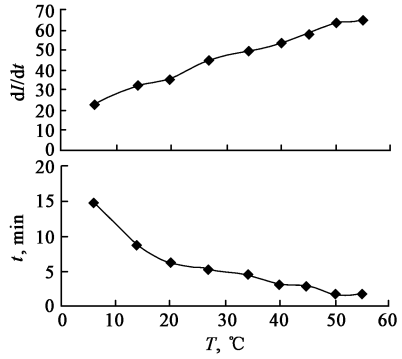


图 3 温度对菌膜响应信号及平衡时间的影响

Fig. 3 Effect of Temperature on microbe membrane

2.3.2 温度的影响 实验考察了在不同的温度下 (pH= 7.2), 菌膜对 BOD 值为 100 mg/L 的 GGA 溶液表现出的不同的响应活性.实验结果(见图 3).从实验结果可以看出,温度变化对生物传感器活性影响较大,为了保持菌膜响应的一致性,保持测定状态的恒温就非常的重要.综合考虑响应活性、响应时间和实际实验条件,选择 30℃为实验工作温度.

2.3.3 pH 的影响 将异常汉逊酵母包埋在有机改性溶胶-凝胶中制成菌膜后,考察了此时外部溶液 pH 对细菌活性的影响.图 4 为菌膜在温度为 30℃和不同 pH 值条件下对 BOD 为 100 mg/L 的 GGA 溶液的响应曲线. pH 值在 4.5—9.0 范围内,外部溶液的 pH 变化对菌膜的响应活性影响不大.在细菌包埋于有机改性 sol-gel+PVA 膜后,具有一定憎水性的 sol-gel+PVA 构架将细菌与外界的环境隔离开来,极性小的分子如 O_2 较易进出菌膜,而强极性的 H^+ 则受到 sol-gel+PVA 构架的排斥,较难进入膜内,减少了外界 pH 对细菌活性的影响,从而能有效的提高细菌抗 pH 影响的能力.由于 BOD 的测定通常以磷酸盐缓冲溶液为底液,除非样品酸碱性异常需进行中和外,一般可进行直接测定.

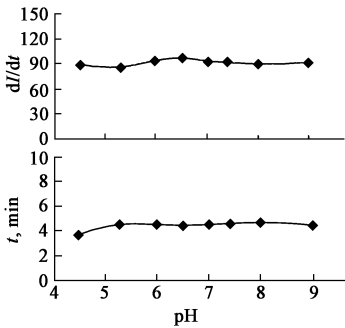


图 4 pH对菌膜响应信号及平衡时间的影响

Fig. 4 Effect of pH on microbe membrane

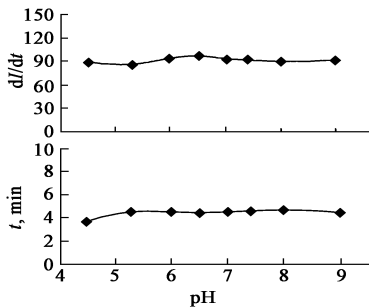


图 5 NaCl对菌膜响应信号及平衡时间的影响

Fig. 5 Effect of NaCl on microbe membrane

较难进入膜内,减少了外界 pH 对细菌活性的影响,从而能有效的提高细菌抗 pH 影响的能力.由于 BOD 的测定通常以磷酸盐缓冲溶液为底液,除非样品酸碱性异常需进行中和外,一般可进行直接测定.

2.3.4 盐度的影响 在恒温 30℃, pH7.2 的实验条件下,在样品池 BOD 值为 100 mg/L 的 GGA 溶液中加入 NaCl 进行盐度的影响实验.

实验结果表明: 随 NaCl 浓度增加, 微生物膜的响应活性下降, 响应时间增加. 由于对于淡水菌异常汉逊酵母而言, NaCl 会使其细胞产生收缩, 呼吸作用减弱, 因此盐度对其有较大的抑制作用. NaCl 对传感器活性的影响曲线见图 5(图中 NaCl% 为质量百分比).

2.3.5 金属离子的影响 实验考察了温度 30℃, pH 7.2 时部分金属离子存在下, 菌膜对特定 BOD 浓度 GGA 溶液响应的情况. 从表 2 可以看出, 当金属离子浓度与 GGA 浓度的比值为 1:10 时, Ag^+ 对菌膜的响应有明显的减弱效应, Pb^{2+} 对菌膜响应亦有一定的负面影响, 其他金属离子对菌膜响应的影响均小于 10%, 在菌膜测定的误差允许范围之内. Ag^+ 和 Pb^{2+} 具有一定的毒性, 它们的存在会沉淀菌体蛋白质使其变性或与蛋白质的巯基结合而使菌体失去活性, 因此在实际应用中, 这些重金属离子的影响应给予关注.

表 2 共存金属离子的影响

Table 2 Effect of some coexisting metal ions

M^{n+}	$\Delta I/I_0$ ($\times 100\%$)	M^{n+}	$\Delta I/I_0$ ($\times 100\%$)	M^{n+}	$\Delta I/I_0$ ($\times 100\%$)	M^{n+}	$\Delta I/I_0$ ($\times 100\%$)	M^{n+}	$\Delta I/I_0$ ($\times 100\%$)
Al^{3+}	7.78	Fe^{3+}	-6.98	Mg^{2+}	-3.68	Ba^{2+}	6.97	Ca^{2+}	3.85
Cu^{2+}	-1.45	Zr^{2+}	3.95	As^{2+}	-4.47	Bi^+	0.85	Mn^{2+}	6.99
Sr^{2+}	3.73	W^{6+}	4.26	V^{4+}	3.05	Ni^{2+}	-6.13	Sn^{2+}	-3.51
Co^{2+}	0.45	Cd^{2+}	5.03	Mo^{6+}	0.93	Se^{6+}	-6.65	Li^+	7.53
Cr^{3+}	-1.60	Ti^{4+}	-5.88	Pb^{2+}	-14.44	Ag^+	-81.10		

2.4 膜性能表征

2.4.1 重现性 实验考察了 30℃ 时菌膜在 pH=7.2 溶液中对 BOD 值为 100 mg/L 的 GGA 溶液响应的重现性(见图 6). 菌膜连续测定 7 次的荧光强度变化速率最大值的平均相对标准偏差为 2.54%, 其数值在 BOD₅ 分析要求的重现性范围内, 所以利用该方法可以满足 BOD 分析精度要求.

2.4.2 稳定性 实验考察了相同实验条件下 ($T=30^\circ C$, pH=7.2) 单片菌膜连续使用 2 个月的响应情况.

结果表明其对相同浓度 GGA 溶液的响应灵敏度虽有一定的波动, 但都保持在起始值之上(见图 7). 测定结果说明, 传感膜内微生物没有产生泄漏且活性保持较好, 具有较长的使用寿命和良好的稳定性.

2.4.3 线性关系 将等量的葡萄糖和谷氨酸配制成 BOD 标准溶液, $T=30^\circ C$, pH=7.2 的实验条件下, 分别在 0—100 mg/L、0—40 mg/L 两个不同的浓度范围检测菌膜的线性关系, 结果见图 8, 图 9, 其 r 值分别为 0.9950 和 0.9604. 可见, 在一定的 GGA 浓度范围内, 荧光强度变化速率 (dI/dt) 的大小与样品中有机物浓度呈良好的相关性. 实验还初步考察了几份实际标准样品, 测定值与标准值之间的误差均在 10% 以内, 在菌膜测定的误差允许范围之内(表 3).

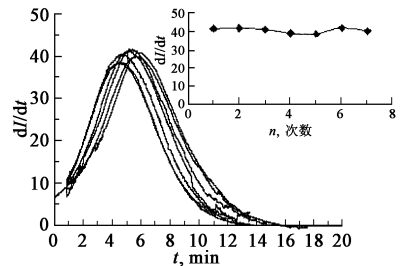


图 6 菌膜重现性测试

Fig. 6 The reproducibility of microbe membrane

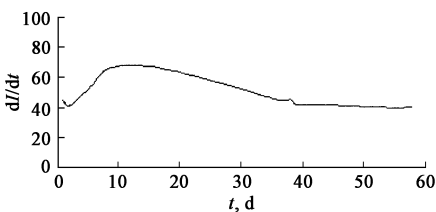


图 7 菌膜的稳定性测定

Fig. 7 The stability of microbe membrane for two months

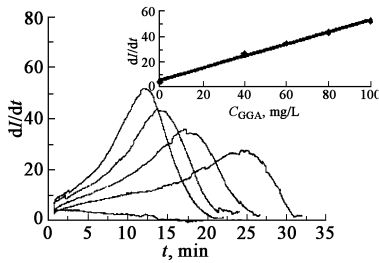


图 8 菌膜在 0—100 mg/L 的线性关系

Fig. 8 The responses to different concentrations of GGA in 0—100 mg/L

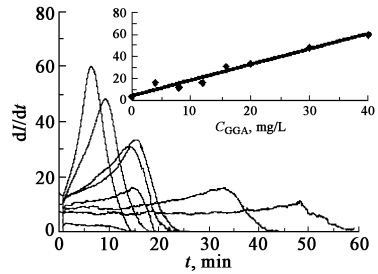


图 9 菌膜在 0—40 mg/L 的线性关系

Fig. 9 The responses to different concentrations of GGA in 0—40 mg/L

表 3 实际标准样品的测定结果

Table 3 Determination of samples using microbe membrane

标准样品*	标准值, mg/L	测量值, mg/L	差值, mg/L	误差值, %
1	35	36.78	1.78	5.09
2	55	55.74	0.74	1.35
3	75	67.79	-7.21	-9.61

* 标准样品为按国家标准方法配置的 GGA 溶液, 底液为 pH 7.2 的磷酸盐缓冲溶液

在实际样品的测量过程中, 菌膜的测量基线稳定, 波动幅度小于 1%, 且周期较短, 从一次进样到下次进样时间少于 30 min, 因此可以满足实际样品在线测量的要求。

3 结论

本研究以异常汉逊酵母为工作菌株, 以光化学氧传感膜为二次传感, 采用有机改性溶胶凝胶 PVA 包埋技术包埋菌种, 制备了机械性能良好、活性较佳、重现性较好的 BOD 微生物膜。实验结果表明: 菌膜荧光强度变化速率最大值与测定液中 BOD 值在一定范围内呈良好的线性关系。实验还考察了活化浓度、温度、pH、无机盐及部分金属离子对菌膜响应活性的影响, 并对菌膜响应活性的长期稳定性进行了考察。这些结果为今后研究和开发耐盐度、抗毒性的光化学 BOD 微生物传感器提供一定的基础。

参考文献:

- [1] 水和废水监测分析方法指南编委会. 水和废水监测分析方法指南(上册)[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1990. 215
- [2] 胡国强, 等. 生化需氧量测定技术的进展[J]. 环境科学丛刊, 1985, 12: 8
- [3] 范世福, 陈莉, 肖松山, 等. 光纤化学传感器及其发展现状[J]. 光学仪器, 1999, 21(1): 37
- [4] Karube Isao, Hara Kenji, Satoh Ikuo, *et al.* Amperometric determination of phosphatidyl choline in serum with use of immobilized phospholipase D and choline oxidase [J]. *Ana Chim Acta*, 1979, 106(2): 243
- [5] 张平奇, 安立超, 曾 彬. 生物传感技术用于 BOD 的快速测定[J]. 环境监测管理和技术, 1995, 7(1): 34
- [6] 魏恩琪, 尹立志, 袁秀文, 等. 用微生物传感器测定 BOD 的研究[J]. 城市环境与城市生态, 1998, 11(4): 46
- [7] 潘继伦, 董明容, 韩丽君, 等. 聚乙烯醇凝胶固定化简单节杆菌的研究[J]. 离子交换与吸附, 1994, 10(4): 334
- [8] 李清文, 王义明, 罗国安. 溶胶凝胶技术在生物传感器中的应用[J]. 化学通报, 2000, 5: 14
- [9] Jiang Yaqi, Chen Xi, Wong Kwokyin, *et al.* Luminescence quenching behavior of oxygen sensing osmosil films based on ruthenium complex [J]. *Chemical Research in Chinese University*, 2001, 17(4): 374