



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101718736 A

(43) 申请公布日 2010.06.02

(21) 申请号 200910217825.8

(22) 申请日 2009.11.06

(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 5625  
号

(72) 发明人 董绍俊 刘玲

(74) 专利代理机构 长春科宇专利代理有限责任  
公司 22001

代理人 马守忠

(51) Int. Cl.

G01N 27/26(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页

### (54) 发明名称

在溶液体系中不除氧条件下的人工媒介体测定生物化学需氧量的方法

### (57) 摘要

本发明公开了在溶液体系中不除氧条件下的人工媒介体测定生物化学需氧量的方法。在测量过程中采用所有的单一微生物或混合微生物均可。人工媒介体采用铁氰化钾。检测方式为电化学测量,测量采用电极材料为铂。可检测的水样的浓度为 0.5 ~ 400mg/L BOD<sub>5</sub>值,最适宜的检测浓度为 5 ~ 100mg/L BOD<sub>5</sub>值。本法在测量过程中不需要附加除氧装置和平衡氧气装置。

1. 在溶液体系中不除氧条件下的人工媒介体测定生物化学需氧量的方法,其步骤和条件如下:

将菌悬液、人工媒介体溶液和待测水样混合,在温度为 30 ~ 35°C 范围内保持恒温,保持恒温时间为 30min ~ 4h,离心终止反应,并取上清液进行电化学测量;测量用电极材料为铂;

所述的菌悬液为微生物经培养后,再经离心清洗后悬浮于缓冲溶液中得到的悬液;所述的微生物为所有的单一微生物或混合微生物;缓冲溶液是由 pH 值为 7 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  和  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  溶液组成的磷酸盐缓冲溶液;

所述的人工媒介体为人工媒介体化合物铁氰化钾,人工媒介体溶于缓冲溶液得到人工媒介体溶液;缓冲溶液是由 pH 值为 7 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  和  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  溶液组成的磷酸盐缓冲溶液;

所述的菌悬液、人工媒介体溶液和待测水样混合液中,菌悬液终浓度为  $2 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$  个 /ml,人工媒介体终浓度为 11 ~ 55mM,待测水样终浓度为 0.5 ~ 400mg/L  $\text{BOD}_5$  值;所述的终浓度定义为菌悬液、人工媒介体溶液和待测水样混合液中微生物、人工媒介体化合物、待测水样各自相对于总体积的浓度。

2. 如权利要求所述的在溶液体系中不除氧条件下的人工媒介体测定生物化学需氧量的方法,其特征在于,所述的电待测水样终浓度为 5 ~ 100mg/L 的  $\text{BOD}_5$  值。

## 在溶液体系中不除氧条件下的人工媒介体测定生物化学需氧量的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于在溶液体系中不除氧条件下的人工媒介体测定生物化学需氧量的方法。

### 背景技术

[0002] 生物化学需氧量 (biochemical oxygen demand, BOD) 作为水环境监测的重要指标,长期以来一直以传统的 5 日法为标准,但其操作繁琐、耗时,还需要熟练的技术,且不能及时反映水质变化(参见:Liu et al., Biosens. Bioelectron., Vol. 20, 562(2004))。近年来,BOD 的快速测量方法被大力发展起来,这些方法都是基于微生物同化有机物反应的同时将电子传递给氧气的原理。但是,由于氧气在水中的溶解度有限,对于高浓度的有机物样品需要经过稀释才能测量,从而大大降低了结果的准确性。另一方面,由于氧气受温度、气压影响而变化很大,这会引入测量结果的波动,基于检测氧消耗的传感器大多需要附加一个氧气(空气)平衡装置(参见 Lei et al., Anal. Chim. Acta, Vol. 568, 200(2006); Du et al., Biotechnol. Adv., Vol. 25, 464(2007))。

[0003] 近年,一种利用人工媒介体的快速 BOD 测量方法被发展起来。由于人工媒介体和氧气在生物催化反应的过程中存在竞争,因此,人工媒介体快速 BOD 测量方法一直在去除溶解氧的条件下进行(参见:Catterall et al., Talanta, Vol. 55, 1187(2001); Nakamura et al., Talanta, Vol. 72, 210(2007))。这里产生了一个新的问题,将一个附带的除氧装置用于实际的废水测量(如污水处理厂,江河湖泊等)是十分不方便的。这使人工媒介体快速 BOD 测量方法的应用基本上被限制在实验室阶段。

### 发明内容

[0004] 为了解决已有技术存在的问题,本发明提供了在溶液体系中不除氧条件下的人工媒介体测定生物化学需氧量的方法。

[0005] 在溶液体系中不除氧条件下的人工媒介体测定生物化学需氧量的方法,其步骤和条件如下:

[0006] 将菌悬液、人工媒介体溶液和待测水样混合,在温度为 30 ~ 35℃ 范围内保持恒温,以维持微生物的催化活性,保持恒温时间为 30min ~ 4h,离心终止反应,并取上清液进行电化学测量;测量用电极材料为铂;

[0007] 所述的菌悬液为微生物经培养后,再经离心清洗后悬浮于缓冲溶液中得到的悬液;所述的微生物为所有的单一微生物或混合微生物;缓冲溶液是由 pH 值为 7 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  和  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  溶液组成的磷酸盐缓冲溶液;

[0008] 所述的人工媒介体为人工媒介体化合物铁氰化钾,人工媒介体溶于缓冲溶液得到人工媒介体溶液;缓冲溶液是由 pH 值为 7 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  和  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  溶液组成的磷酸盐缓冲溶液;

[0009] 所述的菌悬液、人工媒介体溶液和待测水样混合液中,菌悬液终浓度为  $2 \times 10^9 \sim$

$1 \times 10^{10}$  个 /ml, 人工媒介体终浓度为 11 ~ 55mM, 待测水样浓度为 0.5 ~ 400mg/L BOD<sub>5</sub> 值, 最适宜检测的待测水样浓度为 5 ~ 100mg/L BOD<sub>5</sub> 值; 所述的终浓度定义为菌悬液、人工媒介体溶液和待测水样混合液中微生物、人工媒介体化合物、待测水样各自相对于总体积的浓度。

[0010] 有益效果: 在溶液体系中不除氧条件下的人工媒介体测定生物化学需氧量的方法, 在操作过程中不需要任何附加除氧或者氧气平衡装置, 实用性强并大大降低了成本。本方法中用到的人工媒介体化合物的浓度适应性强, 比传统 5 日法的检测对象 O<sub>2</sub> 在水中的溶解度高出 1 ~ 2 个数量级。用本方法测量生物化学需氧量的结果与标准 5 日法测量的结果误差在 ±15% 以内, 测量结果满意。

[0011] 具体实施例方式

[0012] 实施例 1

[0013] 将菌悬液、人工媒介体溶液和待测水样混合, 温度为 35℃ 保持恒温, 保温时间为 1h, 保温后离心终止反应, 离心速度为 8000 转 / 分钟, 并取上清液进行电化学测量, 测量用电极材料为铂。

[0014] 所述的菌悬液为微生物经培养后, 再经离心清洗后悬浮于缓冲溶液中得到的溶液; 所述的微生物为 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , 培养用 LB 培养基, 配方为胰化蛋白胨 10g, 酵母提取物 5g, 氯化钠 10g, 培养 12 小时; 缓冲溶液是由 pH 值为 7 的 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液组成的磷酸盐缓冲溶液。

[0015] 所述的人工媒介体为人工媒介体化合物铁氰化钾, 人工媒介体溶于缓冲溶液得到人工媒介体溶液, 缓冲溶液是由 pH 值为 7 的 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液组成的磷酸盐缓冲溶液。

[0016] 所述的待测水样为葡萄糖溶液。

[0017] 所述的菌悬液、人工媒介体溶液和待测水样混合液中, 菌悬液终浓度为  $1 \times 10^{10}$  个 /ml, 人工媒介体终浓度为 55mM, 待测水样的终浓度为 BOD<sub>5</sub> 值是 5mg/L、15mg/L、50mg/L 和 100mg/L, 所述的终浓度定义为菌悬液、人工媒介体溶液和待测水样混合液中微生物、人工媒介体化合物、待测水样各自相对于总体积的浓度。

[0018] 测量结果: 线性方程为  $y = 1.17 + 0.079x$ , 相对标准偏差  $R = 0.9995$ , 其中  $y$  为电化学测量值,  $x$  为生物化学需氧量理论值。

[0019] 实施例 2

[0020] 将菌悬液、人工媒介体溶液和待测水样混合, 温度为 30℃ 保持恒温, 保温时间为 50min, 保温后离心终止反应, 离心速度为 8000 转 / 分钟, 并取上清液进行电化学测量, 测量用电极材料为铂。

[0021] 所述的菌悬液为微生物经培养后, 再经离心清洗后悬浮于缓冲溶液中得到的溶液。所述的微生物为吉林省长春市第二污水处理厂生化池微生物, 培养用 CASO 肉汤培养基, 培养 12 小时; 所述的 CASO 肉汤培养基订购于 Fluka 公司, 编号为 Chemie GmbH CH-9471Buchs; 缓冲溶液为由 pH 值 7 的 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液组成的磷酸盐缓冲溶液。

[0022] 所述的人工媒介体为人工媒介体化合物铁氰化钾, 人工媒介体溶于缓冲溶液得到人工媒介体溶液, 缓冲溶液是由 pH 值为 7 的 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液组成的磷酸盐缓冲溶液。

[0023] 所述的待测水样为葡萄糖 - 谷氨酸标准溶液。

[0024] 所述的菌悬液、人工媒介体溶液和待测水样混合液中, 菌悬液终浓度为  $5 \times 10^9$  个 /

ml, 人工媒介体终浓度为 55mM, 待测水样的终浓度 BOD<sub>5</sub> 值是 15mg/L、50mg/L、200mg/L, 所述的终浓度定义为菌悬液、人工媒介体溶液和待测水样混合液中微生物、人工媒介体化合物、待测水样各自相对于总体积的浓度。

[0025] 测量结果: 线性方程为  $y = 13.21 + 0.180x$ , 相对标准偏差  $R = 0.9709$ , 其中  $y$  为电化学测量值,  $x$  为生物化学需氧量理论值。

[0026] 实施例 3

[0027] 将菌悬液、人工媒介体溶液和待测水样混合, 温度为 30℃ 保持恒温, 保温时间为 50min, 保温后离心终止反应, 离心速度为 8000 转 / 分钟, 并取上清液进行电化学测量, 测量用电极材料为铂。

[0028] 所述的菌悬液为微生物经培养后, 再经离心清洗后悬浮于缓冲溶液中得到的溶液。所述的微生物为 BOD seed 混合菌, 培养用 CASO 肉汤培养基, 培养 12 小时, 所述的 CASO 肉汤培养基订购于 Fluka 公司, 编号为 Chemie GmbH CH-9471Buchs; 缓冲溶液为由 pH 值 7 的 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液组成的磷酸盐缓冲溶液。

[0029] 所述的人工媒介体为人工媒介体化合物铁氰化钾, 人工媒介体溶于缓冲溶液得到人工媒介体溶液, 缓冲溶液为由 pH 值 7 的 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液组成的磷酸盐缓冲溶液。

[0030] 所述的待测水样为葡萄糖 - 谷氨酸标准溶液。

[0031] 所述的菌悬液、人工媒介体溶液和待测水样混合液中, 菌悬液终浓度为  $5 \times 10^9$ , 人工媒介体终浓度为 55mM, 待测水样的终浓度为 BOD<sub>5</sub> 值是 15mg/L、50mg/L、200mg/L, 所述的终浓度定义为菌悬液、人工媒介体溶液和待测水样混合液中微生物、人工媒介体化合物、待测水样各自相对于总体积的浓度。

[0032] 测量结果: 线性方程为  $y = 5.73 + 0.546x$ , 相对标准偏差  $R = 0.9715$ , 其中  $y$  为电化学测量值,  $x$  为生物化学需氧量理论值。

[0033] 实施例 4

[0034] 将菌悬液、人工媒介体溶液和待测水样混合, 温度为 35℃ 保持恒温, 保温时间为 4h, 保温后离心终止反应, 离心速度为 8000 转, 并取上清液进行电化学测量, 测量用电极材料为铂。

[0035] 所述的菌悬液为微生物经培养后, 再经离心清洗后悬浮于缓冲溶液中得到的溶液。所述的微生物为 Escherichia coli DH5  $\alpha$ , 培养用 LB 培养基, 配方为胰化蛋白胨 10g, 酵母提取物 5g, 氯化钠 10g, 培养 12 小时, 缓冲溶液为由 pH 值 7 的 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液组成的磷酸盐缓冲溶液。

[0036] 所述的人工媒介体为人工媒介体化合物铁氰化钾, 人工媒介体溶于缓冲溶液得到人工媒介体溶液, 缓冲溶液为由 pH 值 7 的 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液组成的磷酸盐缓冲溶液。

[0037] 所述的待测水样为葡萄糖 - 谷氨酸标准溶液。

[0038] 所述的菌悬液、人工媒介体溶液和待测水样混合液中, 菌悬液终浓度为  $1 \times 10^{10}$  个 / ml, 人工媒介体终浓度为 55mM, 待测水样的终浓度为 BOD<sub>5</sub> 值是 50mg/L, 100mg/L, 200mg/L, 300mg/L, 400mg/L, 所述的终浓度定义为菌悬液、人工媒介体溶液和待测水样混合液中微生物、人工媒介体化合物、待测水样各自相对于总体积的浓度。

[0039] 测量结果: 线性方程为  $y = 7.45 + 0.040x$ , 相对标准偏差  $R = 0.9903$ , 其中  $y$  为电化学测量值,  $x$  为生物化学需氧量理论值。

[0040] 实施例 5

[0041] 将菌悬液、人工媒介体溶液和待测水样混合,温度为 35℃ 保持恒温,保温时间为 1h,保温后离心终止反应,离心速度为 8000 转 / 分钟,并取上清液进行电化学测量,测量用电极材料为铂。

[0042] 所述的菌悬液为微生物经培养后,再经离心清洗后悬浮于缓冲溶液中得到的溶液。所述的微生物为 *Escherichia coli* DH5  $\alpha$ , 培养用 LB 培养基,配方为胰化蛋白胨 10g, 酵母提取物 5g, 氯化钠 10g, 培养 12 小时,缓冲溶液为由 pH 值 7 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  和  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  溶液组成的磷酸盐缓冲溶液。

[0043] 所述的人工媒介体为人工媒介体化合物铁氰化钾,人工媒介体溶于缓冲溶液得到人工媒介体溶液,缓冲溶液为由 pH 值 7 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  和  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  溶液组成的磷酸盐缓冲溶液。

[0044] 所述的待测水样为葡萄糖 - 谷氨酸标准溶液。

[0045] 所述的菌悬液、人工媒介体溶液和待测水样混合液中,菌悬液终浓度为  $5 \times 10^9$  个 /ml,人工媒介体终浓度为 27.5mM,待测水样的终浓度为 BOD<sub>5</sub> 值是 2.5mg/L、5mg/L、10mg/L、20mg/L,所述的终浓度定义为菌悬液、人工媒介体溶液和待测水样混合液中微生物、人工媒介体化合物、待测水样各自相对于总体积的浓度。

[0046] 测量结果:线性方程为  $y = 0.74 + 0.027x$ ,相对标准偏差  $R = 0.9772$ ,其中  $y$  为电化学测量值, $x$  为生物化学需氧量理论值。

[0047] 实施例 6

[0048] 将菌悬液、人工媒介体溶液和待测水样混合,温度为 35℃ 保持恒温,保温时间为 1h,保温后离心终止反应,离心速度为 8000 转,并取上清液进行电化学测量,测量用电极材料为铂。

[0049] 所述的菌悬液为微生物经培养后,再经离心清洗后悬浮于缓冲溶液中得到的溶液。所述的微生物为 *Escherichia coli* DH5  $\alpha$ , 培养用 LB 培养基,配方为胰化蛋白胨 10g, 酵母提取物 5g, 氯化钠 10g, 培养 12 小时,缓冲溶液为由 pH 值 7 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  和  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  溶液组成的磷酸盐缓冲溶液。

[0050] 所述的人工媒介体为人工媒介体化合物铁氰化钾,人工媒介体溶于缓冲溶液得到人工媒介体溶液,缓冲溶液为由 pH 值 7 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  和  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  溶液组成的磷酸盐缓冲溶液。

[0051] 所述的待测水样为葡萄糖 - 谷氨酸标准溶液。

[0052] 所述的菌悬液、人工媒介体溶液和待测水样混合液中,菌悬液终浓度为  $2 \times 10^9$  个 /ml,人工媒介体终浓度为 11mM,待测水样的终浓度为 BOD<sub>5</sub> 值是 0.5mg/L、1.5mg/L、2.5mg/L、5mg/L、10mg/L、20mg/L、40mg/L,所述的终浓度定义为菌悬液、人工媒介体溶液和待测水样混合液中微生物、人工媒介体化合物、待测水样各自相对于总体积的浓度。

[0053] 测量结果:线性方程为  $y = 0.03 + 0.608x$ ,相对标准偏差  $R = 0.9650$ ,其中  $y$  为电化学测量值, $x$  为生物化学需氧量理论值。

[0054] 实施例 7

[0055] 将菌悬液、人工媒介体溶液和待测水样混合,温度为 30℃ 保持恒温,保温时间为 1h,保温后离心终止反应,离心速度为 8000 转 / 分钟,并取上清液进行电化学测量,测量用电极材料为铂。

[0056] 所述的菌悬液为微生物经培养后,再经离心清洗后悬浮于缓冲溶液中得到的溶

液。所述的微生物为 *Escherichia coli* DH5  $\alpha$ ，培养用 LB 培养基，配方为胰化蛋白胨 10g，酵母提取物 5g，氯化钠 10g，培养 12 小时，缓冲溶液为由 pH 值 7 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  和  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  溶液组成的磷酸盐缓冲溶液。

[0057] 所述的人工媒介体为人工媒介体化合物铁氰化钾，人工媒介体溶于缓冲溶液得到人工媒介体溶液，缓冲溶液为由 pH 值 7 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  和  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  溶液组成的磷酸盐缓冲溶液。

[0058] 所述的待测水样为吉林省长春市第二污水处理厂初沉池污水和二沉池污水。

[0059] 所述的菌悬液、人工媒介体溶液和待测水样混合液中，菌悬液终浓度为  $1 \times 10^{10}$  个/ml，人工媒介体终浓度为 55mM，所述的待测水样为未知浓度的废水无需经过稀释，所述的终浓度定义为菌悬液、人工媒介体溶液和待测水样混合液中微生物、人工媒介体化合物、待测水样各自相对于总体积的浓度。

[0060] 测量结果：初沉池样品本方法测量值为 25.6mg/L  $\text{BOD}_5$  值，标准 5 日法测量结果为 25mg/L。二沉池样品本方法测量值为 7.2mg/L  $\text{BOD}_5$  值，标准 5 日法测量结果为 4.2mg/L。