

DOI:10.19853/j.zgjsps.1000-4602.2025.15.017

基于电子介体及微生物包埋的硝化毒性传感器构建

王 策^{1,2,3}, 杨 洋^{2,3,4}, 袁 玥^{2,3}, 田家宇¹, 马国鑫^{2,3,5},
蔡宇童^{2,3}, 于 茵^{2,3}, 吴昌永^{2,3}

(1. 河北工业大学 土木与交通学院, 天津 300401; 2. 中国环境科学研究院 环境污染控制工程技术研究中心, 北京 100012; 3. 中国环境科学研究院 环境基准与风险评估国家重点实验室, 北京 100012; 4. 自然资源部 天津海水淡化与综合利用研究所, 天津 300192; 5. 中国环境科学研究院 环境技术工程有限公司, 北京 100012)

摘 要: 硝化细菌对毒性物质尤为敏感,受冲击后难以恢复,是工业废水处理设施运行中面临的普遍难题。但目前缺乏专门针对硝化毒性的监测传感器。为此,构建了一种基于电子介体及硝化污泥海藻酸钠包埋的硝化毒性传感器,通过对玻碳电极进行聚中性红修饰(聚合液优化组分为100 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液PBS、100 mmol/L NaNO₃及1 mmol/L 中性红)构建硝化细菌-电极间的电子传递链,突破非电活性微生物胞外电子传递障碍,有效避免二次污染,并保持电化学可逆性;将硝化污泥与6%的海藻酸钠按照1:5混匀后,置于4%氯化钙溶液中交联15 min,形成厚度可控、菌体密度稳定的受试微生物层。该传感器实现了对典型物质和实际废水的硝化毒性检测;与传统的硝化毒性检测方法相比,不但测试结果相关性更优、检测范围更宽、耗时更短,而且使用便捷、易于实现在线监测,可为废水生物处理系统提供实时硝化毒性预警,确保系统稳定运行。

关键词: 硝化毒性传感器; 聚中性红; 海藻酸钠; 电子介体; 微生物包埋

中图分类号: TU992 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4602(2025)15-0116-09

Construction of Nitrification Toxicity Sensor Based on Electronic Mediator and Microbial Embedding

WANG Ce^{1,2,3}, YANG Yang^{2,3,4}, YUAN Yue^{2,3}, TIAN Jia-yu¹, MA Guo-xin^{2,3,5},
CAI Yu-tong^{2,3}, YU Yin^{2,3}, WU Chang-yong^{2,3}

(1. School of Civil and Transportation Engineering, Hebei University of Technology, Tianjin 300401, China; 2. Research Center of Environmental Pollution Control Technology, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China; 3. State Key Laboratory of Environmental Criteria and Risk Assessment, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China; 4. The Institute of Seawater Desalination and Multipurpose Utilization, MNR, Tianjin 300192, China; 5. Environmental Technology Engineering Co. Ltd., Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China)

Abstract: Nitrifying bacteria, which are particularly sensitive to toxic substances and exhibit slow recovery after exposure, pose significant challenges to the operation of wastewater treatment facilities. However, dedicated sensors for monitoring nitrification toxicity are currently lacking. This study

通信作者: 于茵 E-mail: yuyinphoebe@163.com

developed a nitrification toxicity sensor based on an electron mediator and sodium alginate-immobilized nitrifying sludge. The glassy carbon electrode was modified with poly-neutral red, synthesized under optimized polymerization conditions (solution composition: 100 mmol/L phosphate-buffered saline, 100 mmol/L NaNO_3 , and 1 mmol/L neutral red), establishing an electron transfer chain between nitrifying bacteria and the electrode. This strategy overcomes the limitations of extracellular electron transfer in non-electrogenic microorganisms, avoiding secondary pollution while maintaining electrochemical reversibility. The nitrifying sludge was uniformly mixed with 6% sodium alginate at a mass ratio of 1:5 and cross-linked in 4% calcium chloride for 15 minutes, resulting in a microbial test layer with controllable thickness and stable cell density. The sensor demonstrated effective detection of nitrification toxicity for both model compounds and actual wastewater. Compared to traditional methods, it exhibited higher correlation coefficients, broader detection ranges, shorter analysis times, and improved operational simplicity, enabling real-time monitoring. This innovation provides real-time warnings for nitrification toxicity in wastewater treatment systems, offering technical support to ensure system stability and operational reliability.

Key words: nitrification toxicity sensor; poly-neutral red; sodium alginate; electronic mediator; microbial embedding

工业废水成分复杂、水质波动大,有毒有害污染物种类多、毒性显著,常对生物处理系统造成冲击影响^[1]。其中,硝化污泥更容易受到工业废水有毒污染物的威胁,这是由于硝化细菌对毒性物质更为敏感^[2]、生长更为缓慢^[3],被有毒废水冲击时易导致代谢抑制甚至死亡,造成硝化系统崩溃和出水氨氮超标^[4],并且短时间内难以恢复^[5]。因此,对废水硝化毒性的实时监测预警是保障废水处理系统稳定运行的关键环节。

然而,目前尚无针对硝化毒性的监测预警系统。常用的生物毒性传感器更多基于自然水体中生物,如藻类^[4]、水蚤和鱼类^[6]等,难以反映废水对硝化系统或生物处理系统的真实影响。少量基于微生物呼吸速率的监测设备,在配合投加硝化抑制剂(如丙烯酸硫脲等)的条件下也可以实现对硝化毒性的测试^[7],但该类设备通常存在检测周期长、硝化速率测试误差大等缺陷,难以满足现场快速、准确监测需求。

微生物电化学传感器在废水毒性监测领域极具潜力,通过电信号来表达微生物细胞内酶的活性及代谢过程以指示废水毒性,具有检测速度快、灵敏性强、微型化潜力、样品消耗少等优势^[8]。但是,要将其用于废水的硝化毒性测试,目前面临两大技术瓶颈。首要挑战在于硝化细菌电子传递链的活

性位点主要存在于细胞膜内,受细胞壁阻隔^[9],无法实现与电极之间的快速电子传递^[10]。针对此问题,本研究创新采用中性红作为氧化还原介体构建电子传递桥梁^[11]。该吩嗪类化合物具有与 NADH/NAD^+ 高度匹配的氧化还原电位 ($-0.33 \text{ V vs. } -0.32 \text{ V}$)^[12-13],通过电聚合在电极表面形成的聚中性红^[14-15]修饰层依旧具备氧化还原活性,不但可以构建硝化细菌-电极电子传递链,突破非电活性微生物胞外电子传递障碍^[16],而且相较于传统液态介体,可有效避免二次污染并保持高电化学可逆性^[17]。目前中性红修饰玻碳电极的具体条件尚不明确,有待深入探索和优化。

第二个问题是传统生物膜自组装法成膜期较长,且生长不稳定,导致生物膜厚度、密度和微生物群落结构等不同,影响生物传感器监测结果的平行性与稳定性^[18],限制了生物电极的稳定制备^[19-20]。对于硝化污泥来说,由于生长缓慢、成膜困难,这一问题更加突出。本研究采用对微生物活性影响较小的海藻酸钠包埋技术对硝化污泥进行固定,形成厚度可控、菌体密度稳定的受试微生物层。

本研究在充分解决以上两个瓶颈问题的基础上,开发了一种以海藻酸钠包埋硝化污泥为受试生物的介体型硝化毒性传感器,评估了其对典型毒性物质及实际废水硝化毒性的检测性能,并与传统硝

化毒性抑制试验进行对比,论证了其应用的准确性、灵敏性和便捷性等,从而为工业废水生物处理系统硝化毒性预警提供技术手段,为保障系统的稳定运行、提升其风险防控水平提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

试验所用试剂中,一水合氯化锰($\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)、七水合硫酸锌($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、海藻酸钠、氯化镁(MgCl_2)、氯化钙(CaCl_2)、3,5-二氯苯酚(3,5-DCP)、N-烯丙基硫脲均为分析纯,购自上海麦克林有限公司;中性红购自北京索莱宝科技有限公司;七水合硫酸亚铁($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、六水合氯化钴($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、五水合硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)、六水合氯化镍($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、二水合钼酸钠($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、十二水磷酸二钾($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、磷酸二氢钾(KH_2PO_4)、硝酸钠(NaNO_3)、氯化钠(NaCl)、氯化钾(KCl)、硫酸钠(Na_2SO_4)、硫酸铵、氯化铵(NH_4Cl)、碳酸氢钠(NaHCO_3)、亚硝酸钠(NaNO_2)均为分析纯,购自上海国药集团化学试剂有限公司。

试验用仪器包括:电化学工作站(CS350)、扫描电子显微镜(德国ZEISS Sigma 360)、紫外分光光度计、摇床、离心机。

1.2 硝化污泥与配水

试验用硝化污泥来自实验室运行30 d以上的好氧硝化SBR反应器。SBR反应器的接种污泥来自北京城市排水集团有限责任公司高碑店再生水厂好氧池。反应器进水为人工配水: NH_4Cl 为0.44 g/L(氨氮浓度为105 mg/L), NaHCO_3 为0.50 g/L(无机碳源), $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 为73.8 mg/L(磷源), KH_2PO_4 为10.34 mg/L(磷源);每升人工配水中加入1 mL微量元素母液,其组分包括: MgCl_2 为1.26 g/L, CaCl_2 为0.64 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 为40 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 为0.30 g/L, $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 为0.18 g/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 为0.24 g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 为0.24 g/L, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 为0.12 g/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 为18 mg/L。该配水高氨氮且无机碳源的特点,可保障硝化细菌的富集和维持。反应器在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 室温下运行。

1.3 硝化毒性传感器生物电极制备

中性红修饰玻碳电极的制备:以玻碳电极作为工作电极,Pt片为对电极、Ag/AgCl电极为参比电极,构成三电极体系并置于聚合液中,采用循环伏

安法,先于 $-1.5 \sim 1.5 \text{ V}$ 以100 mV/s扫描10圈进行电引发,再于合适的电位范围内以10~140 mV/s扫描25~30圈进行电聚合。使用无水乙醇和超纯水充分冲洗修饰表面,去除表面残存的聚合溶液与低聚物,然后将所制得电极置于干燥器内,晾干后备用。

电极表面硝化污泥包埋:硝化污泥经5 000 r/min离心5 min后,与海藻酸钠溶液按照质量比为1:20~4:5混合均匀,配制成混合溶液。将5 μL 混合液滴加在修饰后的玻碳电极表面,置于2%~10%氯化钙溶液中交联反应10~30 min后取出,用去离子水洗涤3次。

1.4 聚中性红修饰电化学表征

构建三电极单室电化学系统反应器(体积为100 mL),以聚中性红修饰后的电极为工作电极、正方形铂片(边长为1 cm)为对电极、Ag/AgCl电极(+197 mV vs. SHE)为参比电极,采用100 mmol/L铁氰化钾溶液为电解液,通过工作电极附近的参比电极调节工作电极的电位。采用循环伏安法于 $-1.0 \sim 0.8 \text{ V}$ 范围内以100 mV/s的扫描速率扫描3圈,表征中性红在电极表面聚合情况。

1.5 海藻酸钠包埋硝化污泥条件优化

为了优化包埋硝化污泥过程中的海藻酸钠浓度、氯化钙浓度、交联时间、海藻酸钠与硝化污泥比例4个重要参数,根据凝胶小球成型性与硝化污泥活性回收率进行判断。

凝胶小球成型性评判方法:凝胶小球形态与理论球体的趋近程度。在电极表面硝化污泥包埋应用中,成型性良好的包埋载体可促使生物电极表面形成近似曲面的微观结构,有利于提升生物电极内部传质效率及生物膜均匀性,进而增强生物电化学系统的运行效能。

硝化污泥活性回收率测试方法:将凝胶小球转移至100 mL离心管中,加入50 mL含有504 mg/L碳酸氢钠与214 mg/L硫酸铵的培养基,置于200 r/min的振荡器中振荡培养;以相同生物量的未包埋硝化污泥为对照组。培养4 h后取样5 mL测试氨氮浓度,计算硝化污泥的氨氧化速率与活性回收率(凝胶小球与未包埋硝化污泥的氨氧化速率之比)。

1.6 基于硝化毒性传感器的硝化毒性测试

曝气泵持续将空气以10 mL/min的流速注入营养液中,采用循环伏安法进行硝化毒性测试。测试前向单室生物电化学系统反应器加入90 mL含有

基质物质的电解质,并将-4℃保存的工作电极安装在反应器上,静置15 min进行活性恢复。测试时将样品加入反应器中,用含有基质的电解质补全至100 mL,电位窗口设置为-1.0~0.8 V,扫描速率为100 mV/s,扫描圈数设置为200圈。待扫描完成后,以扫描圈数为横坐标,每圈对应氧化还原介体氧化峰峰电流为纵坐标,以峰电流开始下降的时刻作为定量评价硝化毒性的起点,以电流发生显著性转折的时刻作为定量评价毒性的终点。使用最小二乘法对电流-时间数据进行最佳直线拟合,并返回描述此直线的公式,计算电流信号的下降斜率。将斜率与样品浓度进行DoseResp拟合。研究中的所有统计分析均使用Origin Pro 2022软件进行。

1.7 废水来源及水质

废水来自濮阳市某化工企业的预处理前废水,pH为7.7,COD为2 340 mg/L,氨氮为23.5 mg/L,总磷<1 mg/L;此外,还含有As、Cd、Cu、Pb、Cr等重金属以及苯、二氯乙烷等有毒有机物,浓度分别为9.1、12.2、8.8、5.5、7.4、12.5、8.3 mg/L。

1.8 硝化毒性标准测试方法

参考ISO 9509:2006,将硝化污泥配制成3 g/L的接种物。将5.04 g碳酸氢钠和2.65 g硫酸铵溶于1 L水中。配制1.16 g/L的N-烯丙基硫脲。在锥形瓶中加入10 mL培养基、50 mL污泥接种物和40 mL样品。空白组和对照组不添加任何样品,对照组加入1 mL N-烯丙基硫脲溶液,其余所加物质均相同。在摇床中以130 r/min的转速培养4 h。通过公式(1)计算硝化毒性。

$$I_N = \frac{P_c - P_i}{P_c - P_b} \times 100\% \quad (1)$$

式中: P_c 为空白组培养后氨氮浓度,mg/L; P_i 为含硝化毒性物质试验组培养后氨氮浓度,mg/L; P_b 为含N-烯丙基硫脲抑制剂对照组培养后氨氮浓度,mg/L。

2 结果与分析

2.1 硝化细菌-电极电子传递链构建条件优化

为了在硝化污泥与电极之间建立电子传递链,在电极表面修饰聚中性红作为氧化还原介体。在硝化细菌代谢过程中,产生的电子被传递给氧化态聚中性红,并生成还原态聚中性红。随后,还原态聚中性红的电子继续传递给紧密连接的电极,从而实现硝化污泥与电极之间的电子传递。

中性红聚合修饰玻碳电极采用电化学聚合的方法,将玻碳电极置于含有中性红单体与电解质组成的聚合溶液中,利用循环伏安法使中性红单体在较高的电位下氧化生成阳离子自由基。阳离子自由基之间可以形成具有仲胺基团的二聚或多聚体,这些二聚或多聚体又能继续与其他阳离子自由基聚合,进一步形成更大的聚合体。

2.1.1 中性红聚合液优化

中性红在不同pH条件下会形成不同结构的单体,因此,缓冲体系的种类及浓度对中性红的聚合结果至关重要。前人研究表明^[21],在以PBS为电解质的环境下开展循环伏安测试,能够观察到中性红完整清晰的氧化峰;而在其他电解质溶液中,中性红氧化峰峰值降低或峰型不明显。因此本研究以PBS作为聚合液的基础电解质,并对其浓度进行优化。

在不同PBS浓度(10~100 mmol/L)条件下,中性红聚合过程的循环伏安曲线均在-0.4 V和0.15 V处出现氧化峰,将其分别命名为 O_{P1} 和 O_{P2} (见图1)。当PBS浓度从10 mmol/L增加到50 mmol/L时, O_{P1} 和 O_{P2} 电流均逐渐增大,且 O_{P1} 电流增加较快。当PBS浓度达到75 mmol/L时, O_{P1} 电流明显增加,而 O_{P2} 电流增量较 O_{P1} 略小。当PBS浓度为100 mmol/L时, O_{P1} 依旧增加,而 O_{P2} 增量不明显。在更高浓度的PBS条件下,聚中性红的氧化还原性能提升不显著,故将PBS浓度定为100 mmol/L。

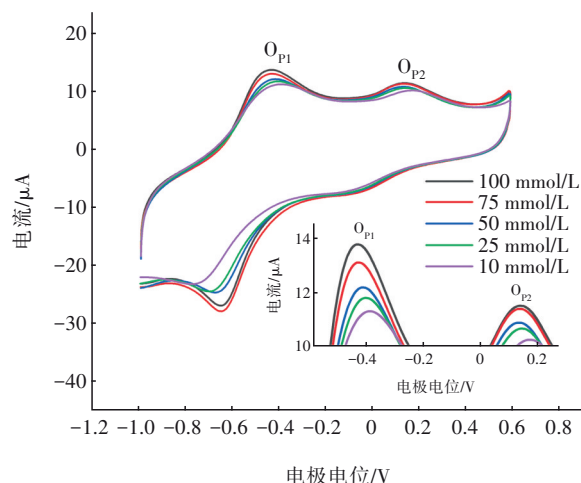


图1 PBS浓度对聚中性红氧化还原性能的影响

Fig.1 Effect of PBS concentration on the redox behavior of poly-neutral red

单独使用PBS缓冲溶液作为聚合液的聚合效果有限。同时,聚中性红是一种多阳离子化合物,其中正电荷由掺杂剂阴离子补偿,但不同的阴离子掺杂导致聚中性红修饰层性能存在差异。现有研究中多加入含其他阴离子的物质作为支持电解质,以提高聚合液导电效果与中性红聚合效果^[15]。为此,考察了 NaNO_3 、 NaNO_2 、 KCl 、 NaCl 、 Na_2SO_4 作为支持电解质条件下的聚合效果。结果表明,当以 NaNO_2 为支持电解质时, O_{p1} 峰值电流最低,但 O_{p2} 峰值电流反而高于以 KCl 、 NaCl 为支持电解质的;当以 Na_2SO_4 为支持电解质时, O_{p1} 、 O_{p2} 峰值电流较其他支持电解质并无突出优势;而以 NaNO_3 为支持电解质时, O_{p1} 、 O_{p2} 峰值电流远高于其他支持电解质,故选用 NaNO_3 作为聚合过程中的支持电解质。

进一步对 NaNO_3 浓度进行优化,结果见图2。随着 NaNO_3 浓度增加, O_{p1} 、 O_{p2} 电流逐渐增大,但 O_{p2} 电流在 NaNO_3 浓度超过100 mmol/L时变化不明显。因此,确定支持电解质 NaNO_3 浓度为100 mmol/L。

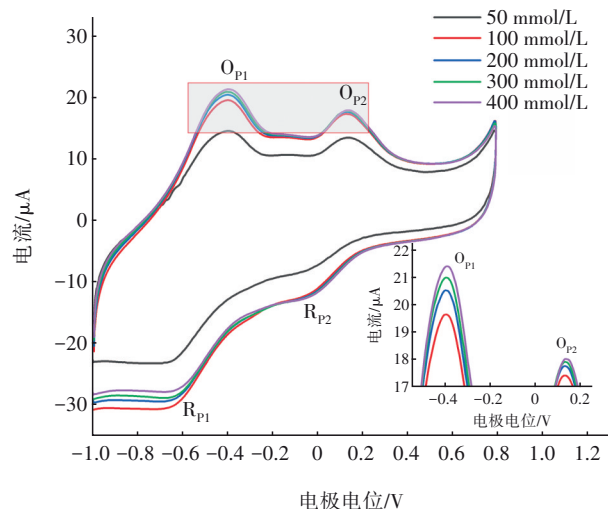


图2 NaNO_3 浓度对聚中性红氧化还原性能的影响

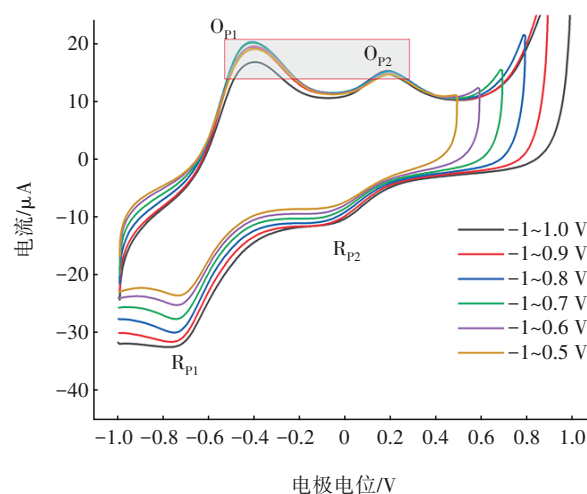
Fig.2 Effect of NaNO_3 concentration on the redox behavior of poly-neutral red

考察了不同中性红浓度条件下的聚合效果。当中性红浓度为0.5~1 mmol/L时,随着中性红浓度的增加,玻碳电极表面接触浓度逐渐升高,吸附与聚合效率有所升高,因此 O_{p1} 峰值电流有明显升高趋势。当中性红浓度为1~5 mmol/L时, O_{p1} 峰值电流反而有所下降,这可能是由于电极氧化能力达到临界,继续增加浓度会使得中性红阳离子自由基被稀释,形成二聚或多聚体机会降低,导致聚合效率下

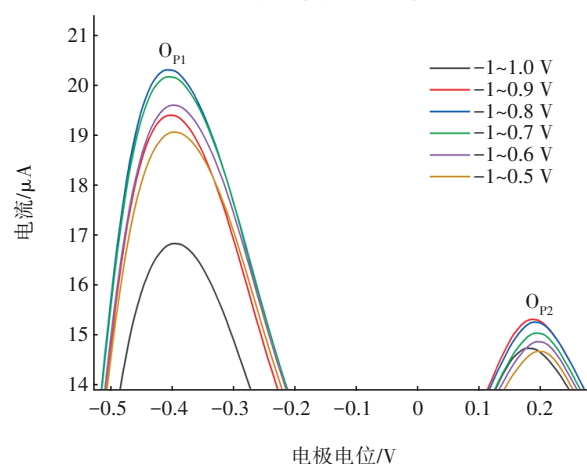
降^[22]。因此,选择1 mmol/L作为修饰玻碳电极的中性红最优浓度。

2.1.2 中性红聚合过程中循环伏安法参数优化

聚合过程中,在较高正电位下发生的不可逆氧化伴随着阴离子的吸附,导致已聚合的中性红发生过度氧化^[15]。考察了扫描电位范围对循环伏安法测试效果的影响,结果如图3所示。 O_{p1} 峰值电流随着正电位的升高而逐步增大,当正电位达到0.8 V时,电流达到最大值20.3 μA ;随着正电位继续升高,氧化峰电流转为逐渐下降,并在1.0 V时下降至16.8 μA ,较最大值下降了17%左右。 O_{p2} 呈现出同样变化趋势,但不如 O_{p1} 变化明显。因此选定-1.0~0.8 V为中性红聚合最优电位范围。



a. 循环伏安法测试效果



b. 局部放大图

图3 扫描电位范围对循环伏安法测试效果的影响

Fig.3 Effect of potential scan range on cyclic voltammetry measurements

扫描速度因电极材料与修饰物质的不同而有

所不同,因此在扫描速率为 10~150 mV/s 范围内进行循环伏安法测试。中性红的电聚合过程包括中性红单体在电极表面的吸附、正电位下阳离子单体自由基的形成,以及后续的链增长^[23]。当扫描速率为 10~90 mV/s 时,两个氧化峰的电流都随着扫描速率的增加而逐渐增大,并且峰电位逐渐从 -0.5 V 移动至 -0.3 V;当扫描速率为 100~150 mV/s 时,氧化峰电流同样随扫描速率增加,但峰电位不再向正电位偏移。因此,确定最优扫描速率为 100 mV/s。

中性红单体氧化为阳离子自由基而产生的氧化电流在每个循环中增加,这是由中性红单体和聚中性红膜的氧化引起,这种现象类似于吡咯和苯胺的电聚合^[23]。中性红聚合中的循环次数对硝化毒性传感器的灵敏度有显著影响,当循环次数较少时,形成的薄膜较薄,可能无法提供预期的效果;当循环次数较多时,形成的薄膜较厚,由于电子难以通过薄膜传递给电极,可能导致硝化毒性传感器的灵敏度较低^[22]。如图 4 所示,还原峰与氧化峰都随着每个循环移至更负的电位,虽然峰值电流随着循环次数的增加而升高,薄膜变厚,但它们的相对增加量逐渐减少。电极覆盖了 25 次和 30 次循环所形成的薄膜,峰电流相近,因此认为 25 次循环对于中性红的电聚合来说是最佳的。

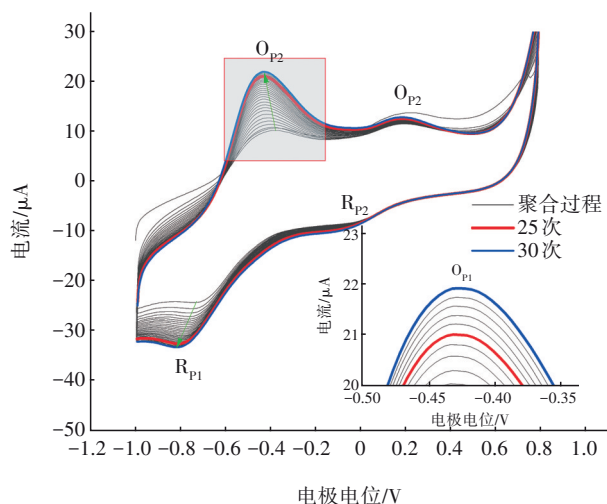


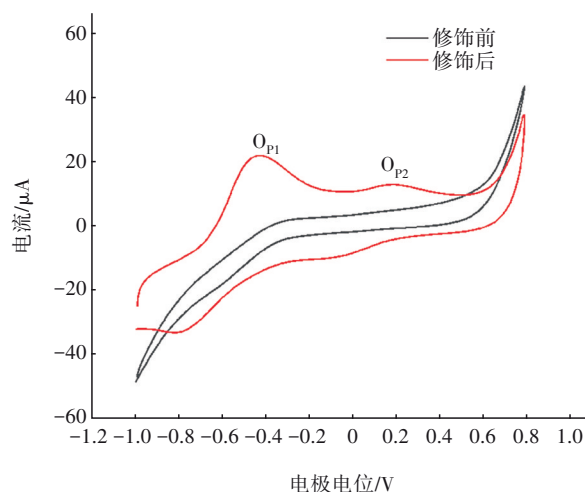
图 4 循环次数对中性红聚合过程的影响

Fig.4 Role of cycle number in the electropolymerization of poly-neutral red

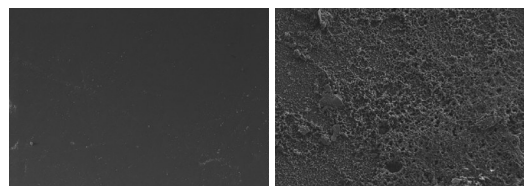
2.1.3 聚中性红修饰玻碳电极前后对比

聚中性红修饰玻碳电极前后的循环伏安法测试结果见图 5(a)。修饰前在 -0.3 V 处有明显的电

流下降,除此之外并无其他氧化还原峰。当玻碳电极修饰后, O_{p1} 、 O_{p2} 峰形明显且峰电流分别增加至 20 和 12.5 μA 左右,说明中性红成功且大量地聚合在玻碳电极表面。



a. 玻碳电极修饰前后循环伏安曲线对比



b. 修饰前形貌

c. 修饰后形貌

图 5 聚中性红修饰对玻碳电极循环伏安曲线与表面形貌的影响

Fig.5 Effect of poly-neutral red modified glass carbon electrode on cyclic voltammetry and surface morphology

图 5(b)、(c) 显示了玻碳电极在 1 500 倍下的扫描电镜图片。在未经修饰情况下其颜色均一,并无明显形状物体,表明电极表面打磨光滑且电极物质均一、性能稳定;而经聚中性红修饰后,电极表面覆盖一层蜂窝状的聚中性红,表明电极表面已经被聚中性红修饰且极大地增加了电极的比表面积,为硝化污泥与电极之间的电子传递提供了良好的条件。

2.2 受试微生物层制备条件优化

硝化污泥通过自然附着与分泌胞外聚合物形成生物膜,不但周期长,而且状态(例如厚度、密度和微生物群落结构)差异显著,对生物传感器监测结果的平行性与稳定性造成很大干扰。采用海藻酸钠对硝化污泥进行包埋固定,并通过考察硝化污泥活性回收率与凝胶小球成型性对包埋过程涉及的海藻酸钠浓度、氯化钙浓度、交联时间和硝化污

泥投加比例等四个参数进行优化。

2.2.1 海藻酸钠浓度的影响

首先考察了海藻酸钠浓度(2%~10%,质量分数)对包埋效果的影响。当浓度为2%时,包埋后凝胶并不呈球形,形状更接近于圆片状,硝化污泥受氯化钙冲击时间更长,因此硝化污泥活性回收率仅为25.67%;当海藻酸钠浓度升高至6%时,凝胶为圆球带短尾状,硝化污泥活性回收率达到峰值39.29%;当海藻酸钠浓度达到10%时,凝胶变厚且致密,影响了包埋在内部的硝化污泥对氧气与营养物质的摄取,硝化污泥活性回收率降低至17.19%。因此选定海藻酸钠最佳浓度为6%。

2.2.2 氯化钙浓度的影响

交联剂浓度的选取需兼顾凝胶成型与微生物活性。当氯化钙浓度为2%、4%、6%、8%、10%时,随着氯化钙浓度的升高,对硝化污泥抑制作用逐渐增强,硝化污泥活性回收率从84.94%依次下降至62.82%、52.56%、47.12%、39.74%。较低的氯化钙浓度有利于硝化污泥保持良好活性。但从凝胶小球成型性看,2%的凝胶小球呈椭圆形,成型性较差;浓度提高到4%时,凝胶小球形成规则球形且有较高活性回收率。故确定最优氯化钙浓度为4%。

2.2.3 交联时间的影响

交联时长与凝胶稳定性呈正相关,但与微生物活性呈负相关。当交联时间为10、15、20、25、30 min时,硝化污泥活性回收率分别为70.19%、62.11%、51.55%、45.03%、31.37%。在硝化污泥活性回收率检测前的振荡培养过程中,观察到仅交联10 min的凝胶小球有大量硝化污泥泄漏的现象。因此,折中选择交联时间为15 min,在保证凝胶稳定性的同时控制活性损失。

2.2.4 硝化污泥与海藻酸钠比例的影响

当硝化污泥与海藻酸钠比例(质量比)为1:20、1:10、1:5、1:2.5、4:5时,硝化污泥活性回收率分别为74.54%、71.92%、67.01%、57.52%、55.56%,随该比例的增加,硝化污泥活性回收率逐渐降低。当该比例不超过1:5时,硝化污泥活性回收率均在70%左右,考虑到增加生物量使得硝化毒性传感器受试生物增多,信号增强,故确定最优比例为1:5。

2.3 硝化毒性传感器检测性能验证

为了验证所构建的基于电子介体及硝化污泥海藻酸钠包埋的微生物毒性传感器在实际场景中

应用的可行性,考察了其对典型毒性物质和实际废水的检测性能,并与传统的硝化毒性标准评价方法(ISO 9509:2006)的检测结果进行多维度对比,以评估其在工业废水生物处理系统中的监测预警能力。

2.3.1 对典型硝化毒性物质的检测结果

在废水及化学品对微生物的硝化毒性评价研究中,3,5-二氯苯酚(3,5-DCP)是最常用的标准硝化毒性物质之一^[24]。其致毒机理主要在于对细胞完整性造成严重破坏,导致渗透压增加,最终使细胞死亡。因此,采用3,5-DCP作为典型硝化毒性物质考察硝化毒性传感器的检测性能,结果见图6。当采用ISO 9509:2006标准评价方法时,各参数值如下:渐近线(A)= 94.46 ± 4.63 ,中心点(LOGx0)= -1.72 ± 0.27 ,斜率因子(P)= 0.46 ± 0.10 ,拟合曲线的 R^2 为0.9715。

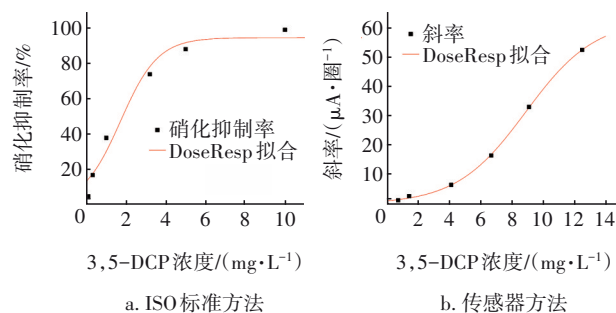


图6 3,5-DCP硝化毒性检测与模型拟合

Fig.6 3,5-DCP toxicity detection and model fitting

基于电子介体及污泥包埋的硝化毒性传感器对不同浓度3,5-DCP进行硝化毒性测试时,考虑到电流变化是由硝化污泥受毒性冲击所致,因此将所得电流变化斜率与硝化毒性物质浓度之间同样采用剂量-效应模型进行非线性回归拟合,结果如图6(b)所示。各参数值如下: $A=62.87 \pm 1.51$, $\text{LOGx0}=8.89 \pm 0.145$, $P=0.20 \pm 0.01$, R^2 为0.9997。

2.3.2 对实际化工废水的检测结果

实际废水具有更加复杂的组分特征,其不同毒性组分之间具有一定联合效应,因此对硝化毒性传感器检测性能的要求也更加严格。分别采用硝化毒性传感器及传统ISO 9509:2006标准方法,对实际化工废水开展了不同浓度条件下(以废水体积分数表达)的硝化毒性检测。当采用ISO 9509:2006标准方法进行测试时各参数值如下: $A=97.83 \pm 2.23$, $\text{LOGx0}=-1.63 \pm 0.08$, $P=0.59 \pm 0.05$, R^2 为0.9967;当采用本研究所建立的方法进行测试时各

参数值如下: $A=41.03\pm2.64$, $\text{LOG}x_0=4.36\pm0.37$, $P=0.59\pm0.16$, R^2 为 0.997 3。

2.3.3 硝化毒性传感器检测性能评估

从拟合效果来看,传统的 ISO 标准方法测得的 3,5-DCP 和实际化工废水硝化毒性效应曲线的拟合 R^2 值分别为 0.971 5 和 0.996 7,而硝化毒性传感器对二者的拟合 R^2 值分别高达 0.999 7 和 0.997 3,显著高于传统标准方法,说明硝化毒性传感器对于典型硝化毒性物质和实际废水均具有优异的剂量-效应响应特征,适用于硝化毒性的定量检测。

从检测范围看,传统 ISO 标准方法在 3,5-DCP 浓度为 0~5.5 mg/L 范围内硝化毒性响应显著,但当浓度继续升高时,抑制率不再明显变化;对于实际化工废水硝化毒性的响应区间主要在 0~5%。而硝化毒性传感器的电流变化斜率能够在更宽的检测范围内(3,5-DCP 浓度为 0~14 mg/L,化工废水体积分数为 0~7%)表现出良好的变化特征,说明其能够为硝化毒性监测提供更丰富的预警等级。

从检测时长看,ISO 标准方法的检测耗时 5 h 以上(包括接触培养时间,以及氨氮或硝酸盐、亚硝酸盐的测试时间),而硝化毒性传感器可以在 1~2 h 内完成检测,检测时长极大缩短,为实际废水的实时在线监测提供了良好的条件。

从设备要求看,传统的 ISO 标准方法需要采用摇床对硝化污泥进行培养,对氨氮或硝酸盐、亚硝酸盐的测试也需要相应的仪器与试剂,所以主要用于实验室检测。硝化毒性传感器则大大简化了设备要求,传感器形式简洁、操作方便,便于实现便携式手持检测或在线实时监测。

从样品消耗需求看,出于污泥接触培养以及水质测试的要求,ISO 标准方法的样品需求量一般为 10~40 mL,而硝化毒性传感器检测样品消耗量可随设备化而减少至 1 mL 甚至更低,在线实时监测则几乎不额外消耗样品。

综上所述,硝化毒性传感器对典型硝化毒性物质及实际化工废水均具有良好的硝化毒性效应响应,检测范围宽、耗时短、使用便捷,为实际废水的硝化毒性监测预警提供了良好的技术手段。

3 结论

开发了一种基于电子介体及硝化污泥海藻酸钠包埋的硝化毒性传感器,创新采用中性红作为氧

化还原介体构建电子传递介质,在 100 mmol/L PBS 中加入 100 mmol/L NaNO_3 与 1 mmol/L 中性红构成的聚合液中采用循环伏安法对玻碳电极进行聚中性红修饰,不但构建了硝化菌-电极电子传递链,突破非电活性微生物胞外电子传递障碍,而且相较于传统液态介体,可有效避免二次污染并保持电化学可逆性;将硝化污泥与 6% 的海藻酸钠按照 1:5 混合均匀,置于 4% 氯化钙溶液中进行 15 min 交联反应,形成厚度可控、菌体密度稳定的受试微生物层。

该传感器对典型硝化毒性物质及含多种重金属(As、Cd、Cu 等)及有机污染物(苯、二氯乙烷)的实际废水表现出稳定响应,但其长期抗干扰性需进一步验证。与传统硝化毒性抑制试验相比,该方法可通过电信号直观反映硝化毒性水平,测试结果的 DoseResp 拟合相关性更优、检测范围更宽、耗时更短,而且使用便捷、易于实现在线实时监测,为废水处理系统的硝化毒性冲击预警提供了一种良好的技术手段。

参考文献:

- [1] HENRIQUES I D S, LOVE N G. The role of extracellular polymeric substances in the toxicity response of activated sludge bacteria to chemical toxins [J]. *Water Research*, 2007, 41(18): 4177-4185.
- [2] ZHANG Z, YANG Y, XI H, *et al.* Evaluation methods of inhibition to microorganisms in biotreatment processes: a review [J]. *Water Cycle*, 2023, 4: 70-78.
- [3] YANG Y, XI H, ZHANG Z, *et al.* The response of nitrifying activated sludge to chlorophenols: insights from metabolism and redox homeostasis [J]. *Journal of Environmental Management*, 2023, 346: 1-11.
- [4] ZAPPI D, CORONADO E, SOLJAN V, *et al.* A microbial sensor platform based on bacterial bioluminescence (luxAB) and green fluorescent protein (gfp) reporters for in situ monitoring of toxicity of wastewater nitrification process dynamics [J]. *Talanta*, 2021, 221: 1-8.
- [5] KAPOOR V, LI X, ELK M, *et al.* Impact of heavy metals on transcriptional and physiological activity of nitrifying bacteria [J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(22): 13454-13462.
- [6] HASSAN S, VAN GINKEL S, HUSSEIN M A, *et al.* Toxicity assessment using different bioassays and microbial biosensors [J]. *Environment International*,

- 2016, 92/93: 106–118.
- [7] MARASSI R, QUEIROZ L, SILVA D, *et al.* Performance and toxicity assessment of an up-flow tubular microbial fuel cell during long-term operation with high-strength dairy wastewater [J]. *Journal of Cleaner Production*, 2020, 259: 1–10.
- [8] LI R, REN J, CHEN J, *et al.* Rapid and versatile colorimetric sensor based on luminescent bacterium for water comprehensive toxicity detection [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2023, 390: 1–9.
- [9] SHI L, RICHARDSON D, WANG Z, *et al.* The roles of outer membrane cytochromes of *Shewanella* and *Geobacter* in extracellular electron transfer [J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2009, 1 (4) : 220–227.
- [10] LU H, YU Y, ZHOU Y, *et al.* A quantitative evaluation method for wastewater toxicity based on a microbial fuel cell [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 183: 1–6.
- [11] SIMOSKA O, GAFFNEY E, LIM K, *et al.* Understanding the properties of phenazine mediators that promote extracellular electron transfer in *Escherichia coli* [J]. *Journal of the Electrochemical Society*, 2021, 168 (2) : 1–8.
- [12] CHEN H, YU Y, YU Y, *et al.* Exogenous electron transfer mediator enhancing gaseous toluene degradation in a microbial fuel cell: performance and electron transfer mechanism [J]. *Chemosphere*, 2021, 282: 1–7.
- [13] IM C, KIM C, SONG Y, *et al.* Electrochemically enhanced microbial CO conversion to volatile fatty acids using neutral red as an electron mediator [J]. *Chemosphere*, 2018, 191: 166–173.
- [14] MARDIANA U, INNOCENT C, JARRAR H, *et al.* Electropolymerized neutral red as redox mediator for yeast fuel cell [J]. *International Journal of Electrochemical Science*, 2015, 10(11) : 8886–8898.
- [15] PAULIUKAITĖ R, BRETT C. Poly (neutral red) : electrosynthesis, characterization, and application as a redox mediator [J]. *Electroanalysis*, 2008, 20 (12) : 1275–1285.
- [16] MA H, YONG D, KIM H, *et al.* A ferricyanide-mediated activated sludge bioassay for determination of the toxicity of water [J]. *Electroanalysis*, 2015, 28(3) : 580–587.
- [17] HARRINGTON T, TRAN V, MOHAMED A, *et al.* The mechanism of neutral red-mediated microbial electrosynthesis in *Escherichia coli*: menaquinone reduction [J]. *Bioresource Technology*, 2015, 192: 689–695.
- [18] QI X, WANG S, JIANG Y, *et al.* Artificial electrochemically active biofilm for improved sensing performance and quickly devising of water quality early warning biosensors [J]. *Water Research*, 2021, 198: 1–9.
- [19] SADEGHI A, EBRAHIMI M, SHAHRYARI S, *et al.* Potential applications of encapsulated yeasts especially within alginate and chitosan as smart bioreactors and intelligent micro-machines [J]. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2024, 7: 1–16.
- [20] WANG Z, LI D, SHI Y, *et al.* Recent implementations of hydrogel-based microbial electrochemical technologies (METs) in sensing applications [J]. *Sensors*, 2023, 23 (2): 641:1–29.
- [21] 周密, 颜家保, 胡杰, 等. 以聚中性红为介体的生化需氧量微生物传感器的研制 [J]. *现代化工*, 2022, 42 (10) : 247–251, 256.
- ZHOU Mi, YAN Jiabao, HU Jie, *et al.* Preparation of electrochemical biochemical oxygen demand biosensor mediated by polyneutral red [J]. *Modern Chemical Industry*, 2022, 42(10) : 247–251, 256 (in Chinese).
- [22] HU J, GAO G, XIA S. A mediated BOD microsensor based on poly (neutral red) and bacteria modified interdigitated ultramicroelectrode array [J]. *International Journal of Electrochemical Science*, 2016, 11 (7) : 6387–6402.
- [23] SAHIN M, AYRANCI E. Electrooxidation of NADH on modified screen-printed electrodes: effects of conducting polymer and nanomaterials [J]. *Electrochimica Acta*, 2015, 166: 261–270.
- [24] YANG Y, YU Y, XI H, *et al.* Effect of carbon source conditions on response of nitrifying sludge to 3, 5-dichlorophenol [J]. *Journal of Environmental Management*, 2022, 317: 1–10.

作者简介:王策(2000–),男,天津人,硕士,主要研究方向为微生物传感器毒性检测。

E-mail: Wangce75@163.com

收稿日期:2025-01-22

修回日期:2025-03-06

(编辑:李德强)