



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102115775 A

(43) 申请公布日 2011. 07. 06

(21) 申请号 201010519033. 9

(22) 申请日 2010. 10. 26

(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 刘长宇 董绍俊 郑建波 余登斌  
刘玲 马超

(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 宋天平

(51) Int. Cl.  
C12Q 1/02 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种用于生物传感器测定生化需氧量的包埋 BODseed 的有机-无机杂化材料膜及制法

(57) 摘要

本发明提供一种用于生物传感器测定生化需氧量的包埋 BODseed 的有机-无机杂化材料膜, 其是正硅酸乙酯的溶胶-凝胶和聚乙烯醇接枝 4-乙炔基吡啶相混合时形成的互穿网络材料。其能牢固的固定 BODseed 混合菌, 用于快速 BOD 的检测。聚乙烯醇支链上的羟基与溶胶凝胶网络中的硅共价连接, 防止了含微生物的生物膜的开裂, 保证了生物传感器的重现性和稳定性; 聚乙烯醇接枝 4-乙炔基吡啶可以通过氢键等稳定微生物, 保持微生物的长期活性。采用这种材料包埋 BODseed 制备生物传感器, 连续使用 50 天信号响应未见衰减。测试葡萄糖谷氨酸标准溶液及不同种类的单一有机物, BODseed 生物膜对不同种类的有机物具有相似的降解效率。

1. 一种用于生物传感器测定生化需氧量的包埋 BODseed 的有机 - 无机杂化材料膜, 其特征在于, 所述的材料膜是正硅酸乙酯的溶胶 - 凝胶和聚乙烯醇接枝 4- 乙烯基吡啶相混合时形成的互穿网络材料; 该材料膜是有下述方法制备的:

(1) 将接枝度为 5-30% 的聚乙烯醇接枝 4- 乙烯基吡啶配成质量浓度为 2-5% 的水溶液 A;

(2) 将 BODseed 扩大培养后离心分离, 加入磷酸盐缓冲溶液中, 得到菌浓度为 1-6 毫克 / 毫升的悬浮液 B;

(3) 把无机材料正硅酸己酯溶于甲醇或乙醇, 加入浓度为  $0.1\text{molL}^{-1}$  盐酸作催化剂, 再加入水混匀, 超声振荡 1 小时后, 得溶胶 C; 正硅酸己酯、甲醇或乙醇、浓度为  $0.1\text{mol L}^{-1}$  盐酸和水的体积比为 20-60 : 5-20 : 2-5 : 50-300;

(4) 然后将溶液 A、悬浮液 B 与溶胶 C, 按质量比 1 : 0.2-0.5 : 0.2-1 混匀; 用取样器移取该混合液滴涂到微孔透气膜表面,  $2-6^{\circ}\text{C}$  下放置 12 小时, 得到一种用于生物传感器测定生化需氧量的微生物有机 - 无机杂化材料膜。

2. 一种用于生物传感器测定生化需氧量的包埋 BODseed 的有机 - 无机杂化材料膜, 其特征在于, 所述的材料膜的膜厚度为  $5-10\ \mu\text{m}$ 。

## 一种用于生物传感器测定生化需氧量的包埋 BODseed 的有机 - 无机杂化材料膜及制法

### 技术领域

[0001] 本发明属于采用溶胶 - 凝胶包埋 BODseed 制备有机 - 无机杂化材料膜,用于水质生化需氧量的快速检测。

### 背景技术

[0002] 生化需氧量 (BOD) 是检测环境污染的重要指标之一。传统的 BOD<sub>5</sub> 测定方法,耗时 5 日,并对操作人员的要求较高,测定结果往往偏差也较大。近些年来发展起来的生物传感器方法逐渐得到重视。生物传感器方法是指将含有微生物的生物膜固定在氧电极表面,当水样中的氧气在通过生物膜到达氧电极的同时部分被微生物呼吸作用所利用,根据剩余氧气含量建立氧气消耗量与水样有机物线性关系的一种快速测定方法。

[0003] 生物膜是生物传感器方法检测 BOD 的核心,而构成生物膜的微生物和固定化材料是决定生物膜性能的关键。一般来说,采用单一微生物制备的生物膜,具有较好的长期稳定性,但因菌种单一,适用性较差,测试不同类型的水体表现出的差异化巨大。而混合微生物具有广谱的有机物源,对环境适应能力更强,测试更灵敏,准确,对不同水体具有良好的信号响应 (Liu and Mattiasson, Water Research, 36, 2002, 3786), 因此,近年来采用混合微生物作为受试体用于快速 BOD 的研究越来越多。

[0004] 文献报道的采用混合微生物作为受试体用于快速 BOD 的研究,集中于对活性污泥的研究。BODseed 是一种商品化的微生物源,含有 7 种从活性污泥中分离出来的高效微生物,最初作为 BOD<sub>5</sub> 测试中接种的微生物使用。随后的研究中,BODseed 也被作为受试微生物制备生物膜用于快速 BOD 测试中,因其菌种组成的多样性,在测试不同类型污水 BOD 时表现出了与 BOD<sub>5</sub> 较高的相关性 (Tan and Lim, Sensors and Actuators B, 107, 2005, 546)。

[0005] 采用物理夹层法包埋微生物的固定方法简单方便,但因包埋的微生物容易泄漏导致其稳定性差。文献报道采用聚四氟乙烯夹层包埋活性污泥用于 BOD 的测量,传感器建立第二日信号较首日已经降低 80%,无法实现实际应用 (Liu et al., Biosens. Bioelectro 14, 2000, 883)。然而,绝大多数包埋混合菌的研究都局限于物理夹层方法,还未见其他科研小组采用化学包埋方法固定混合菌的报道。

### 发明内容

[0006] 为了解决已有技术存在的问题,本发明的目的之一是提供一种用于生物传感器测定生化需氧量的包埋 BODseed 的有机 - 无机杂化材料膜,所述的材料膜是正硅酸乙酯的溶胶 - 凝胶和聚乙烯醇接枝 4- 乙烯基吡啶相混合时形成的互穿网络材料。该互穿网络材料能牢固的固定 BODseed 混合菌,用于快速 BOD 的检测。

[0007] 本发明的目的之二是提供一种用于生物传感器测定生化需氧量的包埋 BODseed 的有机 - 无机杂化材料膜的制法,其步骤如下:

[0008] (1) 将接枝度为 5-30% 的聚乙烯醇接枝 4- 乙烯基吡啶配成质量浓度为 2-5% 的水

溶液 A；

[0009] (2) 将 BODseed 扩大培养后离心分离,加入磷酸盐缓冲溶液中,得到菌浓度为 1-6 毫克 / 毫升的悬浮液 B；

[0010] (3) 把无机材料正硅酸己酯溶于甲醇或乙醇,加入浓度为  $0.1\text{molL}^{-1}$  盐酸作催化剂,再加入水混匀,超声振荡 1 小时后,得溶胶 C；正硅酸己酯、甲醇或乙醇、浓度为  $0.1\text{molL}^{-1}$  盐酸和水的体积比为 20-60 : 5-20 : 2-5 : 50-300；

[0011] (4) 然后将溶液 A、悬浮液 B 与溶胶 C,按质量比 1 : 0.2-0.5 : 0.2-1 混匀；用取样器移取该混合液滴涂到微孔透气膜表面,2-6℃下放置 12 小时,得到一种用于生物传感器测定生化需氧量的微生物有机-无机杂化材料膜。该材料膜厚度为 5-10  $\mu\text{m}$

[0012] 有益效果：本发明提供一种用于生物传感器测定生化需氧量的包埋 BODseed 的有机-无机杂化材料膜,所述的材料膜是正硅酸乙酯的溶胶-凝胶和聚乙烯醇接枝 4- 乙烯基吡啶相混合时形成的互穿网络材料。该互穿网络材料能牢固的固定 BODseed 混合菌,用于快速 BOD 的检测。聚乙烯醇支链上的羟基与溶胶凝胶网络中的硅共价连接,从而防止了含微生物的生物膜的开裂,保证了生物传感器的重现性和稳定性；聚乙烯醇接枝 4- 乙烯基吡啶可以通过氢键等稳定微生物,保持微生物 的长期活性。采用这种材料包埋 BODseed 制备生物传感器,连续使用 50 天信号响应未见衰减。测试葡萄糖谷氨酸 (GGA) 标准溶液及不同种类的单一有机物,结果表明 BODseed 生物膜对不同种类的有机物具有相似的降解效率。这种普遍适用性将促进快速 BOD 的发展。

#### 附图说明

[0013] 图 1 是制备的一种用于生物传感器测定生化需氧量的微生物有机-无机杂化材料膜生物传感器对不同种类的有机物的信号响应。

#### 具体实施方式

[0014] 实施例 1. 正硅酸乙酯的溶胶-凝胶和聚乙烯醇接枝 4- 乙烯基吡啶包埋混合菌 BODseed

[0015] (1) 将接枝度为 15% 的聚乙烯醇接枝 4- 乙烯基吡啶配成质量浓度为 4% 的水溶液 A；

[0016] (2) 将 BODseed 扩大培养后离心分离,称取该混合菌 10 毫克 (湿重) 加入 5 毫升的磷酸盐缓冲溶液中得到菌浓度为 2 毫克 / 毫升的悬浮液 B；

[0017] (3) 选择无机材料正硅酸己酯  $40\mu\text{L}$ ,溶于  $10\mu\text{L}$  的甲醇,再加入  $0.1\text{molL}^{-1}$  盐酸  $3\mu\text{L}$  作催化剂, $100\mu\text{L}$  的水,混匀,超声振荡 1 小时后,得溶胶 C；

[0018] (4) 然后将溶液 A、菌悬浮液 B 与溶胶 C,按质量比 1 : 0.4 : 0.6 的比例混匀,用取样器移取  $7\mu\text{L}$  该混合液滴涂到孔径为  $10\mu\text{m}$  的透气膜表面 (Oxyphen GmbH),4℃下放置 12 小时,得到一种厚度为  $7\mu\text{m}$  的用于生物传感器测定生化需氧量的微生物有机-无机杂化材料膜。

[0019] 实施例 2. 正硅酸乙酯的溶胶-凝胶和聚乙烯醇接枝 4- 乙烯基吡啶包埋混合菌 BODseed

[0020] (1) 将接枝度为 5% 的聚乙烯醇接枝 4- 乙烯基吡啶配成质量浓度为 2% 的水溶液

A ;

[0021] (2) 将 BODseed 扩大培养后离心分离,称取该混合菌 5 毫克(湿重)加入 5 毫升的磷酸盐缓冲溶液中得到菌浓度为 1 毫克/毫升的悬浮液 B ;

[0022] (3) 选择无机材料正硅酸己酯 20  $\mu$  L,溶于 5  $\mu$  L 的甲醇,再加入 0.1molL<sup>-1</sup> 盐酸 2  $\mu$  L 作催化剂,50  $\mu$  L 的水,混匀,超声振荡 1 小时后,得溶胶 C ;

[0023] (4) 然后将溶液 A、菌悬浮液 B 与溶胶 C 按质量比 1 : 0.2 : 0.2 的比例混匀,用取样器移取 5  $\mu$  L 该混合液滴涂到孔径为 10  $\mu$  m 的透气膜表面 (Oxyphen GmbH),4 $^{\circ}$ C 下放置 12 小时,得到一种厚度为 5  $\mu$  m 的用于生物传感器测定生化需氧量的微生物有机-无机杂化材料膜。

[0024] 实施例 3. 正硅酸乙酯的溶胶-凝胶和聚乙烯醇接枝 4-乙基吡啶包埋混合菌 BODseed

[0025] (1) 将接枝度为 30% 的聚乙烯醇接枝 4-乙基吡啶配成质量浓度为 5% 的水溶液 A ;

[0026] (2) 将 BODseed 扩大培养后离心分离,称取该混合菌 30 毫克(湿重)加入 5 毫升的磷酸盐缓冲溶液中得到菌浓度为 6 毫克/毫升的悬浮液 B ;

[0027] (3) 选择无机材料正硅酸己酯 60  $\mu$  L,溶于 20  $\mu$  L 的甲醇,再加入 0.1mol L<sup>-1</sup> 盐酸 5  $\mu$  L 作催化剂,300  $\mu$  L 的水,混匀,超声振荡 1 小时后,得溶胶 C ;

[0028] (4) 然后将溶液 A、菌悬浮液 B 与溶胶 C 按质量比 1 : 0.5 : 1 的比例混匀,用取样器移取 10  $\mu$  L 该混合液滴涂到孔径为 10  $\mu$  m 的透气膜表面 (Oxyphen GmbH),4 $^{\circ}$ C 下放置 12 小时,得到一种厚度为 10  $\mu$  m 的用于生物传感器测定生化需氧量的微生物有机-无机杂化材料膜。

[0029] 实施例 4 :一种用于生物传感器测定生化需氧量的微生物有机-无机杂化材料膜的用法

[0030] 将制备的一种用于生物传感器测定生化需氧量的微生物有机-无机杂化材料膜,放置于 30 $^{\circ}$ C 的空气饱和的磷酸盐缓冲溶液中,活化 2 小时。然后将所述的膜贴紧于氧电极表面用于 BOD 的测试。结果显示,传感器的线性范围为 1-60mg L<sup>-1</sup>,检出限为 0.5mg L<sup>-1</sup>,连续稳定工作 50 天后,测试 7 次 20.0mg L<sup>-1</sup>GGA 标准溶液,相对标准偏差为 3.2%。该生物传感器可稳定存放 4 $^{\circ}$ C 冰箱中。存放 20 天后,对 20.0mg L<sup>-1</sup> 的 GGA 标准样品信号响应较存放前仅降低 12%,7 次测试 GGA 相对标准偏差为 4.7% ;测试地表水及城市污水处理厂污水,相对于 BOD<sub>5</sub> 的误差分别为 7.1% 和 5.9%,相对标准偏差分别为 1.5% 和 4.6%。

[0031] 实施例 5 :一种用于生物传感器测定生化需氧量的微生物有机-无机杂化材料膜对有机物的非特异性响应

[0032] 将制备的一种用于生物传感器测定生化需氧量的微生物有机-无机杂化材料膜生物传感器用于测试不同浓度的 GGA, OECD (一种国际通用的 BOD 标准溶液),果糖,蔗糖,甘油,琥珀酸,天门冬酰胺溶液及这 7 种溶液的混合物。测得的信号响应对其 BOD<sub>5</sub> 作图,得到图 1。结果表明所制备的一种用于生物传感器测定生化需氧量的微生物有机-无机杂化材料膜生物传感器对不同种类的有机物具有相似的降解特性,这在实际应用中将展示出卓越的优点。

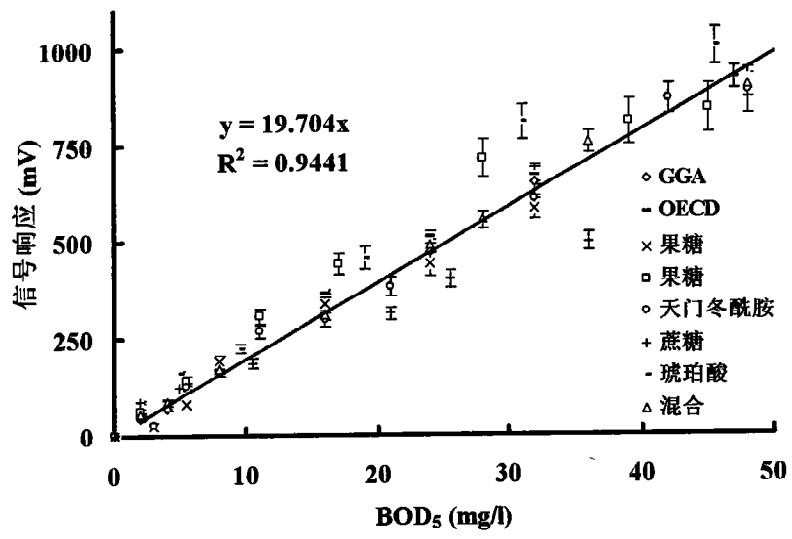


图 1