

快速测定 BOD 的微生物传感器

刘月英 杨淑专 郑忠辉 李江平* 黄克服

(厦门大学生物学系)

摘要 异常汉逊氏酵母菌 (*Hansenula anomala* var. *schneggil*) 细胞经海藻胶固定, 与氧电极组装成 BOD 传感器。采用恒容动态法, 可在 5 分钟内完成一个样品 BOD 的测定。用于某些污水测定时, 与 BOD₅ 法有较好的相关性。传感器可使用 90 天和测定 650 次以上。

关键词 微生物传感器; BOD 测定

BOD 是水质评价中最重要的指标之一。传统的 BOD₅ 测定, 样品需在 20℃ 培养 5 天, 不能及时提供水质评价的信息, 因此近年来各种快速测定 BOD 的方法应运而生, 其中根据微生物呼吸代谢水中有机物而消耗溶解氧的原理, 与氧电极结合测定 BOD 的微生物传感器法, 具有快速、简便诸优点。

本文报道用一株氧化活性强的异常汉逊氏酵母菌作为工作菌, 在传感器的制作和测定方法上不同于国内外已报道的方法^[1-3], 建立了一种更加快速、简便, 有希望成为污水 BOD 监测的方法。

材料与方 法

1. 菌种: 异常汉逊氏酵母菌 (*Hansenula anomala* var. *schneggil*), 本实验室从污水中分离筛选获得。

2. 菌体的培养与制备

培养基: (1) 液体培养基: 葡萄糖 2%, 谷氨酸 1%, 酵母膏 0.5%, 无机盐溶液 (与稀释水^[4]的组成相同) 0.1% (V/V), pH5.5。(2) 斜面菌种培养基: 在液体培养基中加入琼脂 2%。

菌体接入培养液中, 在 30℃ 摇瓶培养 20 小时, 离心收集菌体并用 0.2% KCl 洗涤, 菌体置冰箱保存备用。

3. 菌体固定化与 BOD 传感器的组装: BOD 传感器由固定化菌膜和氧电极组成。实验采用海藻胶固定化夹层法, 即将湿菌体与 4% 海藻酸钠溶液按 1:3 (W/V) 混匀, 加 1 滴混合液 (含干菌体约 0.2mg) 在 CY-2 型测氧仪氧电极膜上, 覆盖上一片透析膜, 并用橡皮圈固定, 剪去四周多余的部分, 然后浸入 4% 的 CaCl₂ 溶液中, 室温下放置 1—2 小时, 使含菌体的海藻胶凝固, 则成 BOD 传感器。取出用蒸馏水漂洗后即可使用。用该法组装的传感器, 菌体经海藻胶固定成菌膜, 且覆盖有透析膜, 因此菌体不易从透析膜的四周泄漏, 又可用于测定含有 PO₄³⁻、Na⁺、K⁺ 等离子的污水, 因而优于用吸附固定化方法^[2]和海藻胶固定化尼龙细绢加固法^[3]固定菌体组装成的传感器。

4. 检测系统的组装: 如图 1。

5. BOD 的测定

(1) 标准溶液: 含有等量葡萄糖和谷氨酸的混合液, 浓度为 150mg/L (每升含葡萄糖和谷氨酸各为 150mg) 时, BOD₅ 值为 220mg/L^[2]。

(2) BOD₅ 的测定: 采用常规的 BOD₅ 测定法^[4]。

* 本系微生物学专业毕业生。

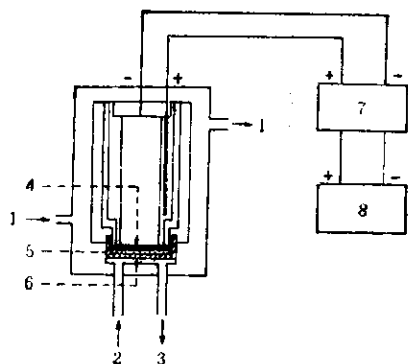


图1 BOD 传感器和检测系统示意图

1. 恒温水; 2. 进样管; 3. 出样管; 4. 氧电极膜; 5. 固定化菌膜; 6. 透折膜 7. 测氧仪; 8. 记录仪

(3) BOD 传感器测定法: 采用恒容动态法。测定时从进样管注入 2—3ml 样品液, 读取记录的响应直线部分的斜率, 定为响应强度 (mV/min); 以 0.005M、pH7.5 磷酸缓冲液为空白溶液, 由进样管注入, 使记录仪的指针恢复到 5mV 处。记录仪上的 0 和 5mV 分别表示测定液氧的含量为 0 和 100%。

结果与讨论

1. BOD 传感器的响应性: 在 30℃、pH 7.5 条件下, 检测传感器对不同浓度标准溶液的响应性。图 2 为 BOD 传感器较典型的响应曲线。测定液中不含有机物时, 传感器输出减少的毫伏值代表细胞内源呼吸水平。当测定液为标准溶液时, 细胞迅速转为外源呼吸, 由于氧的消耗, 使测定液中的溶解氧分压下降, 导致氧电

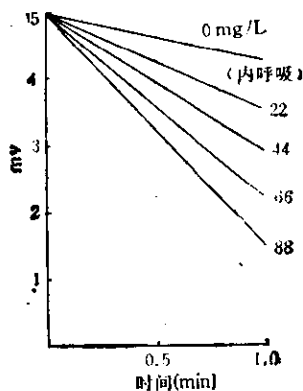


图2 传感器对不同浓度标准溶液的响应曲线

极输出的电流相应下降。传感器的响应时间为 1—2 分钟, 洗涤恢复需要 1—3 分钟, 因此能在 5 分钟内完成一个样品的测定。在标准溶液 BOD₅ 为 90mg/L 以下时, 传感器的响应强度与标准溶液的 BOD₅ 成线性关系 (如图 3 所示), 因此有可能利用这种关系测定污水的 BOD₅。

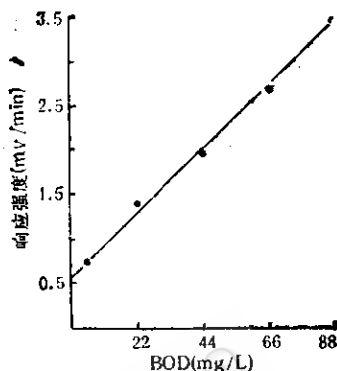


图3 传感器的响应强度与标准溶液 BOD 的关系

2. pH 的影响: 采用 0.005M 磷酸缓冲液系统, 检测传感器在不同 pH 值时对标准溶液 (BOD 为 44mg/L) 的响应性。结果 (图 4) 表明, 传感器的最适 pH 为 7.5, 因此其他试验均采用 pH7.5。

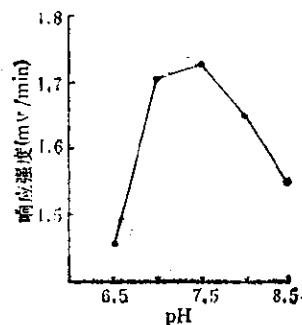


图4 pH 值对传感器响应强度的影响

3. 温度的影响: 实验在 22—34℃ 下检测传感器对标准溶液 (BOD₅ 为 29mg/L) 的响应性, 结果 (图 5) 表明, 在 32℃ 传感器的响应强度最大, 超过 32℃, 响应强度明显下降, 传感器呈现酶的热力学特性。在 22—32℃ 的温度范围内, 温度系数 $Q_{10} = 0.87$, 即温度每改变 $\pm 1^\circ\text{C}$, 响应强度相应改变 $\pm 8.7\%$, 因此测定应在恒温

下进行。

为了了解温度对传感器稳定性的影响，实验将传感器在 28、30 和 32℃ 下进行保温处理，并在其处理温度下，测定传感器对标准溶液 (BOD₅ 为 29mg/L) 的响应性，结果 (图 6) 表明，虽然传感器在 32℃ 响应强度最大，但在此温度下，传感器的响应强度将随着测定时间的延长而逐渐降低；在 28 和 30℃，传感器的响应强度虽然都不及 32℃，但是在这两种温度下，传感器的响应性较稳定。30℃ 下的响应强度比 28℃ 高，因此试验采用 30℃。

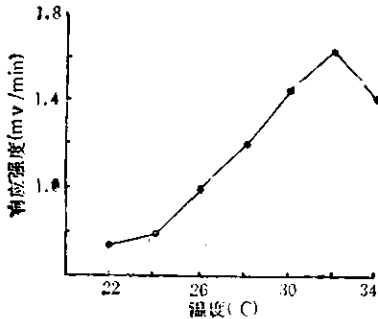


图 5 温度对传感器响应强度的影响

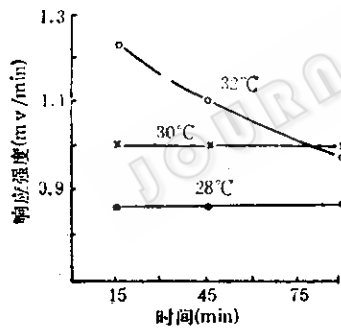


图 6 不同温度下传感器的响应强度与稳定性

4. 无机盐的影响：研究了几种无机盐对传感器响应性的影响，结果表明，在 0.005 M、pH 7.5 磷酸缓冲液中，Fe²⁺ (Fe₂SO₄)、Mn²⁺ (MnSO₄)、Zn²⁺ (ZnSO₄)、Cu²⁺ (CuSO₄)、Co²⁺ (CoCl₂) 等离子浓度低于 50mg/L，对传感器的响应性均无明显的影响；Hg²⁺ (HgCl₂) 在 20mg/L 浓度，响应性被抑制 20%，50mg/L，抑制 30%；NaCl 浓度低于 6‰，传感器的响应性不受影响，高于 6‰则受到抑制，8‰抑制 25%；(NH₄)₂SO₄ 浓度 5—7‰对传感器的响应性有促

表 1 传感器法与 BOD₅ 法测定结果比较

有机化合物	BOD(g/g)	
	传感器法	BOD ₅ 法
葡萄糖	0.92	0.30—0.60
半乳糖	0.66	0.21—0.67
乳糖	0.00	0.40—0.63
木糖	0.15	—
蔗糖	0.34	0.28—0.44
麦芽糖	0.36	0.20—0.62
可溶性淀粉	0.00	0.51
谷氨酸	0.55	0.52—0.64
甘氨酸	1.15	0.53—1.03
甲醇	0.26	0.85—0.91
乙醇	0.41	1.07—1.18
甘露醇	0.55	0.68
苯酚	1.45	0.93—1.16
对苯二酚	0.88	0.48
邻苯二酚	0.73	0.49—1.20
柠檬酸钠	0.30	0.23—0.61
水杨酸钠	0.60	0.97
乙酸钠	0.66	0.63—1.23
苯甲酸钠	0.00	1.25
十二烷基磺酸钠	0.136	1.20

进作用，7‰传感器的响应强度提高 18%。鉴于某些无机盐离子在一定的浓度下对传感器响应性的影响，因此，必要时应对测定结果进行校正。

5. 传感器对各种有机物的响应性：实验用传感器测定多种纯有机物的 BOD 值，并与报道的 BOD₅ 值^[1]比较，结果 (表 1) 表明：(1) 用传感器测定，葡萄糖和谷氨酸的 BOD 平均值为 0.73，而其等量混合液的 BOD₅ 也为 0.73，因此该传感器以等量的葡萄糖和谷氨酸混合液作为标准溶液是适宜的；(2) 在所试的 20 种有机物中，有 9 种 (包括糖类、醇类和酸类) 用传感器测定的 BOD 值与 BOD₅ 值具有可比性，即该传感器具有较广的测定范围；(3) 传感器对苯酚、对苯二酚等酚类化合物响应性强，而对乳糖、木糖、淀粉、水杨酸、苯甲酸和十二烷基磺酸钠等化合物的响应性差，因此用该传感器测定含有上述有机物的污水 BOD，结果必将与 BOD₅ 有较大差异。据报道^[6]用 BOD₅ 法测定纯净有机物的 BOD，其可信度大于 70% 的占少数，多数在 70% 以下，甚至低于 50%。因此

用这二种不同的方法,测定结果出现差异是必然的。

6. 传感器的重现性与寿命: 实验在 30℃、pH7.5 条件下,以标准溶液 (BOD 为 44mg/L) 为测液,连续测定 20 次,结果表明,20 次的平均响应强度为 1.00mV/min,相对误差为 +5.25% 和 -6.23%,标准差为 0.03mV/min,变异系数 ($S/\bar{X} \cdot 100$) 为 3.3%。因此所试的 BOD 传感器可以满足 BOD 分析精度要求。

在检测间歇将传感器浸入每升含有 CaCl₂ 100mg、葡萄糖和谷氨酸各 6mg 的溶液中,室温(25℃左右)保存,每天以标准溶液 (BOD 为 29mg/L) 为测定液,平均测定 40 次,可稳定 8 天,共测定 320 次,日间相对误差为 +4.37% 和 -6.52%,标准差为 0.03mV/min,变异系数为 3.26%;在检测间歇将传感器浸入含有 CaCl₂ 0.1%, KCl 0.2% 的溶液中,4℃ 保存,每天以标准溶液或(和)纯有机物、污水为测定液,或者在不连续使用的情况下,将传感器置于标准溶液 (BOD 为 44mg/L) 或液体培养基中 2 小时左右,以维持菌体的活性,那么传感器可使用 90 天、共测定 650 次以上。

7. 应用试验: 传感器应用于几种污水和发酵废液的测定,并与传统的 BOD₅ 法测定结果进行比较,结果(表 2)表明,传感器用于测定含糖物质的废液、废水,如酒精蒸馏废液,酒厂、罐头厂的废水和一般污水的 BOD,与 BOD₅ 法有较好的相关性;用于测定含有蛋白质,淀粉等大分子有机物的废水,如豆腐黄浆水, BOD 值较低,因为这些大分子化合物不能透过透析膜,不能被酵母菌氧化;当测定含酚量较高的污水,由于用于组装传感器的酵母菌对酚及其衍生物有较强的氧化性,因此传感器法的 BOD 值则较

高。这一结果与传感器对单纯有机化合物的响应性试验结果一致。

综上所述,试验菌异常汉逊氏酵母菌经海藻酸钙凝胶包埋,与氧电极结合组装而成的 BOD 微生物传感器,具有制作容易、测定快速、操作简便、重现性较好和寿命长等优点。传感器用于有机废水 BOD 的测定,其测定范围宽 (5—90mg/L),并且与 BOD₅ 法有一定相关性。因此可望成为代替 BOD₅ 测定的方法。

表 2 传感器法与 BOD₅ 法测定结果比较

样 品	BOD (mg/L)		差异 (%)
	传感器法	BOD ₅ 法	
酒精蒸馏废液 I	41060	41500	1.06
酒精蒸馏废液 II	39600	40200	1.49
酒厂废水	7039	6993	0.66
罐头厂废水	1217	1076	13.10
罐头厂污水	342	368	7.07
豆腐黄浆水	2698	7274	62.91
港口污水 I	20	11	82.82
港口污水 II	42	75	44.00
医院污水	30	31	3.23
池塘水 I	6	7	14.29
池塘水 II	33	36	8.33
生活污水 I	6	6	0
生活污水 II	40	40	0

参 考 文 献

- [1] Karube. I. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **19**: 1535, 1977.
- [2] Hikuma. M. et al.: *European J. Appl. Microbial. Biotechnol.*, **8**: 289, 1979.
- [3] 张先恩等: 环境科学学报, **6**(2): 184—192, 1986.
- [4] 中国医学科学院卫生研究所编著: 水质分析法, 人民卫生出版社, 北京, p.160, 256, 1973.
- [5] 黄克服等: 厦门大学学报(自然版), **25**(6): 601—604, 1986.
- [6] 孙玉修: 环境科学丛刊, **5**(10): 18—23, 1984.