

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 27/327

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02116457.6

[43] 公开日 2002 年 10 月 2 日

[11] 公开号 CN 1372137A

[22] 申请日 2002.4.5 [21] 申请号 02116457.6

[71] 申请人 中国科学院长春应用化学研究所

地址 130022 吉林省长春市人民大街 159 号

[72] 发明人 董绍俊 郑建波 王炳全

齐力 唐明宇

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图页数 0 页

[54] 发明名称 用于生物化学需氧量生物传感器的微生物有机-无机杂化材料膜

[57] 摘要

本发明属于用于生物化学需氧量生物传感器的微生物有机-无机杂化材料膜。选择无机材料正甲氧基硅烷或正乙氧基硅烷水解制得的溶胶-凝胶与含微生物的聚乙烯醇接枝 4-乙烯基吡啶水溶液混合,混匀后滴涂于载玻片表面,晾干,得到含微生物均匀的有机-无机杂化材料膜,将该膜置于氧电极的透氧膜上即制得 BOD 微生物传感器,这样制备出的微生物传感器响应时间为 3-20 分钟,线性范围为 1-60mg L⁻¹;连续工作稳定性保持 4 周以上。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

知识产权出版社出版

权 利 要 求 书

1. 一类用于生物化学需氧量生物传感器的微生物有机-无机杂化材料膜的制备方法, 其特征在于选择无机材料正乙氧基硅烷或正甲氧基硅烷溶于甲醇或乙醇, 再加入 0.1 mol L^{-1} 盐酸作催化剂, 加入水, 其体积比为: 硅烷: 甲醇或乙醇: 盐酸: 水 = 1:0.5-0.7:0.125-0.25:4-6, 混匀, 超声振荡, 得溶胶 A; 选择接枝度为 10-15% 聚乙烯醇接枝 4-乙烯基吡啶配成浓度为 8-12% 的水溶液, 向此溶液中加入微生物, 具体为皮状丝孢酵母、枯草芽孢杆菌、异常汉逊酵母、拟内孢霉、热带假丝酵母、掷孢酵母中的一种或两种的混合, 加入水, 其质量比为: 接枝共聚物: 微生物: 水 = 1:1.4-2:3-5.5, 混匀, 得溶液 B; 然后将溶胶 A 与溶液 B 按 1:2-3 的比例混匀, 用取样器移取 80-120 μL 该混合液滴涂到载玻片表面, $2-6^{\circ}\text{C}$ 下放置 40-72 小时, 形成厚度为 10-30 μm 的膜, 即制得用于生物化学需氧量检测的微生物有机-无机杂化材料膜。

2. 如权利要求 1 所述的用于生物化学需氧量生物传感器的微生物有机-无机杂化材料膜, 其特征在于无机材料为正乙氧基硅烷。

3. 如权利要求 1 所述的用于生物化学需氧量生物传感器的微生物有机-无机杂化材料膜, 其特征在于无机材料为正甲氧基硅烷。

4. 如权利要求 1 所述的用于生物化学需氧量生物传感器的微生物有机-无机杂化材料膜, 其特征在于有机材料为接枝度为 10-15% 聚乙烯醇接枝 4-乙烯基吡啶。

5. 如权利要求 1 所述的用于生物化学需氧量生物传感器的微生物有机-无机杂化材料膜, 其特征在于微生物为皮状丝孢酵母、枯草芽孢杆菌、异常汉逊酵母、拟内孢霉、热带假丝酵母、掷孢酵母中的一种或两种的混合。

说 明 书

用于生物化学需氧量生物传感器的 微生物有机-无机杂化材料膜

技术领域：本发明属于用于生物化学需氧量生物传感器的微生物有机-无机杂化材料膜。

背景技术：生物化学需氧量(BOD)是天然水、用水和废水的经常必测的水质指标之一。但现行的 BOD₅法存在许多不足之处，如时间长、工作量大、操作繁琐、受干扰因素多、重复性差而不能及时反映水质变化，近年来陆续出现了一些新的测定方法如自动测定法，快速测定法和利用微生物膜传感器技术的BOD测定法等，其中以微生物膜传感器技术的BOD测定法发展最为迅速。该技术将微生物膜固定在氧电极的透氧膜上，利用所固定的微生物呼吸活性的变化测定 BOD 值，已被日本工业标准协会 (Japanese Industrial Standard Committee)采用为标准方法。但这一技术的核心问题即生物膜的制备和菌种的选择以及两者的匹配尚未得到很好的解决，从而限制了这一技术的推广和应用。近年来发展的溶胶-凝胶衍生的玻璃材料已发展成适合于固定生物分子的一类新型材料，这一类无机材料具有物理刚性、化学惰性、高的光、热稳定性及可忽略的溶胀性而特别适合于构建生物传感器；另一方面接枝共聚物所含有的大量羟基有助于为固定化的生物分子提供生物相容性的微环境，故以接枝共聚物为基的生物传感器有高的灵敏度和很好的生物相容性。将两种材料结合起来而制备新型有机-无机杂化材料固定化膜，其生物相容性好，而且能防止溶胶-凝胶成膜时的开裂问题和接枝共聚物成膜时的溶

胀性。

采用有机-无机杂化材料，通过对前驱体改良，可在较温和的实验条件和较简单的程序下包埋微生物，并使前驱体不含对生物有毒性的单体。通过选择适当链长的前驱体可控制凝胶的孔径，而凝胶的物理化学特性可以在合成前驱体的过程中控制。这样包埋在凝胶中的微生物量易于控制，其贮存和工作稳定性都较以往吸附法高。

发明内容：本发明的目的是提供一种用于生物化学需氧量生物传感器的微生物有机-无机杂化材料膜的制备方法。

本发明采用有机-无机杂化材料包埋微生物，把正乙氧基硅烷或正甲氧基硅烷的溶胶-凝胶和聚乙烯醇接枝 4-乙烯基吡啶相混合时，可形成互穿网络，使微生物牢固的固定在杂化材料膜中。

本发明选择无机材料正乙氧基硅烷或正甲氧基硅烷溶于甲醇或乙醇，再加入 0.1 mol L^{-1} 盐酸作催化剂，加入水，其体积比为：硅烷：甲醇或乙醇：盐酸：水=1:0.5-0.7:0.125-0.25:4-6，混匀，超声振荡，得溶胶 A；选择接枝度为 10-15%聚乙烯醇接枝 4-乙烯基吡啶配成浓度为 8-12%的水溶液，向此溶液中加入微生物，具体为皮状丝孢酵母、枯草芽孢杆菌、异常汉逊酵母、拟内孢霉、热带假丝酵母、掷孢酵母中的一种或两种的混合，加入水，其质量比为：接枝共聚物：微生物：水 = 1:1.4-2:3-5.5，混匀，得溶液 B；然后将溶胶 A 与溶液 B 按 1:2-3 的比例混匀，用取样器移取 80-120 μL 该混合液滴涂到载玻片表面， $2-6^{\circ}\text{C}$ 下放置 40-72 小时，形成厚度为 10-30 μm 的膜，即制得用于生物化学需氧量检测的微生物有机-无机杂化材料膜，将该微生物膜固定在氧电极表面即构成 BOD 生物传感器。该传感器用于 BOD 的实时检测，响应时间为 3-20 分钟，线性范围为 1-60 mg L^{-1} ；连续工作稳定性保持 4 周

以上。该杂化材料膜的性质优于单独使用每一种材料的性质，所制备的微生物膜易保存，性能稳定，微生物膜在 2-6°C 下保存 4 个月经活化后仍能用于 BOD 的检测。用该传感器测定生活污水、湖水及合成污水等，所得结果与用标准稀释法的结果一致。这种微生物传感器制备与操作简便，检测速度快，灵敏度高，适用范围广，成本低，易保存，性能稳定，简化了传统的测定分析，具有很好的实用意义。

具体实施方式如下：

实施例 1. 皮状丝孢酵母有机-无机杂化材料膜

将 40 μL 正甲氧基硅烷溶于 20 μL 的甲醇中，加入 200 μL 水和 5 μL 0.1 mol L⁻¹ 盐酸混合溶液，混匀，超声振荡 1 小时后，得溶胶 A；另将接枝度为 10 %聚乙烯醇接枝 4-乙烯基吡啶配成浓度为 8%的水溶液，向 150 μL 此溶液中加入 30 毫克的皮状丝孢酵母和 80 μL 水，混匀，得溶液 B；然后将溶胶 A 与溶液 B 按 1:2 的比例混匀，用取样器移取 80 μL 该混合液滴涂到载玻片表面，2°C 下放置约 48 小时，即得到厚度为 10 μm 的皮状丝孢酵母有机-无机杂化材料膜，用于 BOD 的检测时，对 BOD 为 5 mg L⁻¹ 溶液的响应时间为 3 min；对 BOD 为 60 mg L⁻¹ 溶液的响应时间为 15 min，线性范围为 5—60 mg L⁻¹。该传感器连续工作稳定性保持 4 个周以上，6°C 下保存 4 个月经活化后仍能用于 BOD 的检测。

实施例 2: 异常汉逊酵母有机-无机杂化材料膜

将 60 μL 正乙氧基硅烷溶于 30 μL 乙醇中，加入 15 μL 0.1 mol L⁻¹ 盐酸和 300 μL 水，混匀，超声振荡 1 小时后，得溶胶 A；另将接枝度为 15 %聚乙烯醇接枝 4-乙烯基吡啶配成浓度为 10%的水溶液，向 300 μL 此溶液中加入 50 毫克的异常汉逊酵母和 120 μL 水，混匀，得溶液 B；然后将溶胶 A 与溶液 B 按 1:2.5 的比例混匀，用取样器移取 120 μL 该

混合液滴涂到载玻片表面，6°C 下放置约 40 小时，即得到厚度为 15 μm 的异常汉逊酵母有机-无机杂化材料膜，固定于氧电极上所构造的 BOD 生物传感器对 BOD 为 5 mg L^{-1} 溶液的响应时间为 6 min；对 BOD 为 40 mg L^{-1} 溶液的响应时间为 18 min，线性范围为 5—40 mg L^{-1} 。该生物膜所构造的 BOD 传感器连续工作稳定性保持 4 周以上，4°C 下保存 4 个月经活化后仍能用于 BOD 的检测。

实施例 3：皮状丝孢酵母和枯草芽孢杆菌有机-无机杂化材料膜

将 50 μL 正乙氧基硅烷溶于 30 μL 乙醇中，加入 10 μL 0.1 mol L^{-1} 盐酸和 250 μL 水溶液，混匀，超声振荡 1 小时后，得溶胶 A；另取 250 μL 浓度为 10%、接枝度为 12.5 %聚乙烯醇接枝 4-乙烯基吡啶，向此溶液中加入 80 μL 水及皮状丝孢酵母和枯草芽孢杆菌各 20 毫克，混匀，得溶液 B；然后将溶胶 A 与溶液 B 按 1:3 的比例混匀，用取样器移取 100 μL 该混合液滴涂于载玻片表面，4°C 下放置约 48 小时，即得到厚度为 15 μm 的皮状丝孢酵母和枯草芽孢杆菌有机-无机杂化材料膜，该微生物膜所构造的 BOD 生物传感器，对 BOD 为 2 mg L^{-1} 溶液的响应时间为 3 min；对 BOD 为 20 mg L^{-1} 溶液的响应时间为 8 min；对 BOD 为 60 mg L^{-1} 溶液的响应时间为 15 min，线性范围为 1—60 mg L^{-1} 。该生物膜所构造的 BOD 传感器连续工作稳定性保持 4 周以上，4°C 下保存 4 个月经活化后仍能用于 BOD 的检测。

实施例 4：拟内孢霉和皮状丝孢酵母有机-无机杂化材料膜

将 60 μL 正甲氧基硅烷溶于 40 μL 乙醇中，加入 15 μL 0.1 mol L^{-1} 盐酸和 280 μL 水溶液，混匀，超声振荡 1 小时后，得溶胶 A；另取 280 μL 浓度为 12%、接枝度为 12.5 %聚乙烯醇接枝 4-乙烯基吡啶，向此溶液中加入 80 μL 水及拟内孢霉和皮状丝孢酵母各 25 毫克，混匀，得溶

液 B；然后将溶胶 A 与溶液 B 按 1:3 的比例混匀，用取样器移取 120 μL 该混合液滴涂于载玻片表面，3 $^{\circ}\text{C}$ 下放置约 72 小时，即得到厚度为 30 μm 的拟内孢霉和皮状丝孢酵母有机-无机杂化材料膜，该微生物膜传感器对 BOD 为 2 mg L^{-1} 溶液的响应时间为 5 min；对 BOD 为 20 mg L^{-1} 溶液的响应时间为 12 min；对 BOD 为 60 mg L^{-1} 溶液的响应时间为 20 min，线性范围为 5—60 mg L^{-1} 。该生物膜所构造的 BOD 传感器连续工作稳定性保持 4 周以上，5 $^{\circ}\text{C}$ 下保存 4 个月经活化后仍能用于 BOD 的检测。

实施例 5：热带假丝酵母和掷孢酵母有机-无机杂化材料膜

将 45 μL 正乙氧基硅烷溶于 25 μL 甲醇中，加入 10 μL 0.1 mol L^{-1} 盐酸和 200 μL 水溶液，混匀，超声振荡 1 小时后，得溶胶 A；另取 220 μL 浓度为 11%、接枝度为 12.5 %聚乙烯醇接枝 4-乙烯基吡啶，向此溶液中加入 80 μL 水及热带假丝酵母和掷孢酵母各 18 毫克，混匀，得溶液 B；然后将溶胶 A 与溶液 B 按 1:2.8 的比例混匀，用取样器移取 100 μL 该混合液滴涂于载玻片表面，6 $^{\circ}\text{C}$ 下放置约 56 小时，即得到厚度为 25 μm 的热带假丝酵母和掷孢酵母有机-无机杂化材料膜，该微生物膜 BOD 生物传感器对 BOD 为 5 mg L^{-1} 溶液的响应时间为 4 min；对 BOD 为 20 mg L^{-1} 溶液的响应时间为 10 min；对 BOD 为 50 mg L^{-1} 溶液的响应时间为 18 min，线性范围为 5—50 mg L^{-1} 。该生物膜所构造的 BOD 传感器连续工作稳定性保持 4 周以上，2 $^{\circ}\text{C}$ 下保存 4 个月经活化后仍能用于 BOD 的检测。