

BOD 微生物传感检测仪中 高效微生物膜的研究

李洛娜¹ 钮玉龙² 李捷^{1*} 梁彦娟¹ 张乐¹

(1. 青岛理工大学环境与市政工程学院, 青岛 266033; 2. 江苏省吴江市环保局, 吴江 215200)

摘要 为了制备高效微生物膜,从污水中筛选菌种(QT2061),经 BIOLOG 鉴定为枯草芽孢杆菌。并以聚乙烯醇为包埋剂制作 BOD 生物传感器微生物膜,通过对国家标准样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,可连续稳定测试 10 d 以上;对国家标准溶液的测试结果准确度较高,相对误差 $\leq 5\%$;对实验中几种水样均有响应,测试结果与 5 日法的测试结果有良好的相关性(相对偏差 $\leq 5\%$)。

关键词 BOD 生物传感器 微生物膜 固定化

中图分类号 X703 文献标识码 A 文章编号 1673-9108(2009)03-0437-05

Study on efficient microbial membrane applied in BOD microbial biosensors

Li Luona¹ Niu Yulong² Li Jie¹ Liang Yanjuan¹ Zhang Le¹

(1. Institute of Environment & Municipal Engineering, Qingdao Technological University, Qingdao 266033;

2. Environmental Protection Agency of Wujiang City, Jiangsu Province, Wujiang 215200)

Abstract In order to get some efficient microbial membrane, a *Bacillus subtilis* A (QT2061) was selected from wastewater, and was identified by the MicroStation System. It was used as the sensitive material for the BOD sensor (BODS) after being immobilized by PVA. Some practical wastewater samples and national standard BOD solutions were measured with the BODS compared with the traditional 5-day method. The result showed that the response time of the BOD sensor was only 8 min, furthermore, BODS could be kept stable for up to 10 days without significant loss in their activity. BOD in standard BOD solutions were estimated using the BODS with deviation within 5%. The BODS was also omnivorous to the real samples with a generally good agreement between the BOD values estimated by the biosensor and the conventional 5-day test.

Key words BOD biosensor; microbiology; immobilization

生化需氧量(BOD)是监测水体中可生物降解的有机物含量的一个重要参数,是目前最常用的水体有机污染综合指标之一。其标准测定方法为 5 日法,以 BOD_5 表示。但该方法操作较复杂,耗时长,结果准确度及重现性差,无法满足当前环境监测中快速测定的要求。而日益得到广泛应用的微生物传感器法能够快速、准确测定水体中 BOD,并可实现在线连续测定,更加适应于现代环境监测和管理的要求^[1]。自 1977 年 Karube 等研制了第一支 BOD 传感器(BODS),各国生物传感器研究者对其进行了一系列研究和探索,研制出了各种各样的 BOD 传感器^[2~4]。快速、准确测定各种复杂水体 BOD 值是 BODS 研究的主要方向,因此要求传感器对水样中各种可生物降解的有机物具有响应,同时要与常规

BOD 测试方法具有可比性。但目前 BODS 只能用于一类或几类水体的监测,无法监测所有类型的实际水样,因此其研究的热点和核心主要集中于高效微生物膜的研制。其中优良菌种选育以及微生物固定化方法的选择成为研究的主要方向^[1,5~8]。

目前常用的菌种有:枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、皮状丝孢酵母(*Trichosporon cutaneum*)、假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)、异常汉逊氏酵母(*Hansenula* sp.)。

基金项目:国家建设部项目(05-K2-6);青岛理工大学博士基金资助项目(C2007-006)

收稿日期:2008-07-02; **修订日期:**2008-09-03

作者简介:李洛娜(1984~),女,硕士研究生,主要从事环境微生物学研究工作。E-mail:lorina84925@sina.com

* 通讯联系人, E-mail: jli1972@sohu.com

la anomala)^[9~12],大肠杆菌(*Escherichia coli*)也常被用作实验菌株^[13,14]。本课题组从水样中筛选出高效纯菌种,采用夹膜法制作固定化微生物膜,以氧电极作为换能器制成 BOD 微生物传感器,并对微生物膜的性能及其降解有机物种类的广谱性进行实验研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

(1)实验所用菌种由山东泰安污水处理厂曝气池出水水样中分离所得。经 2~3 次平板分离获得纯菌株,命名为 QT2061。将纯菌株振荡培养 20 h (35℃、140 r/min),离心得到湿菌体(4 000 r/min, 10 min),用 0.8% 生理盐水洗脱 3 次,于 4℃ 保存备用。

(2)仪器:LY-05 型 BOD 智能生物检测仪。

(3)试剂:磷酸盐缓冲溶液 0.005 mol/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 溶液,其 pH 值为 7。

标准溶液:准确称取在 103℃ 烘干 2 h 的葡萄糖(分析纯)和谷氨酸(生化试剂)各 136.4 mg,溶于 100 mL 蒸馏水中,配制成溶液,作为标准溶液,其 BOD_5 值为 $2\,000 \pm 160$ mg/L。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种鉴定

利用 BIOLOG 自动微生物分析系统(Microlog 3)对 QT2061 进行菌种鉴定,并分析该菌株对碳源的利用情况,从而可以定性地研究其代谢特征。

鉴定方法及步骤:

(1)对纯化好的菌株做革兰氏染色,确定两菌株是否革兰氏阳性。用显微镜观察革兰氏染色时菌株的形态,确定是球菌(GPC)还是杆菌(GPR)或者芽孢杆菌(GPR-SB)。

(2)根据菌株的革兰氏特性选择对应的培养基进行扩大培养,在 30℃ 下,培养 16~24 h。

(3)采用干管分散法制备菌悬液,调整浊度直至达到允许的范围。将菌悬液接种至微孔鉴定板,置于 30℃ 下培养,培养 4~6 h 进行一次读数,过夜培养后读数。

1.2.2 测定 QT2061 的生长曲线

采用活菌稀释计数法^[15]测定 QT2061 的生长曲线,确定菌体生长规律,并以此为依据确定菌株的最佳培养时间。

1.2.3 微生物膜与传感器

将适量湿菌体与添加剂(聚乙烯醇,PVA)以 1:2 配比混合,充分搅匀后夹在 2 层 GF-F 纤维膜(0.25 μm)之间,用粘合剂将 2 层膜粘合起来,制成夹膜,浸于 0.005 mol/L 磷酸盐缓冲液中(4℃)保存。

将微生物膜固定于基础电极,制成 BODs。测试时以磷酸盐缓冲溶液为空白溶液,活化 10~15 min,此时微生物处于内源呼吸阶段,由溶液扩散到氧电极的氧达到扩散平衡时,BOD 电极输出的电流初值达到稳态,切换至测试样品状态,微生物降解样品中有机物导致溶液溶解氧浓度降低,BOD 电极输出的电流随之降低,8 min 后电流差值达到稳态。在一定条件下电流差值与被测试样浓度呈线性关系,由已知标准样品求出两者之间的线性关系,可测得样品的 BOD 浓度。

1.2.4 样品 BOD 的测定

标准溶液的测定:对标准溶液进行连续重复测试,检验仪器测试结果的稳定性以及微生物膜的使用寿命。

国家标准样品的测定:采用仪器法测试不同浓度国家标准样品,验证膜法测试结果的准确性。

实际水样的测定:分别采用仪器法和 5 日法测试几种典型实际水样,分析对比 2 种方法的测试结果,验证微生物膜对不同类型水样的降解能力。

2 结果

2.1 菌种鉴定结果

2.1.1 革兰氏染色结果

对 QT2061 纯菌株进行革兰氏染色,结果如图 1 所示。图 1 显示 QT2061 菌株呈紫色,且具有明显的芽孢空腔,表明 QT2061 属于芽孢杆菌(GPR-SB),对应培养基为 BUG + M + T 琼脂平板培养基(BUG 琼脂培养基 + 0.25% 麦芽糖 + 7.66% 巯基乙酸钠)。

2.1.2 鉴定结果

图 2 和图 3 分别为 QT2061 培养 4~6 h 后和培养 16~24 h 后 GP2 微孔鉴定板的读数,进而可以分析 QT2061 对 GP2 微孔鉴定板中碳源的利用情况,对应的碳源见表 1。

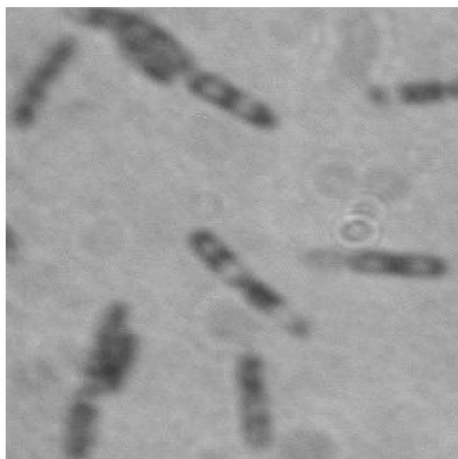


图 1 QT2061 菌株的革兰氏染色图片(呈革兰氏阳性)
Fig. 1 Result of Gram stain test (G⁺)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	41	-30	364	79	-16	5	33	30	166	34	62
B	8	-17	299	211	323	-16	9	-13	164	62	388	35
C	-15	-16	381	375	156	236	45	20	-10	-22	66	258
D	327	-18	340	257	34	-7	37	307	18	145	11	409
E	-9	334	335	-6	21	20	-14	-18	8	-16	-12	3
F	2	12	68	-9	183	100	62	-9	207	-3	40	-7
G	3	21	168	-13	122	180	-2	-10	181	-4	93	255
H	119	62	179	98	193	-11	16	-14	-3	-2	-4	117

图 2 培养 4~6 h 后 QT2061 对应的 GP2 微孔鉴定板读数
Fig. 2 Result of GN2 MicroPlate of QT2061 after a 4~6 h incubation

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	253	-6	271	87	14	-5	51	16	219	149	51
B	16	-5	347	216	609	-10	30	-15	289	83	482	3
C	26	5	430	509	294	330	112	50	-2	3	80	405
D	378	-7	402	290	56	49	69	361	30	274	1	509
E	-16	505	416	9	18	22	-3	-8	19	-17	-2	16
F	4	16	85	13	294	134	102	-28	235	32	46	19
G	24	90	169	73	127	343	-6	9	272	-14	69	269
H	118	57	204	90	246	25	71	22	26	13	7	89

图 3 培养 16~24 h 后 QT2061 对应的 GP2 微孔鉴定板读数
Fig. 3 Result of GN2 MicroPlate of QT2061 after a 16~24 h incubation

表 1 不同培养时间 QT2061 利用碳源类型
Table 1 Carbon source utilization of QT2061 at different incubation times

培养时间	碳源(按利用程度)
4~6 h	蔗糖、α-D-葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、糊精、松二糖、D-海藻糖、D-果糖等
16~24 h	D-果糖、麦芽三糖、α-甲基-D-葡萄糖苷、D-海藻糖、α-D-葡萄糖、松二糖、β-甲基-D-葡萄糖苷、L-海藻糖等

根据 QT2061 的碳源利用情况,与数据库对比后得出,QT2061 与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* A)的最终匹配度为 99%,由此可以确定 QT2061 菌株为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* A)。

2.2 QT2061 的生长曲线

微生物的生长过程大致可分为迟滞期、对数生长期、稳定期和衰亡期 4 个时期。本实验采用活菌稀释计数法测定的 QT2061 生长曲线可以明显反映出菌体 4 个生长期的变化规律。由图 4 可以看出,QT2061 在培养 0~4 h 为迟滞期,细菌数量极少;4~10 h 为对数生长期,菌体数量急剧增多;10~20 h 为稳定期,菌体生长缓慢。20 h 后细菌数量开始减少,细菌进入了衰亡期。因此,在对这种细菌进行研究时,可选用培养 20 h 的细菌,此时细菌为对数生长末期,既可保持高的细胞活力,又可获得尽可能多的细胞数^[16]。

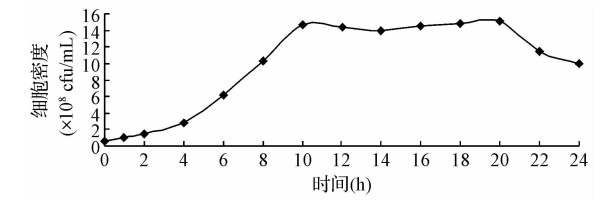


图 4 QT2061 的生长曲线
Fig. 4 Growth curve of QT2061

2.3 样品测试结果

2.3.1 BOD 标准溶液测试

为了考察 QT2061 微生物传感器的测量稳定性,用该传感器测试标准溶液,每天连续测 4~6 h,结果如图 5 所示。由图 5 可知,在连续 25 次的测试中,测试数据均在标样保证值范围内,经计算最大相对偏差为 6.2%,小于标准溶液允许的相对偏差 8%(2 000±160 mg/L),可满足 BOD 测定精度要求。

2.3.2 国家标准样品 BOD 测试

为了验证 QT2061 生物传感器测量的准确性,

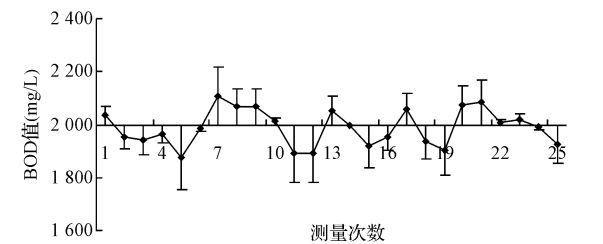


图 5 标准溶液 BOD 值的测定结果

Fig. 5 Test results of glucose-gluconic acid solution

利用该生物膜测试不同浓度的国家标准样品,将样品浓度稀释至 10 mg/L 左右,每个样品连续测试 3 次,取其平均值。测试结果见表 2。总体上,微生物传感器的测试结果均在样品保证值范围内,相对误差 $\leq 5\%$,表明该传感器测试结果具有较好的准确性。

表 2 国家标样测试结果			
Table 2 Test results of national standard samples			
项 目	仪器测定平均值 (mg/L)	保证值 (mg/L)	相对误差 (%)
标样 1	170.4	170.0	0.2
标样 2	106.8	107 $\pm$ 9	-0.2
200227	10.7	10.5 $\pm$ 2.4	2.0
200226	65	67.6 $\pm$ 5.6	-4.0
200225	144.6	148 $\pm$ 9	-2.2

注:标样 1、标样 2 分别为稀释一定倍数的国家标准试样(由青岛市环境监测总站所提供),保证值给定,具体浓度未知

2.3.3 实际水样的 BOD 测试

为了验证 QT2061 所制生物膜对不同水样的适应性,对几种典型的实际水样进行测试。由表 3 可知,仪器法测试结果较 5 日法偏低,但 2 种方法的测定结果无显著差异(相对偏差 $\leq 5\%$),这表明仪器检测值与传统 5 日法测试结果具有较好的相关性。

表 3 几种典型实际水样的测试结果			
Table 3 Test results of typical samples			
水 样	仪器测定平均值 (mg/L)	5 日法 (mg/L)	相对偏差 (%)
生活污水(青岛海泊河污水厂进水)	101.4	105.5	4.0
印染废水(处理后出水)	104.1	118.8	12.4
生活灰水(洗浴废水处理出水)	72.2	74.8	3.0
餐饮废水	401.3	419.8	5.0
化工废水(山东某农药厂曝气池出水)	253.4	264.2	4.0

2.4 QT2061 微生物膜的工作寿命

实验考察了在测试条件($T=32\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7.0$)下,QT2061 单片菌膜连续使用 10 d 的响应情况,结果如图 6 所示。由图 6 可知,经 24 h 活化后,该微生物膜对 10 mg/L 标准溶液的电流响应达到稳定,相对标准偏差在 4% 左右。由于微生物细胞代谢活动导致微生物膜组成发生变化,响应电流值随时间的变化有所降低,但整个测试过程响应电流值依然保持较高水平($>100\text{ nA/s}$)。这表明生物膜内微生物没有发生泄漏且活性保持较好。将 QT2061 微生物膜浸入磷酸盐缓冲溶液中,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,6 个月后上机测试仍保持比较好的响应活性(图 6),说明该微生物膜具有较长的使用寿命。

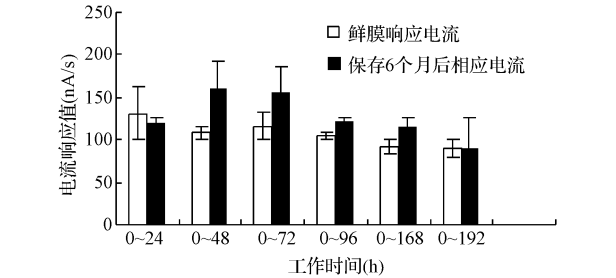


图 6 BODs 在测试标准溶液(BOD 值为 10 mg/L)时电流响应的稳定性

Fig. 6 Operational stability of the sensor response for a diluted standard solution

3 讨论与结论

本研究从污水中筛选出性能优良的纯种枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* A)为传感器生物识别元件,采用夹层膜法制备微生物传感器,对其固定化微生物膜的性能进行了实验。结果表明,采用该微生物传感器测试国家标准溶液及几种典型实际水样的 BOD 值,测试结果具有较好准确性及可重复性,且与 5 日法的测试结果具有良好的相关性,但对同一水样仪器法较 5 日法的测试结果偏低,这是由于 5 日法可以测定水样中大部分可生物降解的有机化合物,而仪器法仅能快速测定水样中易降解的部分有机化合物^[17],此外,仪器法对印染废水测试结果偏差仍较大,其原因可能在于印染废水中含有较多有毒重金属离子,对微生物膜产生一定的毒害作用。针对这一问题,可在测试水样前进行预处理,降低水样中重金属离子浓度,以降低对传感器中微生物膜的毒害作用或针对某一特定水质对微生物进行驯

化^[7]。本实验采用夹膜法固定微生物,不仅解决了微生物流失问题,还能保持微生物固有的活性,是比较可行的固定化方法,但由于现有的微生物固定化方法还不能实现自动化,使膜与膜间微生物的固定状况差别较大,仍存在测试性能不稳定等问题,因此还将进一步研究更加完善的微生物固定化方法。

参考文献

- [1] 李洛娜,周颖,蔡琦,等. BOD 微生物传感器检测仪 (BODs)研究进展. 净水技术,2007,26(6):54~56
- [2] 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. 环境污染治理技术与设备,2005,6(3):91~94
- [3] Shikha Rastogi, Pratima Rathee, Saxena T. K., *et al.* BOD analysis of industrial effluents: 5 days to 5 min. Current Applied Physics,2003,(3):191~194
- [4] Moon H., Chang I. S., Kang K. H., *et al.* Improving the dynamic response of a mediator-less microbial fuel cell as a biochemical oxygen demand (BOD) sensor. Biotechnol Lett,2004,26:1717~1721
- [5] Hideaki Nakamura, Yuta Abe, Yuta Abe, *et al.* A chemiluminescence biochemical oxygen demand measuring method. Analytica Chimica Acta, 2007,602:94~100
- [6] Changrekar M. M., Shinde V. B. Performance of membrane-less microbial fuel cell treating wastewater and effect of electrode distance and area on electricity production. Bioresource Technology, 2007,98:2879~2885
- [7] Pasco N., Baronian K., Jeffries C., *et al.* Biochemical mediator demand: A novel rapid alternative for measuring biochemical oxygen demand. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2000,53:613~618
- [8] 宋立岩,孙勇,赵由才,等. BOD 生物传感器在水质监测中的应用研究. 工业水处理,2005,25(11):47~49
- [9] Tan T. C., Qian Z. R. Dead *Bacillus subtilis* cells for sensing biochemical oxygen demand of waters and wastewaters. Sensors Actuators B,1997,40(1):65~70
- [10] Yang Z., Sasaki S., Karube I. Fabrication of oxygen electrode arrays and their incorporation into sensors for measuring biochemical oxygen demand. Analytica Chimica Acta,1997,357(1~2):41~49
- [11] 张先恩,王志通,简浩然. BOD 微生物传感器的研究. 环境科学通报,1986,6(2):64~72
- [12] 张平奇,安立超,曾桁. 生物传感技术用于 BOD 的快速测定. 环境监测管理与技术,1995,7(1):34~36
- [13] 蒋永荣,李莉,王艳. 大肠杆菌生化需氧量传感器微生物膜性能研究. 桂林电子工业学院学报,2005,25(6):57~60
- [14] 李花子,施汉昌,王建龙,等. 大肠杆菌 BOD 微生物传感器的研究. 高技术通讯,2002,12(7):93~96
- [15] 陶令霞,夏铁骑,常慧萍. 两种测定固氮菌 NT06 菌株生长曲线方法的比较. 生物学杂志,2007,24(5):57~58
- [16] 秦艳,李卫芬,黄琴. 枯草芽孢杆菌发酵条件的优化. 饲料研究,2007,(12):70~74
- [17] Jing Liu, Gustaf Olsson, Bo Mattiasson. Short-term BOD (BOD_{st}) as a parameter for on-line monitoring of biological treatment process Part I. A novel design of BOD biosensor for easy renewal of bio-receptor. Biosensors and Bioelectronics,2004,20:562~570