

包埋不同淡水耗氧菌 BOD 传感膜的光谱响应特征研究

郭光美^{1,3}, 辛玲玲³, 王旭东³, 赵 贇³, 陈 曦^{2,3*}

1. 河北科技大学理学院, 河北 石家庄 050018

2. 厦门大学海洋环境国家重点实验室, 福建 厦门 361005

3. 厦门大学化学化工学院化学系现代分析科学教育部重点实验室, 福建 厦门 361005

摘 要 利用四甲氧基硅烷(TMOS)、二甲基二甲氧基硅烷(DiMeDMOS)与聚乙烯醇(PVA)构成的有机改性材料分别包埋五种不同淡水耗氧菌,制备光化学生物耗氧量(BOD)的传感敏感膜,并在自行构建的 BOD 测定仪上考察其光谱响应行为。实验结果表明,分别包埋五种淡水耗氧菌和它们混合菌种的 BOD 传感膜对 BOD 的荧光强度响应范围为 $0\sim 60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 至 $0\sim 120\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 线性相关系数为 $0.976\sim 0.997$, 响应时间为 $0.5\sim 8.7\text{ min}$, 传感敏感膜可连续使用 30 d 以上。实验研究考察了不同实验条件下如温度和测定体系的 pH 对 BOD 传感膜响应的影响。实验结果发现,在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存 12 个月后, BOD 传感膜仍保持原有响应值的 85% 以上,显示出较好的重复性和稳定性。初步应用结果表明, BOD 传感膜可应用于地表水中的 BOD 检测。

关键词 生物耗氧量; 生物化学传感器; 荧光; 淡水耗氧菌株

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2008)09-2134-05

引 言

近年来,随着工农生产的迅速发展,排入河流湖泊的有机污染物逐年增加,造成河流、湖泊中有机污染物严重超标,从而导致水质恶化,威胁人们的健康。通常衡量水的污染程度的水质指标主要有生化需氧量(BOD)、化学需氧量(COD)、总有机碳(TOC)和总需氧量(TOD)等,其中 BOD 值表示水中有机物经微生物分解时所需的氧量,是环境监测中必须测定的重要指标之一^[1]。常规的 BOD 测定方法为 5 日法(BOD₅),但这种分析方法操作繁琐、时间较长、重现性差、不能及时反映水质情况,无法进行现场检测。为了达到及时监测水质状况,多年来人们一直在寻求快速测定 BOD 的方法,其中 BOD 微生物传感器检测方法由于快速、简便、可进行在线检测等特点而显示出广阔的应用前景。研制 BOD 传感器的关键问题之一是构造耗氧微生物膜。在地表水 BOD 传感检测应用中,已有多种淡水微生物菌种,包括皮状丝孢酵母^[1]、异常汉逊酵母^[2]、丁酸梭菌^[3]、枯草芽孢杆菌^[4]、恶臭假单胞菌^[5]、大肠杆菌^[6]和活性污泥^[7]等被采用的报道。本研究采用四甲氧基硅烷(TMOS),二甲基二甲氧基硅烷(DiMe-DMOS)与聚乙烯醇(PVA)分别固定五种淡水耗氧菌皮状丝孢酵母、枯草芽孢杆菌、恶臭假单胞菌、地衣芽孢

杆菌、异常汉逊酵母及上述五种菌的混合菌,制备六种光化学 BOD 微生物传感膜,考察了它们的最佳工作条件、共存物质的干扰情况以及对不同浓度葡萄糖-谷氨酸(GGA)溶液的荧光响应行为,并进行了地表水中 BOD 的检测。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

四甲氧基硅烷(TMOS,上海化学试剂公司),二甲基二甲氧基硅烷(DiMe-DMOS,瑞士 Fluka 公司),聚乙烯醇(PVA,美国 Aldrich 公司),4,7-二苯基-1,10 邻菲咯啉钌[Ru(dpp)₃(ClO₄)₂,香港理工大学应用生物与化学科技系合成],葡萄糖(C₆H₁₂O₆)和谷氨酸(C₅H₉NO₄)购自国药集团化学试剂有限公司(上海)。pH 7.0 磷酸盐缓冲溶液通过分别称取一定量的 KH₂PO₄ 和 Na₂HPO₄·12H₂O 溶于蒸馏水中获得。将葡萄糖和谷氨酸置于 105 °C 烘箱中干燥 6 h,准确称取以上两种物质各 0.075 0 g,用 pH 7.0 磷酸盐缓冲溶液溶解并定容至 1 000 mL,获得 GGA 标准溶液,其 BOD 值为 $(100\pm 18.5)\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

皮状丝孢酵母(*Trichosporon cutaneum*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、异常汉逊酵母(*Pichia*

收稿日期: 2007-05-08, 修订日期: 2007-08-16

基金项目: 国家“863”计划项目(2006AA09Z160),河北省科技计划项目(07246751D)和教育部“新世纪优秀人才支持计划”课题项目资助

作者简介: 郭光美,女,1962年生,河北科技大学理学院副教授 e-mail: gg-gg-mm@hebust.edu.cn

* 通讯联系人 e-mail: xichen@xmu.edu.cn

anomala)以上菌种均购自中国科学院微生物研究所(北京)。

BOD测定仪和传感膜活化装置为实验室自行设计加工^[1], 320 pH计(瑞士Delta公司), WH-2微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂), HZ150L型恒温培养摇床(武汉瑞华仪器设备有限公司)。

1.2 微生物的培养

皮状丝孢酵母、异常汉逊酵母所用培养基为麦芽汁液体培养基(麦芽原液和水按一定比例配制)。取一定量配制好的培养基分装至250 mL锥形瓶中, 灭菌、接种, 26 °C摇床培养36 h后, 4 000 r·min⁻¹离心15 min, 弃上清液, 磷酸盐缓冲溶液充分洗涤3次, 分离获得湿菌种, 加入适量磷酸盐缓冲溶液混合均匀, 用于制备生物膜。枯草芽孢杆菌、恶臭假单胞菌、地衣芽孢杆菌所用培养基为营养肉汁液体培养基(蛋白胨1%, 牛肉膏0.3%, NaCl 0.5%, pH 7.0)。取一定量配制好的培养基分装至250 mL锥形瓶中, 灭菌、接种, 28 °C摇床培养36~48 h后, 4 000 r·min⁻¹离心15 min, 弃去上清液, 磷酸盐缓冲溶液充分洗涤3次, 分离获得湿菌种, 加入适量磷酸盐缓冲溶液混合均匀后, 用于制备生物膜。

1.3 微生物膜的制备

溶胶-凝胶(sol-gel)是由TMOS、DiMe-DMOS、HCl按一定比例混合、超声而得。氧膜由sol-gel、饱和Ru(dpp)₃(ClO₄)₂四氢呋喃溶液按一定比例混合后, 取30 μL混合液均匀涂布于经硝酸、乙醇、蒸馏水处理过的12.7×38.1 mm玻片上成膜, 80 °C下烘干12 h备用。微生物膜将sol-gel、5% PVA、淡水菌种按一定比例混合充分振荡后, 取200 μL混合液均匀涂布于氧传感膜上, 室温通风处干燥成膜, 然后放入100 mg·L⁻¹GGA溶液中4 °C下保存。

1.4 实验步骤

100 mg·L⁻¹GGA溶液中4 °C下保存的传感膜其微生物活性较低, 使用前需在室温条件下活化24~36 h, 以保证其活性。将GGA溶液中4 °C下保存的微生物膜取出, 放入自制活化装置中, 设定浸泡和曝气时间, 用100 mg·L⁻¹GGA溶液活化, 在不搅拌的情况下, 微生物膜经过浸泡-曝气-浸泡-曝气循环, 使得荧光强度变化速率(dI/dt)达到稳定。将活化好的微生物膜置于样品池中, 在空气中静置至输出恒定数字信号, 在样品池中加入一定体积的GGA溶液, 在不搅拌, 不通空气, 密封的条件下, 溶液中溶解氧扩散速率远小于微生物膜对其消耗速率时, 传感膜周围测定液的溶解氧将被迅速消耗, 氧对微生物膜中荧光物质的荧光猝灭程度减少, 导致荧光强度逐渐升高, 当溶液中的氧扩散速率与细菌的呼吸状态相平衡时, 响应曲线达到平衡。根据dI/dt最大值与对应的标准溶液浓度的关系绘制标准曲线, 在实际样品分析中, 选定实验条件测试样品dI/dt值, 并根据标准曲线计算样品BOD含量。

2 结果与讨论

2.1 BOD传感膜的性能考察

2.1.1 温度的影响

为了了解包埋五种淡水耗氧菌膜及它们混合菌膜对温度

的敏感度, 实验在10~45 °C的温度变化范围内, 考察了六种淡水耗氧菌膜在100 mg·L⁻¹GGA溶液中的荧光响应情况, 结果见图1。

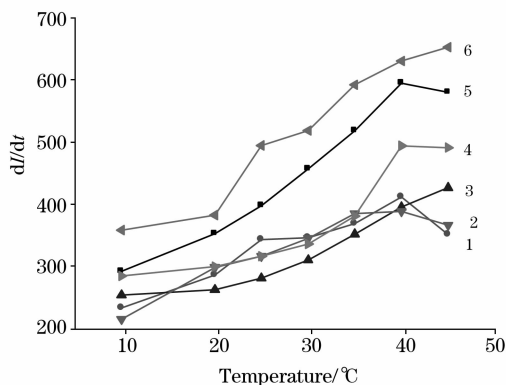


Fig. 1 Effects of temperature on the fluorescence response of sensing film immobilizing different limnetic microorganism

- 1: *Pichia anomala*; 2: *Pseudomonas putida*;
3: *Bacillus licheniformis*; 4: *Mixed microorganisms*;
5: *Trichosporon cutaneum*; 6: *Bacillus subtilis*

由图1可知, 温度变化对这些淡水耗氧菌膜的活性影响较大, 尤其是包埋枯草芽孢杆菌膜和地衣芽孢杆菌传感膜随着温度升高, dI/dt明显增大, 由于枯草芽孢杆菌膜和地衣芽孢杆菌膜属于嗜热菌属, 温度在一定范围内升高, 微生物呼吸加快, 消耗有机物的速度也加快, 导致微生物活性增加。异常汉逊酵母膜, 皮状丝孢酵母膜, 混合菌膜和恶臭假单胞菌膜随着温度升高, dI/dt也有一定程度增大, 在35~40 °C达最大值, 温度再进一步升高, dI/dt反而下降, 这是因为温度过高, 微生物形态和代谢发生改变, 导致微生物活性减弱, 甚至失去活性, 造成微生物膜的寿命缩短。为了保持淡水耗氧菌膜响应的重现性和准确性, 比较这些淡水耗氧菌膜的响应时间和响应活性, 实验选用的测定温度为35 °C。

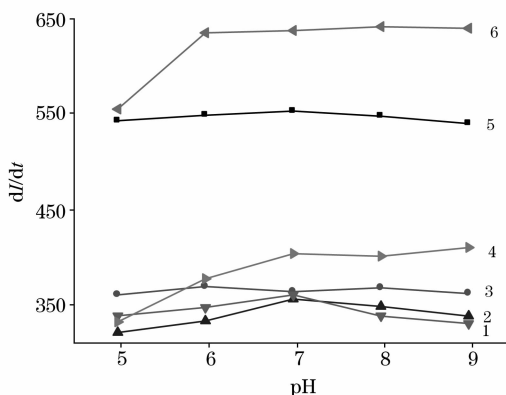


Fig. 2 Effect of pH on the fluorescence response of sensing film immobilizing different limnetic microorganism

- 1: *Pichia anomala*; 2: *Pseudomonas putida*;
3: *Bacillus licheniformis*; 4: *Mixed microorganisms*;
5: *Trichosporon cutaneum*; 6: *Bacillus subtilis*

2.1.2 pH 的影响

pH 控制不当, 过酸或过碱都会使得微生物变性而失活。配制 pH 从 5~9 的磷酸盐缓冲溶液, 控制温度为 35 °C, GGA 溶液浓度为 100 mg · L⁻¹, 考察不同 pH 磷酸盐缓冲液中对 BOD 传感膜的影响, 结果如图 2 所示。

由图 2 可知, 皮状丝孢酵母膜和地衣芽孢杆菌膜荧光响应时间短, 在较大的范围内不受 pH 变化的影响。枯草芽孢杆菌膜, 恶臭假单孢菌膜, 混合菌膜和异常汉逊酵母膜受 pH 变化影响较大, 在 pH 为 6~8 时, dI/dt 达到最大值, 因此淡水耗氧菌 BOD 传感膜的适宜 pH 范围为 6~8。

2.2 传感膜对不同有机物的响应

为了解不同淡水耗氧菌对不同有机物的降解能力, 以及淡水耗氧菌 BOD 微生物传感器的使用范围, 分别使用五种淡水耗氧菌膜以及它们的混合菌膜测定不同种类有机化合物

的 BOD 值与 BOD₅ 分析法比较^[8], 从表 1 结果可以看出, 利用这些菌膜分别测定谷氨酸、葡萄糖的 BOD 值与 BOD₅ 标准方法比较, 具有较好的一致性, 因此用 GGA 溶液适宜为所研制的 BOD 传感膜响应的标准液。而这些淡水耗氧菌膜测得乳糖、柠檬酸的 BOD 值与 BOD₅ 法相差较大, 可能乳糖、柠檬酸中含有难生化降解的有机物, 使得 BOD 测定值偏低。皮状丝孢酵母膜、恶臭假单孢菌膜、枯草芽孢杆菌膜测得淀粉的 BOD 值与 BOD₅ 法较接近, 相比其他淡水耗氧菌膜, 它们对淀粉具有较强的降解能力。由于单一菌种不可能降解所有有机物, 从而限制了它们对有机物的响应和测定, 通过将上述 5 种微生物菌株混合固定在同一传感膜上, 可扩大其降解有机物的范围, 由表 2 可知混合菌膜在降解组氨酸、氨基乙酸等有机物时, 其降解能力优于其他单一菌种的传感膜, 从而扩大了传感膜对不同样品的检测范围。

Table 1 Comparison of BOD and BOD₅ response values for different organic compound

Compound	BOD ₅ /mg mg ⁻¹	<i>Trichosporon</i> <i>cutaneum</i> /mg mg ⁻¹	<i>Pichia</i> <i>anomala</i> /mg mg ⁻¹	<i>Bacillus</i> <i>licheniformis</i> /mg mg ⁻¹	<i>Bacillus</i> <i>subtilis</i> /mg mg ⁻¹	<i>Pseudomonas</i> <i>putida</i> /mg mg ⁻¹	Mixedmicro organism/mg mg ⁻¹
Glutamic acid	0.42~0.64	0.62	0.59	0.51	0.63	0.60	0.55
Histidine	0.55	0.50	0.23	0.29	0.43	0.31	0.53
Citric acid	0.40	0.20	0.10	0.06	0.17	0.03	0.15
Glycine	0.52~0.55	0.46	0.35	0.41	0.40	0.42	0.51
Fructose	0.71	0.43	0.36	0.30	0.51	0.44	0.39
Sucrose	0.49~0.76	0.22	0.24	0.17	0.23	0.16	0.14
Lactose	0.63~0.88	0.10	0.10	0.09	0.18	0.07	0.06
Glucose	0.50~0.78	0.61	0.55	0.72	0.67	0.63	0.72
Starch	0.15~0.71	0.14	0.08	0.09	0.15	0.13	0.11

2.3 淡水耗氧菌 BOD 传感膜的响应时间及线性范围

将活化好的上述六种 BOD 传感膜分别放入一系列不同浓度的 GGA 溶液, 考察不同淡水耗氧菌 BOD 传感膜对不同浓度的 GGA 溶液荧光响应时间和线性范围等响应行为。图

3 和图 4 分别为枯草芽孢杆菌 BOD 传感膜的荧光响应, 相对应的一阶导数曲线以及一阶导数曲线峰值和 BOD 浓度的线性关系。

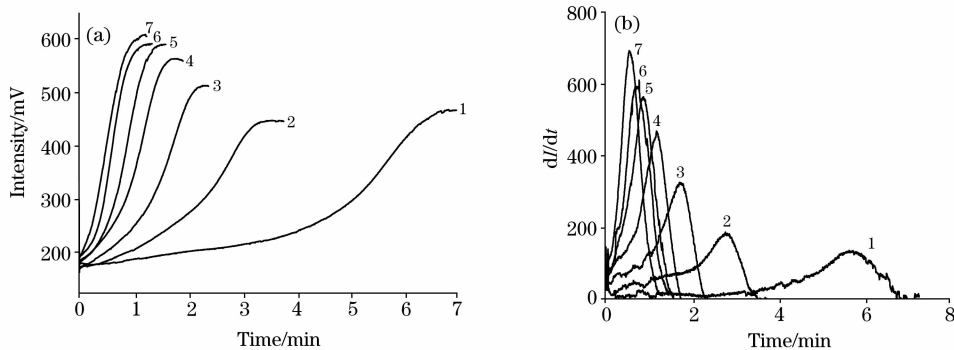


Fig. 3 Fluorescence responses of BOD sensing film immobilizing *Bacillus subtilis* (a) and dI/dt curve (b)

Concentration of GGA(mg · L⁻¹): 1, 0; 2, 20; 3, 40; 4, 60; 5, 80; 6, 100; 7, 120

由图 3(a)和(b)可以看出, GGA 溶液浓度从 20 上升到 40 mg · L⁻¹, 枯草芽孢杆菌 BOD 传感膜对 GGA 溶液的响应时间由 2.82 min 缩短为 1.77 min, dI/dt 由 184.2 上升为 324.4, 在 0~120 mg · L⁻¹ 范围内, dI/dt 值和 GGA 浓度的相关系数达到 0.989 1(图 4)。由此可知 dI/dt 随测定液 GGA 的增大而增大, 荧光响应时间随测定液 GGA 的增大而减小,

并且在一定范围内有线性关系。其他淡水耗氧菌 BOD 传感膜响应情况见表 2。

由表 2 可以看出, 与其他四种菌膜相比, 地衣芽孢杆菌膜和恶臭假单孢菌膜的线性范围较小, 对低浓度 GGA 溶液响应时间短, 适合低浓度 BOD 的测定, 如河水和湖水样品。枯草芽孢杆菌膜和混合菌膜线性范围较大, 对高、低浓度

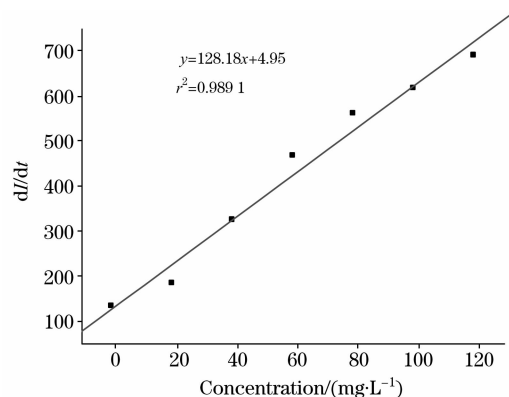


Fig. 4 Relationship between GGA concentration and corresponding dI/dt

GGA 溶液荧光响应时间均较快, 可适用于 BOD 浓度变化较大的样品包括河水、湖水和工业废水等。异常汉逊酵母膜、皮状丝孢酵母膜对低浓度 GGA 溶液响应缓慢, 对高浓度 GGA 溶液荧光响应时间较快, 适合高浓度 BOD 的测定。因此实际应用中, 对不同种类的淡水样品, 可采用不同的淡水

耗氧菌 BOD 传感膜进行测定。

2.4 BOD 传感膜的保存及工作寿命

在温度为 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 7.0, BOD 为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 条件下, 对五种淡水耗氧菌以及它们的混合菌 BOD 传感膜进行连续考察。固定在玻片的五种淡水耗氧菌以及它们的混合菌 BOD 传感膜连续使用 30 d 后仍保持着初始大小的响应信号, 这是由于溶胶-凝胶与 PVA 组成的改性材料将淡水菌株牢固包埋在传感膜中, 避免了传感膜中微生物的泄漏, 使得五种淡水耗氧菌以及它们的混合菌 BOD 传感膜具有良好的活性和长期稳定性。这些包埋了淡水耗氧菌 BOD 传感膜长期闲置时, 只需置于 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GGA 溶液中 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存即可。实验结果表明, 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下淡水耗氧菌膜, 保存 6 个月测试仍保持 95% 活性, 保存 12 月的响应信号仍达到 85%。

2.5 淡水耗氧菌 BOD 传感膜的准确度及实际样品的检测

在温度为 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 7.0, BOD $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 连续 6 次测定包埋不同淡水耗氧菌膜的响应情况, 结果见表 3。结果表明, 虽然包埋恶臭假单孢菌的传感膜的测定精度最差, RSD 值为 7.6%, 但其数值仍小于 BOD₅ 分析所规定的允许误差值 ($\pm 18.5\%$)。

Table 2 Responses of BOD sensing film immobilizing different limnetic microorganism

Microorganism	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pichia anomala</i>	<i>Trichosporon cutaneum</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	Mixed microorganisms
Response time/min	5.5~1.3	6.3~0.7	8.7~1.2	8.6~0.5	6.1~1.5	5.8~1.0
Linearity range/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0~60	0~120	0~80	0~120	0~60	0~100
Linearity coefficient(r^2)	0.992 2	0.989 1	0.976 3	0.981 2	0.997 3	0.983 6

Table 3 Reproducibility of BOD sensing film immobilizing different limnetic microorganism

Microorganism	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pichia anomala</i>	<i>Trichosporon cutaneum</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	Mixed microorganisms
RSD/%	5.3	2.7	6.4	3.1	7.6	5.8

Table 4 Recovery for real samples employing the BOD sensing immobilizing mixed limnetic microorganisms

BOD value /($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Added /($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Obtained /($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Recovery/%
2.24	2.50	4.53	91.6
	5.00	6.85	92.2
	7.50	9.98	103.2
	10.00	12.79	105.5

采集厦门大学的芙蓉湖水样, 用包埋混合菌 BOD 传感膜获得其加标回收率, 结果见表 4。水样的回收率测定结果均在 90%~106% 之间, 表明淡水耗氧菌 BOD 微生物传感器

具有较好的准确度。

3 结 论

用溶胶-凝胶与 PVA 组成的有机改性材料分别包埋五种淡水耗氧菌株以及它们的混合菌, 制备了用于淡水测定的五种淡水耗氧菌及其他混合菌种的 BOD 微生物传感膜。考察结果发现它们对不同浓度的 BOD 具有良好线性响应, 较好的重现性和准确度, 响应速度快, 使用寿命长。通过进一步选择不同种类的耗氧菌种, 将进一步扩大 BOD 微生物传感器的应用范围。

参 考 文 献

- [1] ZHAO Li, XIAO Lai-long, LIN Ling, et al(赵 丽, 肖来龙, 林 玲, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(12): 2039.
- [2] Yang Z, Sasaki S, Karube I. Analytica Chimica Acta, 1997, 357: 4.
- [3] LIN Ling, DAI Yuan-jing, XIAO Lai-long, et al(林 玲, 戴媛静, 肖来龙, 等). Ocean Technology(海洋技术), 2004, 23: 53.
- [4] Jianbo J, Mingyu T, Xu Ch, et al. Biosensors & Bioelectronics, 2003, 18: 1023.
- [5] Ngayan K, Shaojun D, Waihung L, et al. Sensors and Actuators B, 2005, 110: 289.
- [6] Gabjoo Ch, Yoko N, Isao K. Analytica Chimica Acta, 1999, 379: 185.
- [7] LI Hua-zi, SHI Han-chang, WANG Jian-long, et al(李花子, 施汉昌, 王建龙, 等). Chinese High Technology Letters(高技术通讯), 2002, 7: 93.
- [8] Liu J, Bjornsson L, Mattiasson B. Biosensors & Bioelectronics, 2000, 14: 883.

Study on the Fluorescence Characteristics of BOD Sensing Films Immobilizing Different Limnetic Microorganism

GUO Guang-mei^{1,3}, XIN Ling-ling³, WANG Xu-dong³, ZHAO Yun³, CHEN Xi^{2, 3*}

1. College of Sciences, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China

2. State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China

3. Key Laboratory of Analytical Sciences of MOE and Department of Chemistry, Xiamen University, Xiamen 361005, China

Abstract Taking tetramethoxysilane (TMOS) and dimethyldimethoxysilane (DiMe-DMOS) as precursors for the synthesis of an organically-modified silicates (ORMOSILs), optical BOD sensing films immobilizing five kinds of limnetic microorganisms were composed by poly(vinyl alcohol) ormosils matrix. Their fluorescence characteristics were studied with a home-made optical BOD apparatus. According to the experimental results, linearity between BOD and the corresponding fluorescence intensity ranging from 0-60 mg · L⁻¹ to 0-120 mg · L⁻¹ could be obtained on the sensing films immobilizing limnetic microorganisms and their mixture. In addition, the linearity coefficient was from 0.976 to 0.997, and the respond time was 0.5 to 8.7 min. In the experiment, effects of the measurement condition such as temperature and pH on the fluorescent responses of BOD sensing films were investigated. These sensing films presented excellent reproducibility and stability since they could be continuously employed for 30 days, and kept 85% of their original activity when stored for 12 months at 4 °C. The approved approach could be applied in the BOD determination of real limnetic samples according to the obtained results.

Keywords BOD; Biochemical sensor; Fluorescence; Limnetic microorganisms

(Received May 8, 2007; accepted Aug. 16, 2007)

* Corresponding author