

DOI :10.3969/j.issn.1004-6933.2012.04.018

基于接枝二茂铁介体的 BOD 微生物传感器

胡 磊^{1,2} 李 轶^{1,2}

(1. 河海大学浅水湖泊综合治理与资源开发教育部重点实验室, 江苏 南京 210098 ;

2. 河海大学环境学院, 江苏 南京 210098)

摘要 : 开发出以接枝二茂铁为介体的微生物传感器测量 BOD , 将二茂铁(ferrocene, Fc) 通过缩合反应接枝到大分子介孔材料 SBA-15 的表面, 作为微生物生化反应传递电子的介体, 与活性污泥微生物混合固定化于聚乙烯醇(PVA) 里, 制备成微生物敏感膜, 并与玻碳电极耦合, 构建三电极传感系统, 用于快速测量水样的 BOD 质量浓度。结果表明, 传感器测量的质量浓度线性范围为 2 ~ 300 mg/L, 连续测量 20 个样品的精密度为 4.2% , 能连续工作 35 d。讨论 pH、温度和重金属对传感器响应的影响。实际水样的测试结果表明, 由微生物传感器测得的 BOD 与 BOD₅ 的具有良好的相关度。

关键词 接枝二茂铁 ; 介体 ; BOD ; 微生物传感器

中图分类号 : X832 文献标识码 : A 文章编号 : 1004-6933(2012)04-0078-04

Microbial sensor for measurement of biochemical oxygen demand based on ferrocene-grafted mediator

HU Lei^{1,2}, LI Yi^{1,2}

(1. Key Laboratory of Integrated Regulation and Resources Development on Shallow Lakes, Ministry of Education, Hohai University, Nanjing 210098, China ;

2. College of Environment, Hohai University, Nanjing 210098, China)

Abstract : A novel microbial sensor using a ferrocene (Fc)-grafted SBA-15 mediator immobilized in a PVA matrix was developed for measurement of the biochemical oxygen demand (BOD). Fc was grafted onto the SBA-15 surface via ion-association and the product was labeled as SBA-15-Fc, and applied to a modified glassy carbon electrode for measuring BOD rapidly in the three-electrode system. The results showed a linear relationship between the anodic current responses and glucose/glutamate (GGA) concentration ranging from 2 mg/L to 300 mg/L. The reproducibility of a single sensor measuring 20 samples was less than 4.2%, and the sensor could continuously work for 35 days. The effects of pH, temperature, and heavy metal on the BOD response were studied. The detection results of real samples show that the BOD measured by the microbial sensor was in good correlation with that obtained with the BOD₅ method.

Key words : ferrocene-grafted ; mediator ; BOD ; microbial sensor

生化需氧量(BOD)作为重要的衡量水与废水中有机污染程度的指标,在水污染控制中具有非常重要的作用。传统经典的 BOD 测量方法需要 5 d 时间,而且操作复杂、受外界影响大,不能满足对污染水体或污染源在线监测的要求^[1]。自 Karube 等^[2]于 1977 年最先研制出用于测量 BOD 的微生物传感

器后,国内外很多学者研发出各种基于不同菌种及混合菌种的 BOD 传感器^[3-6]。现有的基于微生物传感器的快速测定方法将测量时间从 5 d 缩短到 30 min,极大地满足了对水和废水 BOD 监测的要求,但是也存在着对水样中 DO 依赖大等问题。

近年来,越来越多的学者^[7-9]研究利用氧化还原

基金项目 : 自然科学基金(51009050)、中央高校基本科研业务费专项资金(2010B04614)、河海大学浅水湖泊综合治理与资源开发教育部重点实验室开放基金(2008KJ003)

作者简介 : 胡磊(1977—),男,讲师,博士研究生。研究方向为水环境监测和水环境修复。E-mail: huleiian@hhu.edu.cn

介体代替分子氧作为监测微生物分解代谢的最终电子受体。在微生物的生化反应中氧化态的介体失去电子,转变为还原态的介体,此过程的电子变化产生传感器电流响应,从而可以定量反应中氧化还原物质的量。很多利用介体促进微生物生化反应的研究,反应体系是水溶液,且介体的浓度很高,如达 40 mmol/L^[10]和 55 mmol/L^[11],导致介体的浪费。笔者针对以上问题,开发出基于接枝二茂铁介体的微生物传感器,将介体接枝到大分子材料中,并包埋于聚乙烯醇(PVA)中,保持了介体的性能并避免了介体的流失,很好地应用于测量废水中的 BOD。

1 实验部分

1.1 材料与试剂

二茂铁(Fe),KH550(3-aminopropyltriethoxysilane, 3-APTES),聚乙烯醇(PVA,醇解度 90%,分子量 22000)购自南京曙光化学有限公司,其余试剂均采用分析纯试剂。磷酸盐缓冲溶液(PBS,pH=7.2)(由 36 mL 的 71.64 g Na₂HPO₄·12H₂O 和 14 mL 的 31.21 g NaH₂PO₄·2H₂O 混合配制而成)。BOD 标准校正溶液(GGA)^[12],采用葡萄糖(150 mg/L)、谷氨酸(150 mg/L)混合溶液。

1.2 二茂铁介体的接枝

将 Fe 与微生物固定化于 PVA 包埋材料中,在微生物对有机物的降解反应中代替氧为最终的电子受体。由于 Fe 是小分子有机物,其分子的大小(nm 级)远远小于包埋材料的孔径(平均为 μm 级),故需要与大分子有机物进行接枝。SBA-15 是一种具有巨大比表面积的介孔氧化硅材料,其丰富的表面羟基为接枝创造了良好的条件,其制备过程见文献[13],二茂铁甲酸的制备见文献[14]。将 6.9 g 二茂铁甲酸和 6.63 g KH550 溶解在 50 mL 氯仿和 50 mL N,N-二甲基甲酰胺的混合溶剂中,加入 4.67 g 1-羟基苯并三唑,当上述溶液冷却到 0℃时,加入 6.68 g EDCI(1-Ethyl-3-(3-(dimethylamino)propyl) carbodiimide hydrochloride)和 3.6 g NMM(N-methylmorpholine)。将溶液从冰浴中取出,常温搅拌 24 h,加入 8 g SBA-15 并继续搅拌 48 h。过滤所得的混悬液,滤渣在索氏提取器中用氯仿过夜洗涤除去游离的成分,所得的固体真空干燥,得到 14.2 g 样品,样品被标记为 Fe-SBA-15。Fe-SBA-15 的合成步骤见图 1。

1.3 微生物培养及固定化

微生物选用从活性污泥(取自江心洲污水处理厂)分离出的混合菌种。将取来的活性污泥经双层纱布过滤后,在滤液(混合菌种)中投加好氧菌培养基,包含 0.1% 蛋白胨,0.1% 牛肉膏及 0.1% CaCl₂。

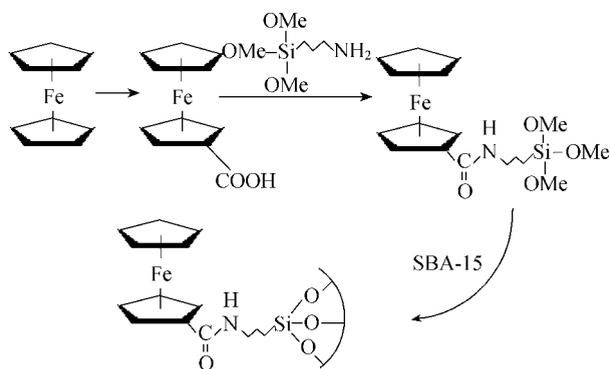


图 1 Fe-SBA-15 合成示意图

在 30℃ 水浴中曝气培养 24 h,菌液在 550 nm 波长处的吸光度达到 0.8 时,将菌液以 7 200 r/min 离心 5 min,离心后用 pH 为 7.2 的磷酸盐缓冲液(PBS)清洗,清洗后的菌液再次离心。重复此过程两遍后,将离心后的菌泥与 Fe-SBA-15 介体悬浊液、10% 的 PVA 溶胶进行混合包埋,混合均匀后压制成片(厚度为 0.3 μm),室温晾干后裁剪成适合的大小,作为传感器的生物敏感材料。

1.4 传感器系统的构建

利用三电极系统作为电化学的换能器。分别用玻碳电极(截面直径 6 mm)为工作电极,Pt 电极为对电极,饱和甘汞电极为参比电极,以通路的电流值为测量指标。玻碳电极在使用前分别用 1.0 μm、0.3 μm 和 0.05 μm α-Al₂O₃ 打磨至光滑,每次打磨后均用去离子水仔细清洗。最后打磨好的玻碳电极在室温下晾干。和以前相关的研究^[15]相比,本研究使用了更少的 Fe 介体,并有效地阻止介体从包埋材料中流失。

2 结果和讨论

2.1 接枝 Fe 样品的表征

分析 Fe-SBA-15 和 SBA-15 样品的红外光谱(图 2),SBA-15 在 3 750 cm⁻¹处有清晰的振动谱带,此振动吸收为硅羟基吸收峰,Fe-SBA-15 在波数 3 750 cm⁻¹处此振动谱带明显退化,显示硅羟基被反应消耗。Fe-SBA-15 在波数 3 100 ~ 2 800 cm⁻¹和 1 550 ~ 1 250 cm⁻¹处有明显的振动,此振动带归属于 N—H

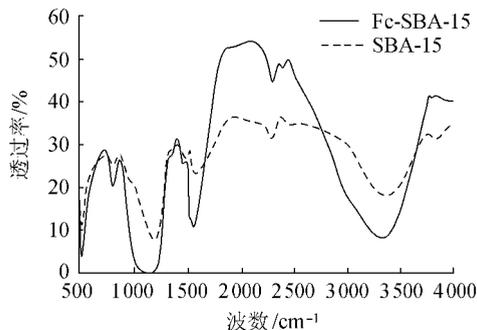


图 2 Fe-SBA-15 和 SBA-15 的红外谱图

和 C—H 键^[1], 因为纯 SBA-15 在此区域没有振动, 而 KH550 中含有 N—H 和 C—H 键, 说明 KH550 的骨架存在于 Fc-SBA-15 中。另外, 1700 ~ 1500 cm⁻¹ 处的振动归属于酰胺基团, 酰胺基团是 KH550 的氨基与二茂铁甲酸的羧基缩合的结果, 由此证明了 Fc 已被成功接枝到了 SBA-15 上。

由图 3 可知, 电极插入于 0.01M 的 PBS 溶液中, 电位的扫描速度为 50 mV/s, 固定了 Fc-SBA-15 的介体具有明显的氧化还原峰, 而对照样 SBA-15 则没有氧化还原峰, 证明了在电化学反应中起电子传递作用的物质是 Fc。

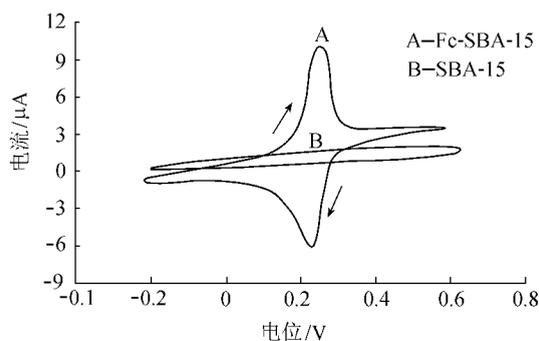


图 3 介体的循环伏安

2.2 传感器的性能

在实验优化的条件下, 用 BOD₅ 为 50 mg/L 的 GGA 标准溶液对传感器进行测试。结果表明, 传感器的质量浓度线性范围为 2 ~ 300 mg/L, 单个传感器连续测量 20 个标准样品的精密率为 4.2%, 传感器能连续稳定工作 35 d (传感器响应电流衰减在 15% 以下)。

2.3 pH、温度和重金属离子的影响

溶液中的 pH 值影响着微生物的生理状态。考察在一定的营养条件 ($\rho(\text{BOD}_5) = 100 \text{ mg/L}$, pH 为 6 ~ 9) 下传感器固定化微生物的活性。实验表明, 传感器响应电流差 ΔI 随着 pH 值的增加而逐渐增大, 响应电流差 ΔI 在 pH 值为 7.2 时最大, 然后逐渐下降。因此 pH 值为 7.2 时是最佳条件, 具体见图 4。

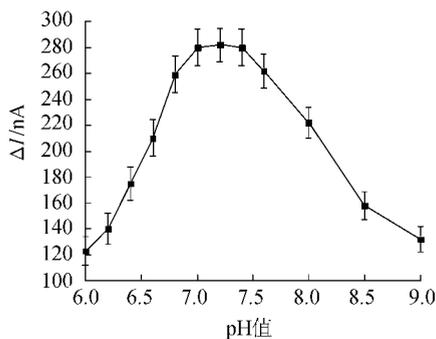


图 4 pH 对传感器的影响

温度是影响微生物生理代谢的重要因素, 适宜的温度能提高微生物的生理活性。在 $\rho(\text{BOD}_5) =$

100 mg/L, 温度为 20 ~ 40℃ 的营养条件下, 考察了传感器的响应电流差。结果表明, 随着温度的上升, 传感器的响应电流差逐渐增大, 温度达到 30℃ 时响应值最高, 随后响应值缓慢下降。结果表明温度为 30℃ 时为系统微生物的最适宜温度, 详见图 5。

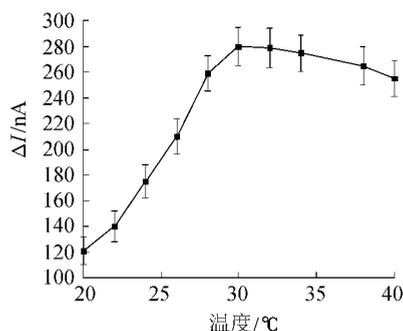


图 5 温度对传感器的影响

生活污水和工业废水中会含有多种重金属。常见的重金属离子有 Cu²⁺、Zn²⁺、Pb²⁺、Cr³⁺、Cd²⁺ 等。适量的重金属对微生物的生理影响不大, 过量的重金属对微生物会产生抑制作用, 降低微生物的生理活性, 使微生物从分解代谢为主转为内源代谢为主, 从而降低了传感器的响应电流值。笔者研究了 Cu²⁺、Zn²⁺、Pb²⁺、Cr³⁺、Cd²⁺ 这 5 种重金属离子对传感器的影响。结果表明, 在重金属浓度低于 100 mmol/L 时, 重金属对传感器响应无影响 (抑制率小于 5%)。重金属浓度大于 500 mmol/L 时, 对传感器的微生物有明显的抑制作用 (抑制率大于 15%)。5 种重金属离子的抑制率由大到小顺序为: Pb²⁺、Cd²⁺、Cu²⁺、Cr³⁺、Zn²⁺。

2.4 实际废水监测

对污染河道河水, 污水处理厂 (江心洲污水处理厂) 进水、出水及食品工业废水分别进行 BOD 传感器快速测量, 并与 BOD₅ 相对照 (表 1)。结果均表明 Fc 传感器法测得的 BOD 值 (BOD_s) 与标准的五日法测定的值具有良好的可比性。相比而言, 低浓度的河水水样和污水处理厂出水的相关度略差。可能是因为河水和污水处理厂出水中难生物降解的大分子有机物相对较多, 微生物短时间难以降解。

表 1 实际废水监测结果

水样	$\rho(\text{BOD}_5) / \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$\rho(\text{BOD}_s) / \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$\rho(\text{BOD}_s) / \rho(\text{BOD}_5)$
内秦淮河	9	10	1.11
金川河	12	14	1.16
污水处理厂进水口	190	204	1.07
污水处理厂出水口	22	26	1.18
食品厂废水	420	472	1.12

3 结论

a. 与大分子材料 SBA-15 接枝处理而得的介体

Fe-SBA-15 在保持了电化学生活性的同时,也阻止了介体从包埋材料中流失。

b. 实验得出传感器的最优化工作条件为 pH 7.2 温度 30℃。废水中常见的 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Cd^{2+} 重金属离子在 100 mmol/L 浓度下对传感器无影响。

c. 传感器的线性范围为 2 ~ 300mg/L,连续测量 20 个样品的精密为 4.2% 能连续工作 35 d,在线性范围内对低、中、高浓度实际废水测得的 BOD 值,与 BOD_5 均具有较好的相关度。

参考文献:

- [1] LIU J ,MATTIASON B. Microbial BOD sensors for wastewater analysis[J]. Water Res 2002 ,36(15) 3786-3802.
- [2] KARUBE I ,MATSUNAGA T ,MITSUDA S ,et al. A microbial electrode BOD sensors[J]. Biotechnol Bioeng ,1977 ,19(10) : 1535-1547.
- [3] 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) :437-441.
- [4] LIU J ,BJORNSSON L ,MATTIASON B. Immobilised activated sludge based biosensor for biochemical oxygen demand measurement[J]. Biosens Bioelectron ,2000 ,14(12) :883-893.
- [5] 王建龙 章一心. 生物传感器 BOD 快速测定仪的研究进展[J]. 环境科学学报 2007(7) :1066-1082.
- [6] PANG H ,KWOK N Y. CHAN P H ,et al. High-throughput determination of biochemical oxygen demand(BOD) by a microplate-based biosensor[J]. Environ Sci Technol ,2007 ,41(11) 4038-4044.
- [7] RAMSAY G ,TURNER A. Development of an electrochemical method for the rapid determination of microbial concentration and evidence for the reaction mechanism[J]. Anal Chim Acta ,

1988 215 61-69.

- [8] ERTL P ,ROBELLO E ,BATTAGLINI F ,et al. Ferricyanide reduction by escherichia coli : kinetics , mechanism , and application to the optimization of recombinant fermentations [J]. Anal Chem 2000 ,72 :4949-4956.
- [9] ERTL P ,ROBELLO E ,BATTAGLINI F ,et al. Rapid antibiotic susceptibility testing via electrochemical measurement of ferricyanide reduction by escherichia coli and clostridium sporogene[J]. Anal Chem 2000 ,72 :4957-4964.
- [10] NAKAMURA H ,SUZUK K ,ISHIKURO H ,et al. A new BOD estimation method employing a double - mediator system by ferricyanide and menadione using the eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Talanta 2007 ,72 210-216.
- [11] MORRIS K ,CATTERALL K ,ZHAO H ,et al. Ferricyanide mediated biochemical oxygen demand :development of a rapid biochemical oxygen demand assay[J]. Anal Chim Acta 2001 , 442 :129-139.
- [12] Japanese Industrial Standard Committee. Apparatus for the estimation of biochemical oxygen demand (BOD) with microbial sensor[P]. Tokyo :Japanese Standards Association , 1990.
- [13] ZHAO D Y ,FENG J ,HUO Q ,et al. Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores[J]. Science ,1998 279(5350) :548-552.
- [14] 王世辉 洪秀云 孙蕊. 二茂铁甲酸的合成[J]. 应用化工 2007 36(6) 540-541.
- [15] CHEN H ,YE T ,QIU B et al. A novel approach based on ferricyanide - mediator immobilized in an ion - exchangeable biosensing film for the determination of biochemical oxygen demand[J]. Anal Chim Acta 2008 612(1) :75-82.
- [16] SREYASHI J ,BUDDHADEB D ,RAJESH B ,et al. Anchoring of copper complex in MCM-41 matrix a high efficient catalyst for epoxidation of olefins by tert-BuOOH[J]. Langmuir 2007 , 23 2492-2496.

(收稿日期 2011-07-18 编辑 徐 娟)

· 简讯 ·

全国水资源工作会议在京召开

2012 年 5 月 7 日—8 日 ,全国水资源工作会议在北京召开。中共中央政治局委员、国务院副总理回良玉作出重要批示。全国政协原副主席、中国工程院院士钱正英 ,水利部部长陈雷 ,水利部原部长、全国人大财经委副主任委员汪恕诚 ,水利部原部长杨振怀出席会议并讲话。水利部副部长矫勇主持开幕式。水利部副部长周英、胡四一、李国英 ,水利部总工程师汪洪、总规划师周学文等出席会议。

这次会议的主要任务是 :深入贯彻中央关于加快水利改革发展的决策部署 ,全面落实国务院关于实行最严格水资源管理制度的意见精神 ,总结交流近年来水资源工作成效和经验 ,分析水资源工作形势 ,研究部署当前和今后一个时期水资源工作任务 ,在新的起点上努力开创水资源工作新局面。

珠委、太湖局、北京、天津、河北、山东等流域机构和省市代表作交流发言。会议通报表扬了一批全国水利系统水资源工作先进集体和先进个人。

各流域机构 ,各省、自治区、直辖市水利(水务)厅(局) ,各计划单列市水利(水务)局 ,新疆生产建设兵团水利局 ,部机关各司局和部直属各单位的主要负责人 ,河海大学、武汉大学、中国农业大学、天津大学、西北农林科技大学、华北水利水电学院、南昌工程学院、三峡大学等院校有关负责人参加会议。水利部机关各司局、在京部直属各单位的副司局级以上干部列席会议。

(本刊编辑部供稿)