

## 固定化微生物在生物膜式生化需氧量传感器中的应用现状

何利\* 赵磊 徐丹洁 李思敏

(四川农业大学食品学院 四川 雅安 625000)

**摘要:** 生化需氧量(Biochemical oxygen demand, BOD)微生物传感器是一种快速检测水样中有机污染物含量的设备,固定化微生物是其核心部件之一,对其稳定性、响应时间、使用寿命及实际应用范围等性能有着重要影响。生物膜式 BOD 传感器较其他类型的 BOD 微生物传感器具有结构简单、灵敏度高、响应时间短等优点,受到广泛的研究和应用。本文主要针对固定化微生物在生物膜式 BOD 传感器中的应用情况,概述较典型的微生物固定化方式的原理、特点及应用;总结几类应用较多或具有较好前景的载体材料,并讨论载体特性与传感器性能之间的关系;综述微生物在该领域的应用现状;简要介绍生物膜式 BOD 传感器的实际应用及商业化现状,比较其与另外几种 BOD 微生物传感器的优缺点;分析生物膜式 BOD 传感器中固定化微生物现存的一些问题及其发展趋势。

**关键词:** 固定化微生物, 载体材料, 生化需氧量, 生物传感器, 生物膜, 研究进展

## The application of immobilized microbes in biofilm-type biochemical oxygen demand sensor: a review

HE Li\* ZHAO Lei XU Dan-Jie LI Si-Min

(College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625000, China)

**Abstract:** Microbial biochemical oxygen demand (BOD) sensor is a kind of equipment for rapid detection of organic pollutants in water samples. The immobilized microorganisms is the heart of a microbial BOD sensor, which has great influence on the performances of the sensor like stability, response time, service life, linear response range as well as the practical apply range. Biofilm-type BOD sensors were widely studied and applied for their advantages such as simple structure, high sensitivity and short response time compared with other types of microbial BOD sensors. This article provides an overview on the application of immobilized microbes in biofilm-type BOD sensors. The principles, properties and applications of typical immobilization methods were summarized. Particularly, a range of frequently-used and potential immobilizing carriers were detailed. The relationships between characteristics of the carriers and the performances of sensors were analyzed, the

**Foundation item:** Youth Fund Project of Sichuan Provincial Department of Education (No. 13ZB0283); The “Double Support” Project of The National “211” Project for Sichuan Agricultural University (No. 03570208)

\*Corresponding author: Tel: 86-835-2882187; E-mail: helifood@163.com

**Received:** July 23, 2015; **Accepted:** October 22, 2015; **Published online** (www.cnki.net): December 01, 2015

**基金项目:** 四川省教育厅青年基金项目(No. 13ZB0283); 国家 211 工程建设四川农业大学“双支”计划项目(No. 03570208)

\*通讯作者: Tel: 86-835-2882187; E-mail: helifood@163.com

**收稿日期:** 2015-07-23; **接受日期:** 2015-10-22; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2015-12-01

microorganisms applied in this field were reviewed. Furthermore, the application and commercialization of biofilm-type BOD sensors were introduced, the pros and cons of various types microbial BOD sensors were compared. Finally, unsolved problems of immobilized microbes in biofilm-type BOD sensors and its trend of development were discussed.

**Keywords:** Immobilized microbes, Immobilization materials, BOD, Biosensor, Biofilm, Review

生化需氧量(Biochemical oxygen demand, BOD)是衡量水体被有机物污染程度的重要指标。传统的BOD测定方法为5 d(瑞典等国为7 d)生化需氧量接种稀释法(BOD<sub>5</sub>法),该法将样品置密封容器内于20±1 °C暗处培养5 d,测定培养前后样品中溶解氧的差值,以此得出样品的BOD值<sup>[1]</sup>。这种方法实用范围广,且所用设备简单,但该方法却存在耗时费力、操作繁琐、重现性差及不宜在线监测等不足。因此出现了很多方法以改进或代替BOD<sub>5</sub>法<sup>[2-3]</sup>,其中BOD微生物传感器法因其耗时短、操作简便、重现性高、可用于在线监测等优点而备受关注。BOD微生物传感器主要由固定化微生物和信号转换装置组成。固定化微生物的性能对传感器的稳定性、使用寿命、响应时间、线性响应范围及实际应用范围等性能有着重要影响。因此,可通过改进制备固定化微生物的方法和材料以改善BOD微生物传感器的性能。同时,不同种类的微生物具有不同的生物学特性,应用于BOD微生物传感器后其使用条件、响应特性及实际应用范围等也各有差异,需根据所测水样类别选择恰当的微生物作为传感器识别元件。

BOD微生物传感器因其装置结构及工作原理

的不同可分为生物膜式、反应器式、电极型、燃料电池型等类型<sup>[2-8]</sup>。其中生物膜式BOD传感器较其他类型的BOD微生物传感器具有结构简单、灵敏度高、响应时间短等优点,受到的研究和应用也最为广泛<sup>[2-6]</sup>。目前已有许多文献<sup>[2-8]</sup>对各类型BOD微生物传感器的结构组成、换能器类型、测定条件及其商业化应用等做了总结,但尚无针对固定化微生物在生物膜式BOD传感器中应用现状的专门报道。

本文主要针对生物膜式BOD传感器,概述较典型的微生物固定化方式的原理、特点及应用;总结几类应用较多或具有较好前景的载体材料,并讨论其特性与传感器性能之间的关系;综述微生物在生物膜式BOD传感器中的应用现状;简要介绍生物膜式BOD传感器的实际应用及商业化现状,比较其与另外几种BOD微生物传感器的优缺点;分析生物膜式BOD传感器中固定化微生物现存的一些问题及其发展趋势。

## 1 生物膜式BOD传感器简介

生物膜式BOD传感器主要由微生物膜和信号转换装置组成(图1),微生物膜通常是以特定材料固定微生物后制备成膜状并紧贴于信号转换装置

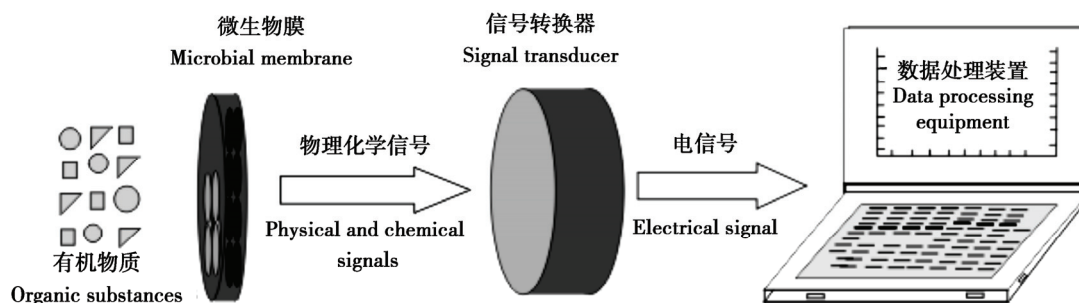


图1 生物膜式BOD传感器结构示意图

Figure 1 The schematic diagram of the structure of biofilm type BOD sensor

上<sup>[2-5]</sup>。当含有机物质的水样经过微生物膜时,其上固定的微生物开始分解有机物并产生代谢产物,同时膜内的溶解氧、质子浓度或光强度等信号发生改变,这些变量被信号转换装置识别并最终转换为电流、电压、光吸收度等信号,该信号强度通常与有机物浓度成线性关系,由此实现对水样 BOD 值的检测<sup>[2-6]</sup>。

## 2 固定化方法与材料

在生物膜式 BOD 传感器中,微生物固定化方法和载体材料的选择对微生物膜的性能有着极为重要的影响。载体材料除了能够以特定的方式将微生物固定外,对其性能通常还有以下要求:(1) 良好的生物相容性,即对微生物正常生命代谢没有影响或影响很小;(2) 物理稳定性,具有足够的机械强度;(3) 良好的耐生物降解性及化学稳定性;(4) 足够的微生物容量;(5) 扩散阻力小、传质性能好,水、气体、有机物质、微生物代谢产物等能够通过由其构成的微生物膜;(6) 廉价易得。

### 2.1 固定化方法

应用于生物膜式 BOD 传感器的微生物固定化方法按其固定原理可分为化学法和物理法,化学法

包括共价结合法和交联法;物理法包括夹层法、吸附法和包埋法<sup>[2,9-10]</sup>。各方法对微生物的固定方式如图 2 所示。

共价结合法多应用于酶、抗体等的固定化,用于微生物细胞固定时,该法主要是通过微生物细胞壁上的 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{OH}$  等功能基团和载体之间形成稳定共价键将微生物固定于载体上<sup>[9-11]</sup>;交联法通常是以特定的交联剂将微生物细胞壁上的功能基团结合起来使其形成网状结构;夹层法直接置菌体于两层半透膜之间,将膜的边缘用特定的粘合剂或压力封住使不漏菌;吸附法是利用载体与微生物细胞间简单的物理吸附进行固定,主要通过氢键、极性键、疏水力或 $\pi$ 电子的相互作用将微生物吸附在载体表面或多孔膜中;包埋法是指将微生物包裹于高分子聚合物形成的三维空间中。各种微生物固定化方法特点各异,其常用材料、各自特点及应用情况见表 1;各材料所成生物膜式 BOD 传感器及其性能见表 2。

### 2.2 载体材料

应用于生物膜式 BOD 传感器的微生物固定化载体按其来源可分为天然材料和人工合成材料。天

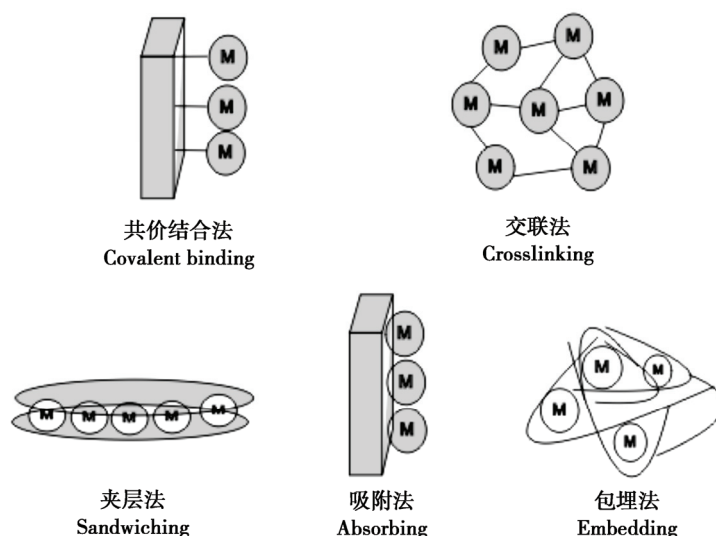


图 2 各微生物固定方法示意图

Figure 2 The schematic diagram of methods to immobilizing microbes

Note: M: Microbes.

表 1 各微生物固定化方法的特点  
Table 1 The features of microbial immobilization methods

固定化方法 Immobilization methods	常用载体材料 Frequently used materials	固定化难易度 Immobilizing complexity	生物毒性 Biototoxicity	稳定性 Stability	微生物固定量 Amounts of immobilized microbes	应用 Application
共价结合法 Covalent binding	甲壳质; 氨基酸共聚物; 甲基丙烯醇共聚物等 <sup>[9-10]</sup>	简单	极大	很差	少	极少
交联法 Crosslinking	活性交联树脂 <sup>[12]</sup> ; 戊二醛 <sup>[13]</sup> ; 氰尿酸氯; 鸡蛋清; 明胶等 <sup>[9-11]</sup>	简单	小	较好	中等	多
夹层法 Sandwiching	透析膜(Dialysis membrane) <sup>[14]</sup> ; 聚四氟乙烯膜; 醋酸纤维膜; 氟化乙烯丙烯膜(FEP)等 <sup>[2-3,15]</sup>	简单	无	较差	可控性好	多
吸附法 Absorbing	尼龙膜 <sup>[16]</sup> ; 硝酸纤维膜 <sup>[17]</sup> ; 玻璃纤维膜 <sup>[18]</sup> ; ZICF <sup>[19]</sup> ; 聚碳酸脂膜; 聚四氟乙烯 <sup>[2-3]</sup>	中等/复杂	极小	差	中等; 少	较多
包埋法 Embedding	琼脂糖 <sup>[20]</sup> ; 溶胶凝胶(Sol-gel) <sup>[21]</sup> ; 聚氨基甲酸酯磺酸盐(PCS) <sup>[22]</sup> ; 海藻酸钙 <sup>[23]</sup> ; 聚乙烯醇; 聚乙烯吡啶; 海藻酸钠; 角叉菜聚糖凝胶; 硅胶; 聚丙烯酰胺; 聚氨酯等 <sup>[2-7]</sup>	简单到复杂	极小/无	较好	可控性好	最多

然材料(琼脂糖<sup>[20]</sup>、海藻酸钙<sup>[23]</sup>、海藻酸钠、明胶、角叉菜胶等<sup>[2-7]</sup>)多具有良好的生物相容性,但常表现为机械性能不足及较差的耐生物降解性;人工合成材料(PCS<sup>[22]</sup>、硝酸纤维素<sup>[17]</sup>、玻璃纤维<sup>[18]</sup>、戊二醛、聚乙烯醇、聚碳酸脂、合成树脂等<sup>[2-7]</sup>)常具有较强的机械性能及耐生物降解性,但这类材料却表现出不同程度的生物毒性<sup>[37-38]</sup>。天然材料和人工合成材料混合后的载体材料往往能够保持天然材料良好的生物相容性,同时又具备人工合成材料较强的机械性能、耐生物降解性及物理化学稳定性等优点<sup>[38]</sup>。根据已有文献报道<sup>[2-8]</sup>,有几类载体材料在生物膜式 BOD 传感器的研究中应用较为广泛,另有一部分具有良好的应用前景,下面主要从天然材料和人工合成材料两方面介绍所涉固定化载体。

**2.2.1 天然材料:** (1) 海藻酸盐复合材料: 海藻酸是一种来源于绿藻纲、蓝藻纲、红藻纲、褐藻纲等海洋植物的天然多糖,也可从固氮菌和假单胞菌中

提取获得,这种材料因其良好生物相容性、多孔结构及固定化过程简单等优点常被应用于生物活性材料的固定化<sup>[39]</sup>。在 BOD 微生物传感器中应用较多的海藻酸盐有海藻酸钠、海藻酸钙等<sup>[35,40-42]</sup>。由于海藻酸钙机械性能不足,制备成膜后较易损坏并表现出一定程度的漏菌,研究者们常用海藻酸钙包埋微生物后制备成颗粒状而应用于反应器式 BOD 微生物传感器<sup>[23,40-42]</sup>。这种情况下,微生物几乎不会泄露,且可实现高浓度微生物的固定化,该材料也不易发生溶胀<sup>[41]</sup>。也有部分研究将海藻酸盐及其复合材料应用于生物膜式 BOD 传感器<sup>[35-36,40]</sup>,如 Hussin 等<sup>[36]</sup>分别以海藻酸钙、戊二醛交联海藻酸钙、聚乙烯醇海藻酸钠复合物作为微生物固定化载体制备生物膜式 BOD 传感器,结果表明戊二醛交联海藻酸钙可在很大程度上避免微生物的泄漏,且较另外两种材料制备的传感器具有更高的灵敏度和更短的响应时间。

表 2 各生物膜式 BOD 传感器中的固定化微生物及其性能  
Table 2 Immobilized microbes in biofilm-type BOD sensor and their characteristics

固定化载体 Immobilization support	微生物种类 Microorganisms	响应/回复平衡时间 Response/Recovery time (min)	线性响应范围/检测限 Linear response range/Detection limit (mg/L)	重现性 Reproducibility (%)	使用寿命 Service life (d)	使用条件(温度/pH/盐浓度/重 金属等) Working conditions (Temprature/pH/Salinity/heavy metals)	实际应用 Practical application	参考文献 References
尼龙网 Nylon net	Synergistic microbial consortium	10-15/15-16	<45/-	1.85-2.25	>400	37 °C/pH 6.8	饮料厂	[16]
多孔尼龙膜 Porous nylon membrane	含 <i>E. cloaca</i> ; <i>C. amalonaticus</i> ; <i>P. aeruginosa</i> ; <i>E. sakazaki</i> ; <i>Y. enterocolitica</i> ; <i>K. oxytoca</i> ; <i>Serratia liquefaciens</i> <i>Candida</i>	5-7/-	<60/1.0	<±5	180 (200 次)	35±2 °C/pH 6.8/50 mmol/L PBS	食品厂、制革 厂、纸浆厂、 纸厂	[24]
透析膜 Dialysis membrane	Activated sludge	<5/-	FeCN 为介质, 0-100; HMF 为介质, 10-300/2	10.2	20	30 °C/pH 6.0/100 mmol/L PBS	纸厂废水	[25]
透析膜 Dialysis membrane		0.4/4-8	3.5-40/-	同传感器<5.6; 异传感器<15	几小时	32 °C/pH 7.0	食品加工厂、 或可应用于 在线检测	[14]
硝酸纤维素膜 Hirate cellulose membrane	<i>P. putida</i>	5/-	-/0.2	-(RSD, 2.01)	-	30 °C/pH 7.0	河水	[17]
金属铝改性胶原纤维 ZICF	<i>S. cerevisiae</i>	2-9/-	2-200/10-30	4.1	>42	29 °C/pH 6.0/<60 mmol/L NaCl	河水、城市生 活污水	[19]
玻璃纤维滤纸 Glass-fiber filter	<i>C. maltosa</i> ; <i>C. blankii</i> ; <i>D. hansenii</i>	8-20; 10-22; 10-17/-	9.3-422 ; 3.0-56 ; 2.0-177/0.3	-(RSD3; 5; 4)	>30; 8; >30	pH 6.5/pH 6.8/pH 7.0	废水处理厂、 葡萄糖浆厂	[18]
紫外交联树脂 Ultraviolet crosslinking resin	<i>T. cutaneum</i>	7-20/-	0-18/0.2	<8	3	20±0.2 °C	食品厂、家庭 废水(处理和 未处理)	[12]
(待续)								



(续表)									
戊二醛处理胶原纤维	Activated sludge	10-15/15	0-20/-	7.5	10	30 °C/pH 7.0-8.0/0.1 mol/L PBS/Hg <sup>2+</sup> 、Cd <sup>2+</sup> 、Fe <sup>2+</sup> 、Fe <sup>3+</sup> 、Pb <sup>2+</sup> 无影响; Cu <sup>2+</sup> 有一定促进作用(浓度未知)	酒厂、食品加工厂、屠宰场废水	[13]	
Glutarsidehyde treated collagen fiber									
聚碳酸酯	Dead <i>B. subtilis</i>	25/30	0-80/0.028	2.4-3.4	140 (400 次)	25 °C-pH 7.2/0.31 mmol/L PBS	污水厂、食品废水、拟合废水	[26]	
Polycarbonate									
聚碳酸酯	<i>T. cutaneum</i> ; <i>B. licheniformis</i>	5/5-10	40; 0.5	3.62	连续 58 次	25 °C/pH 6.8	-	[27]	
Polycarbonate									
聚碳酸酯	<i>B. subtilis</i> ; <i>B. licheniformis</i>	0.25-0.5/4-5	0-80/-	-	2 个月 (200 次)	30 °C/0.1 mmol/L PBS	各单纯有机物; 医药、食品厂; 家庭废水; 发酵液、有机物混合液	[28]	
Polycarbonate									
琼脂糖	<i>A. hydrophila</i> ; <i>P. fluorescens</i>	10-20/-	0-45; 0-40/0.019; 0.023	3.2-6.9; 2.9-7.7	110; 115	22±2 °C	肉渗滤液、肉制品加工废水	[20]	
Agarose									
聚(氨基甲酸酯)磺酸盐	<i>A. adenivorans</i> LS3	<1.1/5	0-550/-	10	40	37 °C/pH 6.8/<2.5 mol/L NaCl	粗处理、生化处理、未处理的海岸线和岛屿废水	[22]	
PCS									
海藻酸钙凝胶	Activated sludge	10-15/-	1-100/0.2	<10	>15	pH 8.7±0.1	橡胶厂废水	[23]	
Ca-alginate gel									
聚乙二醇醇	<i>T. cutaneum</i>	<0.5/-	4-100/-	3.5	48	30 °C/pH 6.8/0.1 mol/L PBS/Cu <sup>2+</sup> 、Zn <sup>2+</sup> 、Pb <sup>2+</sup> 影响较小; Hg <sup>2+</sup> 和 Cr <sup>2+</sup> 影响较大	化学试剂厂、食品厂	[29]	
PVA									
PVA-g-P(4-VP)	<i>T. cutaneum</i> ; <i>B. subtilis</i>	3-10/-	1.0-60/-	8.6	40	28 °C/pH 7.0/<0.6% NaCl/2.0 mg/L/Cu <sup>2+</sup> 、Fe <sup>3+</sup> 、Zn <sup>2+</sup> 、Mn <sup>2+</sup> 、Pb <sup>2+</sup> 、Co <sup>2+</sup> 无影响; Hg <sup>2+</sup> 、Cr <sup>2+</sup> 抑制	河水、生活废水	[30]	
(待续)									

(续表)								
PVA-g-P(5-VP)	BODseed (专为 BOD 设计, 含 7 种微生物)	<10/30-60	80/-	<3.9	50	30 °C/pH 7.0/5-50 mmol/L PBS	OECD、果糖、甘油等及各物质的混合物	[31]
PVA-g-P(4-VP)/sol-gel	<i>T. cutaneum</i>	10/<60	5-45	±8.37	2月 (80%活性)	28 °C/流速 3 mL/min	-	[32]
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> sol-gel	Yeast	<15/-	10-50/1.0	<15	30	25 °C/pH 6.8/0.5 mol/L NaCl	废水样品	[33]
PVA-ORMOSIL	<i>B. licheniformis</i> ; <i>D. maris</i> ; <i>M. marinus</i>	9/20 (稳态); 4/10 (起始速率)	0.3-40/-	<2.3	10个月	35 °C/pH 7.4/<0.55 mol/L NaCl	海水	[34]
聚丙烯酰胺; 牛血清蛋白; 角叉菜胶白; 海藻酸钠	<i>Klebsiella</i> + <i>E. coli</i> + 多糖酶	15-20/-	-	-	-	0.1 mol/L PBS	各种单糖、二糖、多糖	[35]
Polyacrylamide; BSA; K-carrageenan; Ca-alginate								
戊二醛处理海藻酸钠	Microbial consortium	8-11/-	15-150	1.8 (GGA); 12 (AWW)	-	37 °C/pH 7.0	5种河水	[36]
Calcium alginate-glutaraldehyde								

注: -: 未给出内容.  
Note: -: Information not available.

尽管其应用广泛,海藻酸盐复合材料却存在着如下不足:1) 在磷酸盐或柠檬酸盐溶液中会表现出不同程度的溶解,稳定性差。另外,因  $\text{Ca}^{2+}$  易被其他阳离子交换,当出现高浓度的  $\text{Na}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  等时,海藻酸钙胶体同样不稳定<sup>[38]</sup>;2) 某些海藻酸盐含有对敏感细胞有害的多酚类物质;3) 应用于生物膜式 BOD 传感器时,其多孔性虽使得有机物、溶解氧、代谢产物等能够较顺利地透过其中,但另一方面,所成的生物膜却存在孔径大小不易控制的不足<sup>[35,37-40]</sup>。

(2) 金属离子改性胶原纤维:胶原纤维是一种以牛皮、猪皮等动物皮为原料制得的天然高分子材料,该材料具有良好生物相容性、持水性及通透性等特点,经金属离子  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Zr}^{2+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$  等改性后的胶原纤维在保持原有性能的基础上能获得良好的机械性能及耐生物降解性,并表现出对蛋白质、酶、微生物等生物材料的吸附固定能力<sup>[43]</sup>。何利等<sup>[44]</sup>以  $\text{Zr}^{2+}$  改性胶原纤维(ZICF)为载体固定酿酒酵母,结果表明该固定化酿酒酵母具有较游离酿酒酵母更强的微生物活性。赵磊等<sup>[19]</sup>以 ZICF 固定酿酒酵母制备生物膜式 BOD 传感器,该研究表明,基于 ZICF 良好的通透性,可在很大程度上提高固定化微生物用量,从而增加传感器的灵敏度、线性响应范围等性能,该传感器可连续稳定使用 42 d 以上。基于金属离子改性的胶原纤维所具备的优越性能有望使其在生物传感器领域获得良好的应用前景。

**2.2.2 人工合成材料:** (1) 聚乙烯醇复合材料:聚乙烯醇(PVA)在 BOD 微生物传感器领域的应用极为广泛,这种聚合物物理化学性能稳定、生物相容性好、价格低廉、固定条件温和,是理想的微生物包埋材料,但不足之处在于制备成薄膜时其机械性能较差、易溶胀,从而限制了其在微生物传感器中的应用<sup>[45-47]</sup>。因此,研究者们通过紫外辐射、与硼酸溶液反应以及 N-乙烯基吡啶聚合等方式提高 PVA 的机械性能,但这些方法所涉及的试剂及反应条件多对活细胞有负面影响,从而降低传感器的灵

敏度等特性<sup>[45-47]</sup>。N-乙烯基吡咯烷酮无毒性,同时对某些微生物活性有提高作用,Arlyapov 等<sup>[45]</sup>用该物质修饰 PVA 作为微生物固定化载体制备生物膜式 BOD 传感器,所得传感器可连续稳定工作 30 d 以上,线性响应范围为 0.7–206.7 mg/L。Wang 等<sup>[46,48-50]</sup>的课题组在 PVA 复合材料作为微生物固定化载体制备 BOD 微生物传感器方面做了许多研究。近来,该课题组<sup>[51]</sup>以 PVA 结合海藻酸钠(SA)为固定化载体,采用 PVA-硼酸法、PVA-硝酸盐法、PVA-磷酸盐法、PVA-硫酸盐法、PVA 冻融法制备固定化活性污泥颗粒,结果表明,PVA-硫酸盐法所制备的微生物固定化颗粒的使用寿命在 30 d 以上,具有稳定持续的长期使用性能。另外,研究者以硅酸盐有机改性 PVA 的溶胶凝胶包埋法固定化微生物,该材料较溶胶凝胶具有更好的通透性,使传感器获得较短的响应时间及较低的检测限,较单纯 PVA 具有不溶胀、稳定性好等优点,所制备的微生物膜储存一年后仍可使用,传感器线性响应范围为 0.2–40.0 mg/L<sup>[52]</sup>。

(2) 基于溶胶-凝胶法的复合材料:溶胶-凝胶(Sol-gel)法是以无机盐或金属醇盐为前驱物,通过水解缩聚由溶胶逐渐形成凝胶,经老化、干燥等后处理从而得到所需材料的方法<sup>[32-34]</sup>。Sol-gel 技术在高能电池、超导材料、纳米科技、生物催化等领域有着广泛的应用<sup>[32-34]</sup>。在生物传感器领域,这种方法所得固定化载体常具备以下优点:1) 良好的生物相容性、物理刚性、化学惰性、溶剂中可忽略的溶胀性,较好的光热稳定性和耐生物降解性;2) 多孔的网状结构可用于固定不同分子量的活性组分;3) 孔径分布、比表面积等结构参数可以通过对水解过程的调整来控制;4) 可制备出块状、薄膜状、纤维状、粉状等任何期望的构型;5) 良好的光透性和低荧光性可用于制备光学生物传感器;6) 可粘附于塑料、纸、金属等大多数材料表面;7) 可通过与电绝缘材料( $\text{ZnO}_2$ 、 $\text{Al}_2\text{O}_3$  和  $\text{SiO}_2$ )、半导体材料( $\text{TiO}_2$ )、导电陶瓷( $\text{V}_2\text{O}_5$ )、互穿导电高分子(PPy, PAn)及超导体( $\text{YBa}_2\text{CuO}_7$ )等材料结合而获得期望的导性。这



类材料也存在玻璃般的脆性及干燥过程中的块体裂缝等不足。对此, 研究者们已通过聚乙醇等材料结合避免其脆性; 加入壳聚糖、聚羟基聚合物、表面活性剂等材料可解决其干燥皱缩问题<sup>[53-55]</sup>。

基于溶胶凝胶技术的固定化载体在 BOD 微生物传感器中有较多应用, 所涉及的基础材料有硅(四甲基硅烷, TMOS)、4-乙炔吡啶、聚乙醇(PVA)、铝( $\text{Al}_2\text{O}_3$ )、硝酸铈铵等<sup>[32-34,53]</sup>。戴媛静等<sup>[56]</sup>以有机改性溶胶凝胶 PVA 包埋法固定化异常汉逊酵母制备生物膜式 BOD 传感器, 该研究表明, PVA 的加入顺序对膜性能有很大影响, 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。

(3) 石墨烯基复合材料: 石墨烯(Graphene, GE) 是一种由  $\text{sp}^2$  杂化的碳原子以六边形排列形成的周期性蜂窝状二维碳质新型纳米材料<sup>[57]</sup>。该材料具有许多优异的性质, 如石墨烯是世界上最坚固的材料(杨氏模量 1.0 TPa), 理论比表面积高达  $2\,630\text{ m}^2/\text{g}$ , 具有良好的导热性 $[5\,000\text{ W}/(\text{m}\cdot\text{K})]$ 和室温下高速的电子迁移率 $[200\,000\text{ cm}^2/(\text{V}\cdot\text{s})]$ 等<sup>[57-58]</sup>; 另外, 石墨烯可与陶瓷, 铂(Pt)、金(Au)、银(Ag)、钴(Co)等金属离子以及  $\text{TiO}_2$ 、 $\text{SnO}_2$ 、CdS 和 ZnS 等半导体结合制备复合材料, 这些复合材料通常在保持各自优异性能的基础上还衍生出新的性能, 这些特性使得石墨烯在传感器、储氢材料、药物控制释放、离子筛、电极材料、重金属离子吸附、减震降噪和催化等领域具有广阔的应用前景<sup>[57-58]</sup>。近来, 石墨烯复合材料在 BOD 微生物传感器领域也渐有应用<sup>[59-60]</sup>, Liu 等<sup>[60]</sup>以石墨烯基水凝胶( $\text{Gel}_{\text{GONR}}$ )作为微生物固定化载体制备 BOD 微生物传感器, 该研究显示, 以  $\text{Gel}_{\text{GONR}}$  作为载体时, 微生物固定量是常规材料(Activated carbon and carbon fiber felt)的 3.3 倍, 对有机物的降解速率是活性炭毡的 2.5 倍; 另外, 该

传感器稳定性好, 使用寿命可达一年。

除上述材料外, 琼脂糖<sup>[20]</sup>、硝酸纤维膜<sup>[17]</sup>、尼龙网<sup>[16]</sup>、聚碳酸酯<sup>[53-54]</sup>、玻璃纤维<sup>[18]</sup>等材料在生物膜式 BOD 传感器中也常作为微生物固定化载体单独或混合使用。每种载体的基本组成及性能各异, 其不同特性对传感器的灵敏度、稳定性、使用寿命等性能具有不同的影响。表 3 呈现了载体特性与生物膜式 BOD 传感器各主要性能之间的关系<sup>[2-3,6-8]</sup>。

### 3 微生物在生物膜式 BOD 传感器中的应用

#### 3.1 微生物种类

与其他类型生物传感器不同的是, 制备 BOD 生物传感器时要求特异性和选择性低的微生物种类, 即需要所用微生物对广泛的物质具有强生物氧化活性, 以使传感器具有更宽的实际应用范围。应用于 BOD 微生物传感器的菌种可分为单一微生物和复合微生物(两种菌、多种菌或活性污泥等)。

**3.1.1 单一微生物:** 常应用于 BOD 微生物传感器的单一微生物有 *Trichosporon cutaneum*<sup>[12]</sup>、*Bacillus licheniformis*<sup>[54]</sup>、*Aeromonas hydrophila*<sup>[20]</sup>、*Pseudomonas fluorescens*<sup>[20]</sup>、*Dietzia maris*<sup>[25]</sup>、*Arxula adenivorans*<sup>[22]</sup>、*Debaryomyces hansenii*<sup>[18]</sup>、*Pseudomonas putida*<sup>[18]</sup>、*Klebsiella oxytoca*<sup>[35]</sup>、*Bacillus subtilis*、*Clostridium butyricum*、*Lipomyces kononenkoae*、*Hansenula anomala*、*Photobacterium phosphoreum*、*Torulopsis candida*、*Saccharomyces cerevisiae*、*Escherichia coli* 等<sup>[2-8,18,53]</sup>(表 2), 由单一微生物作为识别元件时微生物膜常具有较好的稳定性且使用寿命长。Riedel 等<sup>[61]</sup>从 11 种性能优良的单一菌株中选择出一株耐高温( $48\text{ }^\circ\text{C}$ )、耐高渗透压( $2.5\text{ mol/L NaCl}$ )的酵母菌 *Arxula adenivorans* LS3 制备微生物膜, 对不同种类的单纯有机物质及实际水样的测定结果表明该菌株较商业化 BOD 传感器所用菌株更适于作为 BOD 微生物传感器响应菌株, 之后有许多研究对此菌株做了应用<sup>[10,22]</sup>。汉逊德巴利酵母(*Debaryomyces hansenii*)在保持一般酵母所

表3 生物膜式 BOD 传感器性能与载体特性的关系  
Table 3 The relationship between the characteristics of immobilization materials and biofilm-type BOD sensor

载体特性 Features of carriers	灵敏度 Sensitivity	使用寿命 Service life	重现性 Reproducibility	线性响应范围 Linear response range	响应时间 Response time
物化稳定性; 耐生物降解性 Physical and chemical stability; Resistance to biodegradation	c	a	a	c	c
生物相容性 Biocompatibility	a	a	a	a	a
机械性能 Mechanical property	c	a	a	a	c
微生物固定量 Amounts of immobilized microbes	a	b 或 c	c	a	a
致密性 Compactness	b	c	c	b	b
溶胀性 Swelling property	c	b	b	c	c
电子迁移能力 Electron transfer ability	a	c	c	a	a
光透性 Light permeability	a	c	c	a	a

注: a: 传感器性能与载体性能呈正相关关系; b: 传感器性能与载体性能呈负相关关系; c: 两者间无明显相关性。

Note: a: Positive correlation between the features of carriers and sensor's performances; b: Negative correlation between the features of carriers and sensor's performances; c: No obvious correlation between the features of carriers and sensor's performances.

具有的抗逆性强、工作寿命长等性能的基础上具备对许多醇类、糖类、氨基酸类等有机物质的分解能力, Arlyapov 等<sup>[45]</sup>以 *Debaryomyces hansenii* 作为响应菌株, 测定了 34 种单纯有机物质, 结果表明, 该菌株除了具有广泛的降解谱外, 还有较宽的温度适应范围(15–25 °C), 该菌株在 BOD 微生物传感器中具有较好的实际应用价值。虽然研究者们已报道了诸多性能优良的菌株, 但实际上这些菌株所具备的降解谱仍远远不能满足实际应用时的需求(更多微生物及其应用见表 2)。

**3.1.2 复合微生物:** 为使生物膜式 BOD 传感器具有更宽的实际应用范围, 研究者们将两种或多种微生物固定在一起作为响应元件。Jia 等<sup>[62]</sup>将枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和皮状丝孢酵母 (*Trichosporon cutaneum*) 共同包埋制备 BOD 微生物传感器, 比较了各单一微生物和复合微生物所成传感器对不同种类有机物质测定与 BOD<sub>5</sub> 法的相

性。结果表明, 复合微生物较单一微生物所成的传感器与 BOD<sub>5</sub> 法具有更好的相关性; 对 OECD 拟合废水、生活污水、湖水等实际水样的测定结果表明该复合菌株传感器的实际应用效果良好。同类研究<sup>[2,16,53,60]</sup>中, Liu 等<sup>[60]</sup>以专为 BOD 测定设计的含有 7 种强健微生物的商业化 BODseed 作为响应微生物, 该传感器可对不同类型的城市生活污水进行测定, 具有较好实际应用性能。多种菌混合作为响应元件能在很大程度上拓宽 BOD 传感器的实际应用范围, 但常因微生物之间的竞争、补食等作用使传感器的稳定性、使用寿命等性能受影响。也有部分研究以多菌株协同工作并获得较长使用寿命<sup>[18,29]</sup>, 这主要是归于固定化载体的优良性能。

### 3.2 酶的应用及水样预处理

为进一步拓宽生物膜式 BOD 传感器的实际应用范围、缩短响应时间, 部分研究将特异性酶与微生物共同固定制备响应元件, 使传感器具备更好的

实际应用性能<sup>[4]</sup>。Kim 等<sup>[35]</sup>将克雷伯氏菌(*Klebsiella* sp.)与各种单糖酶、多糖酶结合作为响应元件制备 BOD 微生物传感器,结果表明,特异性酶的加入使传感器的灵敏度及实际应用范围得到了改善。除了酶的应用外,也有研究者以  $O_3$ 、 $TiO_2$  及紫外辐射等对样品做前处理以改善传感器性能<sup>[2,4,63-64]</sup>。 $TiO_2$  可将大分子物质催化为能够迅速被微生物分解的小分子物质, Liu 等<sup>[64]</sup>的研究表明,传感器对经  $TiO_2$  前处理的各样品具有更短的响应时间。

#### 4 生物膜式 BOD 传感器的使用条件

生物膜式 BOD 传感器适宜的使用条件主要取决于所用微生物的生物学特性。各种微生物所适宜的温度、pH、无机盐离子浓度等各有差异(表 2)。通常以使微生物达到最高活性的条件作为 BOD 生物传感器的使用条件,也有部分报道以微生物适宜温度范围内的较低温度作为其使用条件,从而延长固定化微生物的使用寿命<sup>[56-57]</sup>。使大多数微生物达到最高活性的温度在 20–45 °C;pH 为 5.0–9.0;NaCl 通常作为无机盐离子的代表,对无机盐离子浓度的承受能力因菌株不同各有差异,通常酵母菌较细菌具有更好的盐耐受性<sup>[18]</sup>,因此,海水等高盐度水样的 BOD 测定多以酵母菌作为响应微生物<sup>[18,25,52]</sup>。

对重金属及毒性物质耐受性较好的微生物可使传感器具有应用于含该种类毒性物质水样的可能。许多研究<sup>[13,29-30]</sup>对  $Cu^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Cr^{3+}$ 、 $Hg^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$  等常见的重金属进行测定,微生物通常对  $Pb^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$  等元素表现出较差的耐受性,因此不适用于高含(浓度因微生物种类有差异,常为 1–2 mg/L)此类重金属水样的 BOD 测定。Arlyapov 等<sup>[18]</sup>以 *Debaryomyces hansenii* 作为响应菌株,测定了  $Ni^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Bi^{3+}$ 、 $Sn^{2+}$ 、 $Hg^{3+}$ 、 $Cr^{3+}$  等重金属离子对传感器的影响,结果表明,该菌株对除  $Pb^{2+}$  以外的重金属均具有较好的抵抗性。也有部分水样含重金属浓度较高,以至于超出一般微生物的毒性承受范围。对此,研究者们通过对水样进

行化学处理(如加 EDTA)或膜(如聚碳酸酯膜)过滤等方法减小样品中金属离子对微生物的毒害作用<sup>[4]</sup>。

#### 5 生物膜式 BOD 传感器的应用现状

已报道的生物膜式 BOD 传感器利用了不同种类的微生物,这些传感器分别对河水<sup>[36]</sup>、海水<sup>[25]</sup>、城市生活污水<sup>[56]</sup>、食品加工厂废水<sup>[55]</sup>、酒厂废水<sup>[13]</sup>及橡胶厂废水<sup>[23]</sup>等表现出良好的 BOD 分析性能。表 2 呈现了部分生物膜式 BOD 传感器对不同种类实际水样的应用情况,其中部分研究在实验室内进行<sup>[15,63]</sup>,也有研究者将传感器设计为可应用于在线监测的分析系统<sup>[18,23]</sup>。

商业化 BOD 微生物传感器首先在 1983 年于日本面世。目前,国内外商业化 BOD 微生物传感器以反应器式 BOD 传感器(流通式结构)为主<sup>[2]</sup>,其中部分传感器的响应元件为微生物膜,也有部分传感器不对微生物做固定而直接置其(活性污泥或单一菌种)于反应室内<sup>[2,6]</sup>。这两类传感器都是通过测定微生物的呼吸活性变化获得待测水样 BOD 浓度。表 4 呈现了部分商业化 BOD 微生物传感器及其主要性能参数。

以微生物膜作为识别元件的优点是微生物膜更换方便,成本较低,多数微生物膜可保存较长时间(一年以上),这类 BOD 微生物传感器可应用于在线监测系统。其不足之处是随着使用时间的增长,生物膜中的微生物数量可能增多,从而影响传感器的性能(响应时间、线性响应范围、灵敏度等)。也有研究将微生物经固化载体包埋后制备成颗粒状,这些颗粒直接悬浮于测量室内作为生物识别元件,所成传感器虽能在一定程度上拓宽其线性响应范围<sup>[49]</sup>,但仍存在微生物数量增涨等问题,其商业化应用较少<sup>[2]</sup>。微生物燃料电池型 BOD 传感器虽稳定性好,无需过多维护,但其响应时间较长(测定周期为数小时),鲜有报道将其应用于实际环境监测<sup>[2,6]</sup>。基于发光细菌的 BOD 微生物传感器也受到较多关注,该类传感器具有高灵敏度、低检测限、易于实现微型传感器、芯片传感器的制备等优点<sup>[6-7]</sup>,但所

表 4 部分商业化 BOD 微生物传感器的基本性能  
Table 4 Performance of several commercial microbial BOD sensors

型号 Instrument model	制造商 Manufacturer	生物识别元件 Bio-recognition element	信号转换器 Signal transducer	测定时间 Response time (min)	量程 Measurement range (mg/L)	精确度 Accuracy (%)
LB-50	青岛宜兰环保工程有限公司	微生物膜	溶解氧电极	8	1-4 000	≤5
B-1	北京华夏科创仪器技术有限公司	微生物膜	溶解氧电极	60 (周期)	2-400	≤5
HL84HL-1000	北京中西远大科技有限公司	微生物膜	溶解氧电极	8	2-5 000	≤5
LY-1A	昆山广测仪器设备有限公司	微生物膜	溶解氧电极	8	2-4 000	±5
MB-DBO	Biosensores (美国)	—	溶解氧电极	30 (周期)	10-1 000	<3 (变异系数)
ROD TOX NG	KELMA (比利时)	活性污泥	溶解氧电极	30 (周期)	0-500 000	—
BioMonitor	LAR Process Analysers AG (德国)	活性污泥	溶解氧电极	3-4	1-200 000	—
Ra-BOD®	AppliTek (比利时)	活性污泥	溶解氧电极	30-40 (周期)	20-100 000	≤5

注：—：未提供相应参数。

Note: —: Information is not available.

涉微生物种类有限，从而只能检测一部分有机物质，这一不足限制了其实际应用及商业化生产。

## 6 存在的问题与展望

每种固定化方法、材料及微生物种类具有各自的适用范围，虽应用有多寡，但实际上并没有所谓最好的固定化载体或微生物种类。具体选择时需根据传感器结构、信号转换装置类型、固定化难易程度、所测定实际水样的种类、成本等方面综合考虑。

在生物膜式 BOD 传感器中，对固定化载体的性能是一种综合要求，对其物化稳定性、耐生物降解性、机械性能、传质效果、微生物固定量易控性、生物相容性等性能都有较高的要求。传统的微生物固定化载体如海藻酸盐、聚乙烯醇、琼脂糖等虽受到广泛研究并已有许多商业化应用<sup>[2,4,6,9]</sup>，但这些材料多存在机械性能差、微生物固定量小、不同程度的溶胀性及传质效果差等不足。不同材料的复合使用虽能在一定程度上弥补这些不足，但由于其基础

材料的可塑性差，复合后仍难以达到理想载体所需的综合要求。另外，现目前应用于生物膜式 BOD 传感器的微生物主要存在细胞活性、稳定性及降解谱等方面的不足。

随着纳米技术、智能复合材料技术等领域的迅速发展<sup>[65-67]</sup>，石墨烯<sup>[30,68]</sup>、纳米金颗粒<sup>[69]</sup>、碳纳米管<sup>[70]</sup>、磁性纳米颗粒<sup>[65]</sup>等材料逐渐在生物传感器领域显示出极大的优势。这些材料除具备传统材料所具有的优良性能外，还表现出比表面积大、传质效果好、稳定性强等优点；另外，运用这些技术(材料)可在很大程度上通过物质的重聚集、材料间的优势互补而获得具有期望性能的新型材料。这些新型材料在生物膜式 BOD 传感器领域，甚至生物传感器领域都将具有长远的发展前景与实际应用意义。目前，微生物方面所存在的不足主要通过以下途径解决：首先是寻找活性强、稳定性高、降解谱广泛的微生物菌株；其次，可通过使用恰当的载体材料辅助提高微生物的活性及稳定性；最后，可通过向

微生物体内导入特定的酶使其具备对某些物质的特异性。随着材料科学与基因工程等技术的不断发展, 必将有更多性能优良的载体材料与微生物种类应用于生物膜式 BOD 传感器中, 有望使这一检测方法更具实际应用性。

## 参考文献

- [1] Rice EW, Baird RB, Eaton AD, et al. Standard methods for the examination of water and wastewater[M]. 22th Edition. Washington, DC: American Public Health Association, 2012
- [2] Jouanneau S, Recoules L, Durand MJ, et al. Methods for assessing biochemical oxygen demand (BOD): a review[J]. Water Research, 2014, 49: 62-82
- [3] Liu J, Mattiasson B. Microbial BOD sensors for wastewater analysis[J]. Water Research, 2002, 36(15): 3786-3802
- [4] Wang JL, Zhang YX. Research advances in biosensor for rapid measurement of biochemical oxygen demand (BOD)[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2007, 27(7): 1066-1082 (in Chinese)  
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, 27(7): 1066-1082
- [5] Ye YC, Wang JL, Pu LF, et al. Biosensors for rapid estimation of biochemical oxygen demand[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2005, 33(3): 405-410 (in Chinese)  
叶裕才, 王建龙, 普利锋, 等. 生物传感器快速测定生化需氧量的研究[J]. 分析化学, 2005, 33(3): 405-410
- [6] Ponomareva ON, Arlyapov VA, Alferov VA, et al. Microbial biosensors for detection of biological oxygen demand (a review)[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2011, 47(1): 1-11
- [7] Reshetilov A, Arlyapov V, Alferov V, et al. BOD biosensors: application of novel technologies and prospects for the development[A]//Rinken T. State of the Art in Biosensors-Environmental and Medical Applications[M]. Rijeka Croatia: Intech Open Access Publisher, 2013
- [8] Chee GJ. Biosensor for the determination of biochemical oxygen demand in rivers[A]//Somerset V. Environmental Biosensors[M]. South Korea: Intech Open Access Publisher, 2011
- [9] Su L, Jia WZ, Hou CJ, et al. Microbial biosensors: a review[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2011, 26(5): 1788-1799
- [10] Lei Y, Chen W, Mulchandani A. Microbial biosensors[J]. Analytica Chimica Acta, 2006, 568(1/2): 200-210
- [11] Reiss M, Heibges A, Metzger J, et al. Determination of BOD-values of starch-containing waste water by a BOD-biosensor[J]. Biosensors and Bioelectronics, 1998, 13(10): 1083-1090
- [12] Yang Z, Suzuki H, Sasaki S, et al. Disposable sensor for biochemical oxygen demand[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1996, 46(1): 10-14
- [13] Karube I, Matsunaga T, Mitsuda S, et al. Microbial electrode BOD sensors[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1977, 19(10): 1535-1547
- [14] Liu J, Björnsson L, Mattiasson B. Immobilised activated sludge based biosensor for biochemical oxygen demand measurement[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2000, 14(12): 883-893
- [15] Dhali P, Siddiqi TO, Ahmad A, et al. Selection of an apt support for the immobilization of microbes for the development of a BOD biosensor[J]. Analytical Methods, 2013, 5(6): 1533-1541
- [16] Dhali P, Kumar A, Joshi A, et al. Quick and reliable estimation of BOD load of beverage industrial wastewater by developing BOD biosensor[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2008, 133(2): 478-483
- [17] Chee GJ, Nomura Y, Karube I. Biosensor for the estimation of low biochemical oxygen demand[J]. Analytica Chimica Acta, 1999, 379(1/2): 185-191
- [18] Arlyapov V, Kamanin S, Ponomareva O, et al. Biosensor analyzer for BOD index express control on the basis of the yeast microorganisms *Candida maltosa*, *Candida blankii*, and *Debaryomyces hansenii*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2012, 50(4/5): 215-220
- [19] Zhao L, Jin RY, He L, et al. Performance and application of BOD biosensor with *S. cerevisiae* immobilized on collagen fiber[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2015, 9(7): 3558-3564 (in Chinese)  
赵磊, 金若芸, 何利, 等. 胶原纤维固定酿酒酵母 BOD 传感器性能及应用[J]. 环境工程学报, 2015, 9(7): 3558-3564
- [20] Raud M, Tenno T, Jögi E, et al. Comparative study of semi-specific *Aeromonas hydrophila* and universal *Pseudomonas fluorescens* biosensors for BOD measurements in meat industry wastewaters[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2012, 50(4/5): 221-226
- [21] Dai YJ, Lin L, Li PW, et al. Comparison of BOD optical fiber biosensors based on different microorganisms immobilized in ormosil matrixes[J]. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 2004, 84(8): 607-617
- [22] Chan C, Lehmann M, Tag K, et al. Measurement of biodegradable substances using the salt-tolerant yeast *Arxula adeninivorans* for a microbial sensor immobilized with poly (carbamoyl) sulfonate (PCS) part I: construction and characterization of the microbial sensor[J]. Biosensors and Bioelectronics, 1999, 14(2): 131-138
- [23] Kumlanghan A, Kanatharana P, Asawatreratanakul P, et al. Microbial BOD sensor for monitoring treatment of wastewater from a rubber latex industry[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2008, 42(6): 483-491
- [24] Rastogi S, Kumar A, Mehra NK, 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 and Bioelectronics, 2003, 18(1): 23-29
- [25] Trosok S, Driscoll B, Luong J. Mediated microbial biosensor using a novel yeast strain for wastewater BOD measurement[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 56(3/4): 550-554
- [26] Tan TC, Qian ZR. Dead *Bacillus subtilis* cells for sensing biochemical oxygen demand of waters and wastewaters[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 1997, 40(1): 65-70
- [27] Suriyawattanakul L, Surareunghai W, Sritongkam P, et al. The use of co-immobilization of *Trichosporon cutaneum* and *Bacillus licheniformis* for a BOD sensor[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 59(1): 40-44
- [28] Tan TC, Li F, Neoh KG. Measurement of BOD by initial rate of response of a microbial sensor[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 1993, 10(2): 137-142
- [29] Riedel K, Lange KP, Stein HJ, et al. A microbial sensor for BOD[J]. Water Research, 1990, 24(7): 883-887
- [30] Liu CY, Ma C, Yu DB, et al. Immobilized multi-species based biosensor for rapid biochemical oxygen demand measurement[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2011, 26(5): 2074-2079
- [31] Liu L, Shang L, Guo SJ, et al. Organic-inorganic hybrid material for the cells immobilization: long-term viability mechanism and application in BOD sensors[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2009, 25(2): 523-526
- [32] Chen DD, Cao YB, Liu BH, et al. A BOD biosensor based on a microorganism immobilized on an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  sol-gel matrix[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2002, 372(5/6): 737-739
- [33] Jiang YQ, Xiao LL, Zhao L, et al. Optical biosensor for the determination of BOD in seawater[J]. Talanta, 2006, 70(1):



- 97-103
- [34] Wang J. Sol-gel materials for electrochemical biosensors[J]. *Analytica Chimica Acta*, 1999, 399(1/2): 21-27
- [35] Kim MN, Park KH. Immobilization of enzymes for *Klebsiella* BOD sensor[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2004, 98(1): 1-4
- [36] Hussin S, Ismail AK, Shahir S. A BOD sensor using immobilized microbial consortium in alginate-based matrix for rapid detection of river water pollution[J]. *Jurnal Teknologi*, 2012, 59(1): 37-41
- [37] D'Souza SF. Microbial biosensors[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2001, 16(6): 337-353
- [38] Sionkowska A. Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: review[J]. *Progress in Polymer Science*, 2011, 36(9): 1254-1276
- [39] Strand BL, Mørch YA, Skjak-Braek G. Alginate as immobilizing matrix for cells[J]. *Minerva Biotecnologica*, 2000, 12(4): 223-233
- [40] Liu BH, Kong JL, Chen L, et al. Study on the microbial film immobilization methods for preparing the biosensor for rapid BOD determination[J]. *Chinese Journal of Environmental Science*, 1994, 15(6): 8-11, 27 (in Chinese)
- 刘宝红, 孔继烈, 陈蕾, 等. BOD 快速测定传感器的微生物膜固定方法研究[J]. *环境科学*, 1994, 15(6): 8-11, 27
- [41] Sohn MJ, Lee JW, Chung C, et al. Rapid estimation of biochemical oxygen demand using a microbial multi-staged bioreactor[J]. *Analytica Chimica Acta*, 1995, 313(3): 221-227
- [42] Seo KS, Choo KH, Chang HN, et al. A flow injection analysis system with encapsulated high-density *Saccharomyces cerevisiae* cells for rapid determination of biochemical oxygen demand[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 83(2): 217-223
- [43] Lu AX. Preparation of metal ion-immobilized collagen fiber and their adsorption behaviours to protein, enzyme and microorganism[D]. Chengdu: Doctoral Dissertation of Sichuan University, 2006 (in Chinese)
- 陆爱霞. 胶原纤维固定金属离子吸附材料的制备及其对蛋白质、酶和微生物的吸附特性研究[D]. 成都: 四川大学博士学位论文, 2006
- [44] He L, He Q, Liao XP, et al. Immobilization of *S. cerevisiae* cell on metal ion-loaded collagen fiber and its ethanol-fermentation property[J]. *Journal of Sichuan University (Engineering Science Edition)*, 2010, 42(6): 176-182 (in Chinese)
- 何利, 何强, 廖学品, 等. 胶原纤维负载金属离子固定酵母细胞及其发酵特性研究[J]. *四川大学学报: 工程科学版*, 2010, 42(6): 176-182
- [45] Arlyapov VA, Yudina NY, Asulyan LD, et al. BOD biosensor based on the yeast *Debaryomyces hansenii* immobilized in poly (vinyl alcohol) modified by N-vinylpyrrolidone[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2013, 53(4): 257-262
- [46] Zhang Y, Wang JL, Li HZ, et al. Application of microbial BOD sensor for marine monitoring[J]. *Marine Environmental Science*, 2001, 20(1): 51-54 (in Chinese)
- 张悦, 王建龙, 李花子, 等. 生物传感器快速测定 BOD 在海洋监测中的应用[J]. *海洋环境科学*, 2001, 20(1): 50-54
- [47] Zain NAM, Suhaimi MS, Idris A. Development and modification of PVA-alginate as a suitable immobilization matrix[J]. *Process Biochemistry*, 2011, 46(11): 2122-2129
- [48] Zhang Y, Wang J, Li H, et al. Application of microbial BOD sensors in marine monitoring[J]. *Marine Science Bulletin*, 2001, 3(1): 69-73
- [49] Wang JL, Zhang YX, Wang YY, et al. An innovative reactor-type biosensor for BOD rapid measurement[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, 25(7): 1705-1709
- [50] Zhang LS, Wu WZ, Wang JL. Immobilization of activated sludge using improved polyvinyl alcohol (PVA) gel[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2007, 19(11): 1293-1297
- [51] Mao YH, Wang JL. Immobilization of activated sludge in PVA matrix using innovative methods[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2013, 33(2): 370-376 (in Chinese)
- 郝云汉, 王建龙. 聚乙烯醇固定化微生物新方法的研究[J]. *环境科学学报*, 2013, 33(2): 370-376
- [52] Lin L, Xiao LL, Huang S, et al. Novel BOD optical fiber biosensor based on co-immobilized microorganisms in ormosils matrix[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2006, 21(9): 1703-1709
- [53] Jin W, Brennan JD. Properties and applications of proteins encapsulated within sol-gel derived materials[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2002, 461(1): 1-36
- [54] Xu ZA, Chen X, Dong SJ. Electrochemical biosensors based on advanced bioimmobilization matrices[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2006, 25(9): 899-908
- [55] Hench LL, West JK. The sol-gel process[J]. *Chemical Reviews*, 1990, 90(1): 33-72
- [56] Dai YJ, Zhong ZM, Chen X, et al. Ormosils-PVA BOD sensing film based on oxygen luminescence quenching[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2003, 23(5): 683-688 (in Chinese)
- 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
- [57] Kuila T, Bose S, Khanra P, et al. Recent advances in graphene-based biosensors[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011, 26(12): 4637-4648
- [58] Bai S, Shen XP. Graphene-based inorganic nanocomposites[J]. *Process in Chemistry*, 2010, 22(11): 2106-2118 (in Chinese)
- 柏嵩, 沈小平. 石墨烯基无机纳米复合材料[J]. *化学进展*, 2010, 22(11): 2106-2118
- [59] Wang JF, Bian C, Tong JH, et al. Reduced carboxylic graphene/palladium nanoparticles composite modified ultramicroelectrode array and its application in biochemical oxygen demand microsensor[J]. *Electrochimica Acta*, 2014, 145: 64-70
- [60] Liu L, Zhai JF, Zhu CZ, et al. One-pot synthesis of 3-dimensional reduced graphene oxide-based hydrogel as support for microbe immobilization and BOD biosensor preparation[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 63: 483-489
- [61] Riedel K, Lehmann M, Tag K, et al. *Arxula adenivorans* based sensor for the estimation of BOD[J]. *Analytical Letters*, 1998, 31(1): 1-12
- [62] Jia JB, Tang MY, Chen X, et al. Co-immobilized microbial biosensor for BOD estimation based on sol-gel derived composite material[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2003, 18(8): 1023-1029
- [63] Chee GJ, Nomura Y, Ikebukuro K, et al. Development of highly sensitive BOD sensor and its evaluation using preozonation[J]. *Analytica Chimica Acta*, 1999, 394(1): 65-71
- [64] Liu L, Zhang SS, Xing L, et al. A co-immobilized mediator and microorganism mediated method combined pretreatment by TiO<sub>2</sub> nanotubes used for BOD measurement[J]. *Talanta*, 2012, 93: 314-319
- [65] Šešćovićová J, Tkáč J. Application of nanomaterials in microbial-cell biosensor constructions[J]. *Chemical Papers*, 2015, 69(1): 42-53
- [66] Bučko M, Mislovičová D, Nahálka J, et al. Immobilization in biotechnology and biorecognition: from macro- to nanoscale systems[J]. *Chemical Papers*, 2012, 66(11): 983-998
- [67] Bogue R. Smart materials: a review of recent developments[J]. *Assembly Automation*, 2012, 32(1): 3-7
- [68] Shao YY, Wang J, Wu H, et al. Graphene based electrochemical sensors and biosensors: a review[J]. *Electroanalysis*, 2010, 22(10): 1027-1036
- [69] Saha K, Agasti SS, Kim C, et al. Gold nanoparticles in chemical and biological sensing[J]. *Chemical Reviews*, 2012, 112(5): 2739-2779
- [70] Yang WR, Ratnac KR, Ringer SP, et al. Carbon nanomaterials in biosensors: should you use nanotubes or graphene[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2010, 49(12): 2114-2138