



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108593740 B

(45)授权公告日 2020.06.16

(21)申请号 201711362592.1

(22)申请日 2017.12.18

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108593740 A

(43)申请公布日 2018.09.28

(73)专利权人 中国科学院长春应用化学研究所
地址 130022 吉林省长春市朝阳区人民大街5625号

(72)发明人 余登斌 董绍俊 章慧 白露
李婷 刘长宇 翟俊峰 刘玲

(74)专利代理机构 长春菁华专利商标代理事务所(普通合伙) 22210
代理人 南小平

(51)Int.Cl.
G01N 27/327(2006.01)

(56)对比文件

CN 102520047 A,2012.06.27,

CN 106104264 A,2016.11.09,

CN 106226364 A,2016.12.14,

Lei Han 等.Self-powered visual ultraviolet photodetector with Prussian blue electrochromic display.《ChemComm》.2013,第50卷

Dengbin Yu 等.Toxicity detection in water containing heavy metal ions with a self-powered microbial fuel cell-based biosensor.《Talanta》.2017,第168卷

Lu Bai 等.Self-powered fluorescence controlled switch systems based on biofuel cells.《Energy & Environmental Science》.2013,第6卷

审查员 佟莹

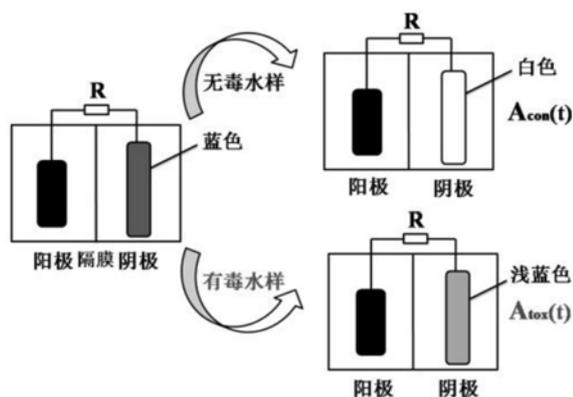
权利要求书4页 说明书9页 附图1页

(54)发明名称

基于生物阳极/普鲁士蓝阴极的自供能可视化检测方法

(57)摘要

本发明涉及一种基于生物阳极/普鲁士蓝阴极的自供能可视化检测方法,属于水体检测技术领域。解决了如何提供一种简化了检测设备,降低了能源的消耗,操作简便,响应更灵敏,检测结果可视化,检测成本更低的水体检测方法的问题。该方法先制备生物阳极和PB/ITO片,然后构建生物传感器,分别检测标准液和检测液,利用普鲁士蓝膜独特的电致变色性能及可逆的氧化还原行为,根据阳极微生物(酶)活性监测水体毒性、有机物浓度和生化需氧量的变化,水体对阳极微生物(酶)活性的影响可以完全表现在普鲁士蓝膜颜色变化的快慢及程度上,辅助紫外光谱仪或者荧光光谱仪还可以计算出毒性抑制率、有机物浓度和生化需氧量。



1. 基于生物阳极/普鲁士蓝阴极的自供能可视化检测方法,其特征在于,步骤如下:

步骤一、在阳极上富集稳定的产电菌或酶,得到生物阳极;

步骤二、在ITO基底上沉积普鲁士蓝,得到PB/ITO片;

步骤三、取双室生物传感器,先用2 ~ 200 mM铁氰化钾溶液清洗阴极室,清洗液清洗阳极室,然后将阴极和步骤一得到的生物阳极分别置于阴极室和阳极室中,且阴极和生物阳极分别连接在负载电阻的两端,数据采集器的两端也连接电阻两端,再向阳极室加入标准液,阴极室加入2 ~ 200 mM铁氰化钾溶液,当数据采集器显示的电压/电流上升至稳定状态,断开电路;

步骤四、先取出阳极室和阴极室内的溶液,用清洗液清洗阳极室,并向阳极室加入与步骤三相同的标准液,用阴极电解液清洗阴极室,并向阴极室加入阴极电解液,然后取一片PB/ITO片,测试其吸光度 Abs_0 后,用该PB/ITO片替换阴极,对阳极室除氧后,连接电路,反应1~80 s后取出PB/ITO片,用去离子水冲洗,氮气吹干,测试其吸光度 Abs_{con} ,计算吸光度变化 $\delta Abs_{con}=Abs_0-Abs_{con}$;

步骤五、断开电路,先取出阳极室和阴极室内的溶液,用清洗液清洗阳极室,并向阳极室加入检测液,用阴极电解液清洗阴极室,并向阴极室加入阴极电解液,然后取另外一片PB/ITO片,测试其吸光度 Abs_0' ,用该PB/ITO片替换阴极,对阳极室除氧后,连接电路,再反应与步骤四相同时间后取出PB/ITO片,用去离子水冲洗,氮气吹干,立即测试其吸光度 Abs_x ,计算吸光度变化 $\delta Abs_x=Abs_0'-Abs_x$;

步骤六、按照公式(1)计算抑制率I,依据抑制率I判断待测水样的毒性;

$$I = (1 - \delta Abs_x / \delta Abs_{con}) \times 100\% \quad (1)$$

式中, δAbs_{con} 是阳极溶液为标准液时PB/ITO片还原后的紫外吸光度变化值, δAbs_x 是阳极溶液为检测液时PB/ITO片还原后的紫外吸光度变化值;

所述步骤三-步骤五中,阳极室内加入的液体体积相等,阴极室内加入的液体体积相等,阴极电解液为pH=6的0.1 M KCl和0.1M KH_2PO_4 的水溶液;标准液为有机物、磷酸盐、微量元素、维生素和去离子水的混合物;清洗液为不含有机物的标准液;检测液为以待测水样替换去离子水的标准液。

2. 根据权利要求1所述的基于生物阳极/普鲁士蓝阴极的自供能可视化检测方法,其特征在于,将步骤四-步骤六替换为:

步骤四、先取出阳极室和阴极室内的溶液,用清洗液清洗阳极室,并向阳极室加入与步骤三相同的标准液,用阴极电解液清洗阴极室,并向阴极室加入阴极电解液,然后用一片PB/ITO片替换阴极,对阳极室除氧后,连接电路,反应1~80 s后取出PB/ITO片,用去离子水冲洗,氮气吹干,观察其颜色;

步骤五、断开电路,先取出阳极室和阴极室内的溶液,用清洗液清洗阳极室,并向阳极室加入检测液,用阴极电解液清洗阴极室,并向阴极室加入阴极电解液,然后用另一片PB/ITO片替换阴极,对阳极室除氧后,连接电路,再反应与步骤四相同时间后取出PB/ITO片,用去离子水冲洗,氮气吹干,观察其颜色;

步骤六、将步骤四阳极溶液为标准液时PB/ITO片还原后的颜色和步骤五阳极溶液为检测液时PB/ITO片还原后的颜色进行比较,进而判断检测液的毒性;

所述步骤三-步骤五中,阳极室内加入的液体体积相等,阴极室内加入的液体体积相

等,阴极电解液为pH=6的0.1 M KCl和0.1M KH₂PO₄的水溶液;标准液为有机物、磷酸盐、微量元素、维生素和去离子水的混合物;清洗液为不含有机物的标准液;检测液为以待测水样替换去离子水的标准液。

3. 根据权利要求1所述的基于生物阳极/普鲁士蓝阴极的自供能可视化检测方法,其特征在于,将步骤四-步骤六替换为:

步骤四、

4.1 先取出阳极室和阴极室内的溶液,用清洗液清洗阳极室,并向阳极室加入与步骤三相同的标准液,用阴极电解液清洗阴极室,并向阴极室加入阴极电解液,然后取一片PB/ITO片,测试其吸光度 Abs_0 后,用该PB/ITO片替换阴极,对阳极室除氧后,连接电路,反应1~80 s后取出PB/ITO片,用去离子水冲洗,氮气吹干,测试其吸光度 $Abs(a)$,计算吸光度变化 $\Delta Abs(a) = Abs_0 - Abs(a)$;

4.2 多次重复4.1,以有机物浓度为单一变量检测有机物浓度不同的标准液,用有机物浓度不同的标准液得到的不同颜色PB/ITO片制作比色卡,并且以有机物浓度为横坐标,吸光度变化为纵坐标作标准曲线,得到线性方程(2):

$$y = bx + c \quad (2)$$

式中,b为线性方程的斜率,c为线性方程的截距;

步骤五、断开电路,先取出阳极室和阴极室内的溶液,用清洗液清洗阳极室,并向阳极室加入检测液,用阴极电解液清洗阴极室,并向阴极室加入阴极电解液,然后取另外一片PB/ITO片,测试其吸光度 Abs_0' ,用该PB/ITO片替换阴极,对阳极室除氧后,连接电路,再反应与步骤四相同时间后取出PB/ITO片,用去离子水冲洗,氮气吹干,立即测试其吸光度 Abs_x ,计算吸光度变化 $\Delta Abs(x) = Abs_0' - Abs_x$;

步骤六、对照比色卡或者依据线性方程(2),得到检测液的有机物浓度,进而计算出待测水样的有机物浓度;

所述步骤三-步骤五中,阳极室内加入的液体体积相等,阴极室内加入的液体体积相等,阴极电解液为pH=6的0.1 M KCl和0.1M KH₂PO₄的水溶液;标准液为有机物、磷酸盐、微量元素、维生素和去离子水的混合物;清洗液为不含有机物的标准液;检测液为以待测水样替换去离子水的标准液,且待测水样与标准液仅含有唯一种类的有机物,且两者的有机物相同。

4. 根据权利要求1所述的基于生物阳极/普鲁士蓝阴极的自供能可视化检测方法,其特征在于,将步骤四-步骤六替换为:

步骤四、

4.1 先取出阳极室和阴极室内的溶液,用清洗液清洗阳极室,并向阳极室加入与步骤三相同的标准液,用阴极电解液清洗阴极室,并向阴极室加入阴极电解液,然后取一片PB/ITO片,测试其吸光度 Abs_0 后,用该PB/ITO片替换阴极,对阳极室除氧后,连接电路,反应1~80 s后取出PB/ITO片,用去离子水冲洗,氮气吹干,测试其吸光度 $Abs(a)$,计算吸光度变化 $\Delta Abs(a) = Abs_0 - Abs(a)$;

4.2 多次重复4.1,以生化需氧量为单一变量检测生化需氧量不同的标准液,用生化需氧量不同的标准液得到的不同颜色PB/ITO片制作比色卡,并且以生化需氧量为横坐标,吸光度变化为纵坐标作标准曲线,得到线性方程(2):

$$y=bx+c \quad (2)$$

式中, b 为线性方程的斜率, c 为线性方程的截距;

步骤五、断开电路,先取出阳极室和阴极室内的溶液,用清洗液清洗阳极室,并向阳极室加入检测液,用阴极电解液清洗阴极室,并向阴极室加入阴极电解液,然后取另外一片PB/ITO片,测试其吸光度 Abs_0' ,用该PB/ITO片替换阴极,对阳极室除氧后,连接电路,再反应与步骤四相同时间后取出PB/ITO片,用去离子水冲洗,氮气吹干,立即测试其吸光度 Abs_x ,计算吸光度变化 $\Delta Abs(x)=Abs_0'-Abs_x$;

步骤六、对照比色卡或者依据线性方程(2),得到检测液的生化需氧量,根据检测液的生化需氧量计算得到待测水样的生化需氧量;

所述步骤三-步骤五中,阳极室内加入的液体体积相等,阴极室内加入的液体体积相等,阴极电解液为pH=6的0.1 M KCl和0.1M KH_2PO_4 的水溶液;标准液为有机物、磷酸盐、微量元素、维生素和去离子水的混合物;清洗液为不含有机物的标准液;检测液为以待测水样替换去离子水的标准液。

5. 根据权利要求1-4任何一项所述的基于生物阳极/普鲁士蓝阴极的自供能可视化检测方法,其特征在于,每1 L的标准液中,含有有机物1~10000 mg、0.031~1.24 g NH_4Cl 、0.013~0.52 g KCl、0.02452~9.808 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 、0.4576~18.304 g Na_2HPO_4 、12.5 mL的微量元素和5 mL的维生素,余量为去离子水;

所述有机物为乙酸钠、葡萄糖、L-谷氨酸、果糖、木糖、蔗糖、麦芽糖中的一种或者几种;

1 L微量元素的成分为:1.5 g氨基三乙酸、3.0 g $MgSO_4$ 、0.5 g $MnSO_4 \cdot H_2O$ 、1.0 g $NaCl$ 、0.1 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.1 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 、0.1 g $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 、0.13 g $ZnCl_2$ 、0.01 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 、0.01 g $AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ 、0.01 g H_3BO_3 、0.025 g Na_2MoO_4 、0.024 g $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 、0.025 g $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$,余量为去离子水;

1 L维生素浓缩100倍的成分为:0.2 g维生素H、0.2 g叶酸、1 g维生素B6、0.5 g核黄素、0.5 g硫胺、0.5 g烟酸、0.5 g维生素B5、0.01 g维生素B12、0.5 g对氨基苯甲酸和0.5 g硫辛酸,余量为去离子水。

6. 根据权利要求1-4任何一项所述的基于生物阳极/普鲁士蓝阴极的自供能可视化检测方法,其特征在于,将生物电化学系统上富集稳定的产电菌的步骤如下:

1.1、将有机物、PBS缓冲溶液、维生素、微量元素和活性污泥上清液混合均匀,通惰性气氛5 min以上或者加入溶解氧的去除剂后静置5 min以上,密闭,放入10~50 °C生化箱中培养,1~100天后,得到菌种;

所述有机物、PBS缓冲溶液、维生素、微量元素和活性污泥上清液的配比为:(1~10000 mg):(1~200 mmol):(0.2~50 mL):(0.8~100 mL):(1~499 mL);

1.2、将生物电化学系统通过导线与电化学工作站连接,混合液接种到生物电化学系统中,置于10~50 °C生化箱中培养,当电化学工作站采集的电流下降到正负0.00005 A以内或者电压下降到正负50 mV以内时更换混合液,当生物电化学系统连续两个周期电流、电压或电量的峰值不再升高,认为生物电化学系统启动成功,得到富集稳定的产电菌的生物电化学系统,取下阳极,得到生物阳极;

每1 L混合液含有100 mmol的PBS缓冲溶液,5 mL维生素,12.5 mL微量元素和1000 mg有机物,余量为菌种;

所述生物电化学系统为MFC、MEC或M3C。

7. 根据权利要求1-4任何一项所述的基于生物阳极/普鲁士蓝阴极的自供能可视化检测方法,其特征在於,所述在ITO基底上沉积普鲁士蓝,得到PB/ITO片的过程为:

2.1、将ITO玻璃分别在丙酮、乙醇、去离子水中连续超声清洗20 min,再在氢氧化钠的乙醇溶液中活化15 min,去离子水超声洗净,去离子水冲洗,氮气吹干;

2.2、配制电聚合普鲁士蓝的电解液,电聚合普鲁士蓝的电解液为包含0.1 M KCl、0.1 M HCl、2.5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ 和2.5 mM $FeCl_3$ 的去离子水溶液;然后以恒电位0.4 V,以Ag/AgCl为参比电极,在ITO玻璃上电沉积普鲁士蓝膜,普鲁士蓝膜的厚度为10 ~ 1000 nm,用去离子水洗去物理吸附的离子,氮气吹干,100℃加热3-24 h,得到PB/ITO片。

8. 根据权利要求1~4任何一项所述的基于生物阳极/普鲁士蓝阴极的自供能可视化检测方法,其特征在於,所述阳极和阴极材料分别为碳布、碳纸、石墨棒、石墨毡、石墨泡沫、石墨粒或金属网。

9. 根据权利要求1~4任何一项所述的基于生物阳极/普鲁士蓝阴极的自供能可视化检测方法,其特征在於,对阳极室除氧的方式为:通入惰性气体或者加入L-半胱氨酸除氧,时间为30 min以上。

10. 根据权利要求1、3和4中任何一项所述的基于生物阳极/普鲁士蓝阴极的自供能可视化检测方法,其特征在於,重复步骤四-六,将多次检测结果取平均值,得到最终值。

基于生物阳极/普鲁士蓝阴极的自供能可视化检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于水体检测技术领域,具体涉及一种基于生物阳极/普鲁士蓝阴极的自供能可视化检测方法。

背景技术

[0002] 近几十年来,随着我国工、农业的快速发展和污染物的过度排放,以及各种污染物在环境中迁移转化形成复合污染物,环境污染问题日益突出,水污染问题尤为严重,直接危害到人类健康和生态安全。为了应对这一严峻挑战,各种水体综合毒性检测、监测的技术迅速发展,成为人们监测水环境是否污染,并判断受污染程度的重要手段。其中,微生物种群数量大,生长周期短,对环境变化的敏感性高,具有与高等动物类似的物理化学特性以及酶作用过程等特点,因而适合开发省时、低耗、无道德争议的快速生物学毒性测试方法,尤其适合开发小型便携式水体毒性检测设备。近年来,各种类型的微生物被用作毒性检测的受试体,例如发光细菌,电化学活性菌,甚至普通的微生物等,基于微生物的毒性检测方法受到了广泛的关注。

[0003] 而基于电化学活性菌的微生物燃料电池 (microbial fuel cell, MFC) 的发明为水体毒性检测研究提供了新的手段。MFC是一种以产电微生物为阳极催化剂,将化学能直接转化成电能的装置。目前,对MFC的研究主要集中在产电,有机污水处理,环境生物修复,野外电源及传感器等领域的开发。Kim等率先将MFC引入至水体生物毒性的检测,包括有机磷化合物、多氯联苯、重金属如铅和汞,目前已研制出世界上第一台基于MFC的水体生物毒性检测仪 (HATOX-2000),它采用双室型MFC作为核心部件,阴极以溶解氧为最终电子受体,阴极氧还原反应 (ORR) 采用Pt/C催化剂,氧气还原按4电子途径进行,催化效率很高。但是, HATOX-2000存在以下不足: (1) 阴极室需要连续曝气,能源消耗大; (2) 缓慢的反应动力学以及催化剂的毒化会降低阴极电位和MFC的整体效率; (3) Pt储量稀少,价格高昂,成本高; (4) 结构复杂,操作繁琐; (5) 需要昂贵的电化学检测仪器,野外检测携带不方便; (6) 检测结果肉眼不可见。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明提供一种基于生物阳极/普鲁士蓝阴极的自供能可视化检测方法,该方法不仅简化了水体检测设备,降低了能源的消耗,而且操作简便,响应更灵敏,检测结果可视化,检测成本更低。

[0005] 本发明解决上述技术问题采取的技术方案如下。

[0006] 基于生物阳极/普鲁士蓝阴极的自供能可视化检测方法,步骤如下:

[0007] 步骤一、在阳极上富集稳定的产电菌或酶,得到生物阳极;

[0008] 步骤二、在ITO基底上沉积普鲁士蓝,得到PB/ITO片;

[0009] 步骤三、取双室生物传感器,先用2~200mM铁氰化钾溶液清洗阴极室,清洗液清洗阳极室,然后将阴极和步骤一得到的生物阳极分别置于阴极室和阳极室中,且阴极和生物

阳极分别连接在负载电阻的两端,数据采集器的两端也连接电阻两端,再向阳极室加入标准液,阴极室加入2~200mM铁氰化钾溶液,当数据采集器显示的电压/电流上升至稳定状态,断开电路;

[0010] 步骤四、先取出阳极室和阴极室内的溶液,用清洗液清洗阳极室,并向阳极室加入与步骤三相同的标准液,用阴极电解液清洗阴极室,并向阴极室加入阴极电解液,然后取一片PB/ITO片,测试其吸光度 Abs_0 后,用该PB/ITO片替换阴极,对阳极室除氧后,连接电路,反应1~80s后取出PB/ITO片,用去离子水冲洗,氮气吹干,测试其吸光度 Abs_{con} ,计算吸光度变化 $\delta Abs_{con} = Abs_0 - Abs_{con}$;

[0011] 步骤五、断开电路,先取出阳极室和阴极室内的溶液,用清洗液清洗阳极室,并向阳极室加入检测液,用阴极电解液清洗阴极室,并向阴极室加入阴极电解液,然后取另外一片PB/ITO片,测试其吸光度 Abs_0' ,用该PB/ITO片替换阴极,对阳极室除氧后,连接电路,再反应与步骤四相同时间后取出PB/ITO片,用去离子水冲洗,氮气吹干,立即测试其吸光度 Abs_x ,计算吸光度变化 $\delta Abs_x = Abs_0' - Abs_x$;

[0012] 步骤六、按照公式(1)计算抑制率I,依据抑制率I判断待测水样的毒性(如是否有毒、毒性大小、毒性总类等);

$$[0013] \quad I = (1 - \delta Abs_x / \delta Abs_{con}) \times 100\% \quad (1)$$

[0014] 式中, δAbs_{con} 是阳极溶液为标准液时PB/ITO片还原后的紫外吸光度变化值, δAbs_x 是阳极溶液为检测液时PB/ITO片还原后的紫外吸光度变化值;

[0015] 所述步骤三-步骤五中,阳极室内加入的液体体积相等,阴极室内加入的液体体积相等,阴极电解液为pH=6的0.1M KCl和0.1M KH_2PO_4 的水溶液;标准液为有机物、磷酸盐、微量元素、维生素和去离子水的混合物;清洗液为不含有机物的标准液;检测液为以待测水样替换去离子水的标准液。

[0016] 进一步的,将步骤四-步骤六替换为:

[0017] 步骤四、先取出阳极室和阴极室内的溶液,用清洗液清洗阳极室,并向阳极室加入与步骤三相同的标准液,用阴极电解液清洗阴极室,并向阴极室加入阴极电解液,然后用一片PB/ITO片替换阴极,对阳极室除氧后,连接电路,反应1~80s后取出PB/ITO片,用去离子水冲洗,氮气吹干,观察其颜色;

[0018] 步骤五、断开电路,先取出阳极室和阴极室内的溶液,用清洗液清洗阳极室,并向阳极室加入检测液,用阴极电解液清洗阴极室,并向阴极室加入阴极电解液,然后用另一片PB/ITO片替换阴极,对阳极室除氧后,连接电路,再反应与步骤四相同时间后取出PB/ITO片,用去离子水冲洗,氮气吹干,观察其颜色;

[0019] 步骤六、将步骤四阳极溶液为标准液时PB/ITO片还原后的颜色和步骤五阳极溶液为检测液时PB/ITO片还原后的颜色进行比较,进而判断检测液的毒性;

[0020] 所述步骤三-步骤五中,阳极室内加入的液体体积相等,阴极室内加入的液体体积相等,阴极电解液为pH=6的0.1M KCl和0.1M KH_2PO_4 的水溶液;标准液为有机物、磷酸盐、微量元素、维生素和去离子水的混合物;清洗液为不含有机物的标准液;检测液为以待测水样替换去离子水的标准液。

[0021] 进一步的,将步骤四-步骤六替换为:

[0022] 步骤四、

[0023] 4.1先取出阳极室和阴极室内的溶液,用清洗液清洗阳极室,并向阳极室加入与步骤三相同的标准液,用阴极电解液清洗阴极室,并向阴极室加入阴极电解液,然后取一片PB/ITO片,测试其吸光度 Abs_0 后,用该PB/ITO片替换阴极,对阳极室除氧后,连接电路,反应1~80s后取出PB/ITO片,用去离子水冲洗,氮气吹干,测试其吸光度 $Abs(a)$,计算吸光度变化 $\delta Abs(a) = Abs_0 - Abs(a)$;

[0024] 4.2多次重复4.1,以有机物浓度为单一变量检测有机物浓度不同的标准液,用有机物浓度不同的标准液得到的不同颜色PB/ITO片制作比色卡,并且以有机物浓度为横坐标,吸光度变化为纵坐标作标准曲线,得到线性方程(2):

$$[0025] \quad y = bx + c \quad (2)$$

[0026] 式中, b 为线性方程的斜率, c 为线性方程的截距;

[0027] 步骤五、断开电路,先取出阳极室和阴极室内的溶液,用清洗液清洗阳极室,并向阳极室加入检测液,用阴极电解液清洗阴极室,并向阴极室加入阴极电解液,然后取另外一片PB/ITO片,测试其吸光度 Abs_0' ,用该PB/ITO片替换阴极,对阳极室除氧后,连接电路,再反应与步骤四相同时间后取出PB/ITO片,用去离子水冲洗,氮气吹干,立即测试其吸光度 Abs_x ,计算吸光度变化 $\delta Abs(x) = Abs_0' - Abs_x$;

[0028] 步骤六、对照比色卡或者依据线性方程(2),得到检测液的有机物浓度,进而计算出待测水样的有机物浓度;

[0029] 所述步骤三-步骤五中,阳极室内加入的液体体积相等,阴极室内加入的液体体积相等,阴极电解液为 $pH=6$ 的 $0.1M$ KCl 和 $0.1M$ KH_2PO_4 的水溶液;标准液为有机物、磷酸盐、微量元素、维生素和去离子水的混合物;清洗液为不含有机物的标准液;检测液为以待测水样替换去离子水的标准液,且待测水样与标准液仅含有唯一种类的有机物,且两者的有机物相同。

[0030] 进一步的,将步骤四-步骤六替换为:

[0031] 步骤四、

[0032] 4.1先取出阳极室和阴极室内的溶液,用清洗液清洗阳极室,并向阳极室加入与步骤三相同的标准液,用阴极电解液清洗阴极室,并向阴极室加入阴极电解液,然后取一片PB/ITO片,测试其吸光度 Abs_0 后,用该PB/ITO片替换阴极,对阳极室除氧后,连接电路,反应1~80s后取出PB/ITO片,用去离子水冲洗,氮气吹干,测试其吸光度 $Abs(a)$,计算吸光度变化 $\delta Abs(a) = Abs_0 - Abs(a)$;

[0033] 4.2多次重复4.1,以生化需氧量为单一变量检测生化需氧量不同的标准液,用生化需氧量不同的标准液得到的不同颜色PB/ITO片制作比色卡,并且以生化需氧量为横坐标,吸光度变化为纵坐标作标准曲线,得到线性方程(2):

$$[0034] \quad y = bx + c \quad (2)$$

[0035] 式中, b 为线性方程的斜率, c 为线性方程的截距;

[0036] 步骤五、断开电路,先取出阳极室和阴极室内的溶液,用清洗液清洗阳极室,并向阳极室加入检测液,用阴极电解液清洗阴极室,并向阴极室加入阴极电解液,然后取另外一片PB/ITO片,测试其吸光度 Abs_0' ,用该PB/ITO片替换阴极,对阳极室除氧后,连接电路,再反应与步骤四相同时间后取出PB/ITO片,用去离子水冲洗,氮气吹干,立即测试其吸光度 Abs_x ,计算吸光度变化 $\delta Abs(x) = Abs_0' - Abs_x$;

[0037] 步骤六、对照比色卡或者依据线性方程(2),得到检测液的生化需氧量,根据检测液的生化需氧量计算得到待测水样的生化需氧量;

[0038] 所述步骤三-步骤五中,阳极室内加入的液体体积相等,阴极室内加入的液体体积相等,阴极电解液为pH=6的0.1M KCl和0.1M KH_2PO_4 的水溶液;标准液为有机物、磷酸盐、微量元素、维生素和去离子水的混合物;清洗液为不含有机物的标准液;检测液为以待测水样替换去离子水的标准液。

[0039] 优选的是,每1L的标准液中,含有有机物1~10000mg,0.031~1.24g NH_4Cl ,0.013~0.52g KCl,0.02452~9.808g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$,0.4576~18.304g Na_2HPO_4 ,12.5mL的微量元素和5mL的维生素,余量为去离子水;

[0040] 所述有机物为乙酸钠、葡萄糖、L-谷氨酸、果糖、木糖、蔗糖或麦芽糖中的一种或者多种;

[0041] 1L微量元素的成分为:1.5g氨基三乙酸、3.0g MgSO_4 、0.5g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、1.0g NaCl 、0.1g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.1g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.13g ZnCl_2 、0.01g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.01g $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.01g H_3BO_3 、0.025g Na_2MoO_4 、0.024g $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.025g $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,余量为去离子水;

[0042] 1L维生素浓缩100倍的成分为:0.2g维生素H、0.2g叶酸、1g维生素B6、0.5g核黄素、0.5g硫胺、0.5g烟酸、0.5g维生素B5、0.01g维生素B12、0.5g对氨基苯甲酸和0.5g硫辛酸,余量为去离子水。

[0043] 优选的是,将生物电化学系统上富集稳定的产电菌的步骤如下:

[0044] 1.1、将有机物、PBS缓冲溶液、维生素、微量元素和活性污泥上清液混合均匀,通惰性气氛5min以上或者加入溶解氧的去除剂后静置5min以上,密闭,放入10~50℃生化箱中培养,1~100天后,得到菌种;

[0045] 所述有机物、PBS缓冲溶液、维生素、微量元素和活性污泥上清液的配比为:(1~10000mg):(1~200mmol):(0.2~50mL):(0.8~100mL):(1~499mL);

[0046] 1.2、将生物电化学系统通过导线与电化学工作站连接,混合液接种到生物电化学系统中,置于10~50℃生化箱中培养,当电化学工作站采集的电流下降到正负0.00005A以内或者电压下降到正负50mV以内时更换混合液,当生物电化学系统连续两个周期电流、电压或电量的峰值不再升高,认为生物电化学系统启动成功,得到富集稳定的产电菌的生物电化学系统,取下阳极,得到生物阳极;

[0047] 所述每1L混合液含有200mmol的PBS缓冲溶液,5mL维生素,12.5mL微量元素和1~10000mg有机物,余量为菌种;

[0048] 所述生物电化学系统为MFC、MEC或M3C。

[0049] 更优选的是,所述有机物为乙酸钠、葡萄糖、L-谷氨酸、果糖、木糖、蔗糖或麦芽糖中的一种或者多种;

[0050] 200mmol的PBS缓冲液的成分为:1.24g NH_4Cl 、0.52g KCl、9.808g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 和18.304g Na_2HPO_4 ,余量为去离子水;

[0051] 1L微量元素的成分为:1.5g氨基三乙酸、3.0g MgSO_4 、0.5g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、1.0g NaCl 、0.1g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.1g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.13g ZnCl_2 、0.01g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.01g $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.01g H_3BO_3 、0.025g Na_2MoO_4 、0.024g $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、

0.025g $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,余量为去离子水;

[0052] 1L维生素浓缩100倍的成分为:0.2g维生素H、0.2g叶酸、1g维生素B6、0.5g核黄素、0.5g硫胺、0.5g烟酸、0.5g维生素B5、0.01g维生素B12、0.5g对氨基苯甲酸和0.5g硫辛酸,余量为去离子水。

[0053] 优选的是,所述在ITO基底上沉积普鲁士蓝,得到PB/ITO片的过程为:

[0054] 2.1、将ITO玻璃分别在丙酮、乙醇、去离子水中连续超声清洗20min,再在氢氧化钠的乙醇溶液中活化15min,去离子水超声洗净,去离子水冲洗,氮气吹干;

[0055] 2.2、配制电聚合普鲁士蓝的电解液,电聚合普鲁士蓝的电解液为包含0.1M KCl 、0.1M HCl 、2.5mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 和2.5mM FeCl_3 的去离子水溶液;然后以恒电位0.4V,以 Ag/AgCl 为参比电极,在ITO玻璃上电沉积普鲁士蓝膜,普鲁士蓝膜的厚度为10~1000nm,用去离子水洗去物理吸附的离子,氮气吹干,100℃加热3-24h,得到PB/ITO片。

[0056] 优选的是,所述阳极和阴极材料分别为碳布、碳纸、石墨棒、石墨毡、石墨泡沫、石墨粒或金属网。

[0057] 优选的是,对阳极室除氧的方式为:通入惰性气体或者加入L-半胱氨酸除氧,时间为30min以上。

[0058] 优选的是,重复步骤四-六,将多次检测结果取平均值,得到最终值。

[0059] 本发明的检测原理:

[0060] 如图1所示,当标准液加入阳极室,微生物(酶)降解有机物产生电子,电子通过电子媒介体、纳米导线、细胞色素C以及电子通道等传递到阳极,然后通过导线经过外电路传递到阴极,反应一段时间t后,PB被还原成普鲁士白(PW)。而当含有毒性的水样加入阳极室,毒性物质抑制微生物细胞内各种酶的活性和呼吸代谢活动(酶的活性),从而影响电子的产生和传递,致使PB还原速度减慢,反应相同时间t后,PB被还原为PW的量减少,颜色比加入无毒水样时深。据此,可根据PB颜色变化程度,来判断毒性物质对阳极微生物(酶)的抑制程度,即毒性物质毒性强弱或者浓度大小。

[0061] 当含有浓度为a的有机物的标准样加入阳极室,微生物(酶)降解有机物产生电子,电子通过电子媒介体、纳米导线、细胞色素C以及电子通道等传递到阳极,然后通过导线经过外电路传递到阴极,反应一段时间t后,PB被还原成普鲁士白(PW)。而当含有浓度为b($a > b$)的有机物的标准样加入阳极室,微生物(酶)降解有机物产生比a少的电子,致使PB还原速度减慢,反应相同时间t后,PB被还原为PW的量减少,颜色比加入a水样时深。继续加入含有有机物浓度分别为c、d、e、f的水样($a > b > c > d > e > f$),可观察到PB颜色由abcdef顺序逐渐加深,以此来判断水样中有机物浓度的多少。

[0062] 与现有技术相比,本发明的有益效果:

[0063] 本发明的可视化检测方法利用普鲁士蓝(PB)膜独特的电致变色性能及可逆的氧化还原行为,根据阳极微生物(酶)活性监测水体毒性、有机物浓度和生化需氧量变化,水体对阳极微生物(酶)活性的影响可以完全表现在PB颜色变化快慢及程度上,辅助紫外光谱仪或者荧光光谱仪还可以计算出毒性抑制率、有机物浓度和生化需氧量。

[0064] 本发明的可视化检测方法中PB/ITO还原后的PW/ITO片可再氧化恢复,利用率高,响应快(几十秒检测一个结果),灵敏度高,检测结果肉眼可见,装置简单,无需大型设备,携带更方便,检测成本更低。

附图说明

[0065] 图1为本发明的可视化检测方法的检测原理。

[0066] 图2中, (A) 为实施例1的吸收光谱图 (a-Abs₀; b-Abs_{0'}; c-Abs_x; d-Abs_{con}) ; (B) 为实施例1的比色检测。

具体实施方式

[0067] 为了进一步了解本发明, 下面结合实施例对本发明的优选实施方案进行描述, 但是应当理解, 这些描述只是为进一步说明本发明的特征和优点, 而不是对本发明专利要求的限制。

[0068] 实施例1

[0069] 双室MFC生物阳极对含1mg/L Cd²⁺人工废水的毒性检测

[0070] 步骤一、双室型MFC传感器的构建

[0071] 双室型MFC水体毒性检测装置主要包含阳极室和阴极室, 所用反应器由外方内圆的模块拼接而成, 材料为有机玻璃, 阳、阴极室空腔为直径3cm, 厚2cm的圆柱体, 容积为14.13cm³, 阳、阴极室用阳离子交换膜隔开, 板块之间用硅胶垫隔离防止渗漏, 最后用四个螺丝紧固反应器板块。阳、阴极电极材料均为石墨毡 (尺寸: 1cm×1cm, 厚3mm), 石墨毡用直径0.5mm的钛丝连接, 再用铜导线将负载电阻与钛丝相连构成闭合回路, 数据采集器连接在负载电阻两端, 数据采集器与电脑相连, 连续采集MFC电阻两端的电压。

[0072] 步骤二、菌种制备

[0073] 制备1L菌种: 1g葡萄糖, 50mM的PBS缓冲溶液647mL, 维生素5mL, 微量元素12.5mL, 通氮气30min, 加入活性污泥上清液335.5mL, 混合、密闭, 放入30℃生化箱中培养, 两周后, 菌种制备完成。

[0074] 步骤三、MFC传感器的启动

[0075] 将混合液接种到MFC阳极室 (一般加满), 阴极室加入50mM铁氰化钾溶液 (100mM的PBS配制), 外接1kΩ电阻, 连接数据采集器, 置于30℃生化培养箱中培养, 当负载电压下降到50mV以下时更换阳、阴极溶液, 当连续两个周期电压峰值不再升高, 认为MFC启动成功, 阳极上富集了稳定的产电细菌;

[0076] 每1L混合液含有含1g葡萄糖, 200mmol的PBS缓冲溶液649.2mL, 5mL维生素, 12.5mL微量元素, 余量为菌种;

[0077] 步骤二和步骤三中, 200mmol的PBS缓冲液的成分为: 1.24g NH₄Cl、0.52g KCl、9.808g NaH₂PO₄·H₂O和18.304g Na₂HPO₄, 余量为去离子水; 1L微量元素的成分为: 1.5g氨基三乙酸、3.0g MgSO₄、0.5g MnSO₄·H₂O、1.0g NaCl、0.1g FeSO₄·7H₂O、0.1g CaCl₂·2H₂O、0.1g CoCl₂·6H₂O、0.13g ZnCl₂、0.01g CuSO₄·5H₂O、0.01g AlK(SO₄)₂·12H₂O、0.01g H₃BO₃、0.025g Na₂MoO₄、0.024gNiCl₂·6H₂O、0.025g Na₂WO₄·2H₂O, 余量为去离子水; 1L维生素浓缩100倍的成分为: 0.2g维生素H、0.2g叶酸、1g维生素B6、0.5g核黄素、0.5g硫胺、0.5g烟酸、0.5g维生素B5、0.01g维生素B12、0.5g对氨基苯甲酸和0.5g硫辛酸, 余量为去离子水。

[0078] 步骤四、内阻的测定

[0079] 本实施例采用功率密度峰值法测定MFC反应器内阻R_{int}。在相同条件下, 通过变阻箱改变电路的外阻R_{ext}, 测量相应的电压值U, 然后利用公式I=U/R_{ext}计算电流。电流除以电

极面积得到电流密度,将电压对电流密度作图得到极化曲线。之后将不同外阻值下的电流密度和电压代入公式 $P=UI$ 即可得到功率密度,将功率密度对电流密度作图得到功率密度曲线。根据公式 $P_{\max}=V_{oc}^2R_{ext}/(R_{int}+R_{ext})^2$ (其中OCV为开路电压)可知,MFC系统功率输出达到峰值时,外阻等于内阻。因此,根据本实施例的功率密度曲线确定反应器的内阻约为 $500\ \Omega$ 。将外电阻调整到 $500\ \Omega$,保证MFC输出功率最大。

[0080] 步骤五、传感器稳定

[0081] 先用 50mM 铁氰化钾溶液清洗阴极室,清洗液清洗阳极室,然后阳极室加入标准液,阴极室加入 50mM 铁氰化钾溶液,当电压/电流上升至稳定状态,断开电路。

[0082] 步骤六、标准液的检测

[0083] 断开电路,先取出阳极室和阴极室内的溶液,用清洗液清洗阳极室,并向阳极室加入与步骤五相同的标准液,用阴极电解液清洗阴极室三次,并向阴极室加入阴极电解液,然后取一片PB/ITO片,测试其吸光度 Abs_0 后,用该PB/ITO片替换阴极,对阳极室除氧后,再连接电路,反应 20s 后取出PB/ITO片,用去离子水冲洗,氮气吹干,测试其吸光度 Abs_{con} ,计算吸光度变化 $\delta Abs_{con}=Abs_0-Abs_{con}$ 。

[0084] 步骤七、检测液的检测

[0085] 断开电路,先取出阳极室和阴极室内的溶液,用清洗液清洗阳极室,并向阳极室加入检测液,用阴极电解液清洗阴极室三次,并向阴极室加入阴极电解液,然后取另外一片PB/ITO片,测试其吸光度 Abs_0' ,用该PB/ITO片替换阴极,对阳极室除氧后,再连接电路,反应与步骤四相同时间后取出PB/ITO片,用去离子水冲洗,氮气吹干,立即测试其吸光度 Abs_x ,计算吸光度变化 $\delta Abs_x=Abs_0'-Abs_x$;

[0086] 步骤五-七中,阳极室内加入的液体体积相等,阴极室内加入的液体体积相等,阴极电解液为 $\text{pH}=6$ 的 $0.1\text{M}\ \text{KCl}$ 和 $0.1\text{M}\ \text{KH}_2\text{PO}_4$ 的水溶液;每 1L 的标准液中,含有葡萄糖 300mg , $0.62\text{g}\ \text{NH}_4\text{Cl}$, $0.26\text{g}\ \text{KCl}$, $4.904\text{g}\ \text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, $9.152\text{g}\ \text{Na}_2\text{HPO}_4$, 12.5mL 的微量元素和 5mL 的维生素,余量为去离子水;清洗液为不含有机物的标准液;检测液为以待测水样替换去离子水的标准液,待测水样为含有 $1\text{mg/L}\ \text{Cd}^{2+}$ 的标准液。

[0087] 步骤八、判断毒性

[0088] 按照公式(1)计算抑制率 I_1 ;

[0089] $I=(1-\delta Abs_x/\delta Abs_{con})\times 100\%$ (1)

[0090] 取另外两块吸光度相同的PB/ITO片子,按照相同操作得到 I_2 和 I_3 ,计算平均值为 $I=28.43\%$,依据抑制率可以判断水样有毒。

[0091] 实施例2

[0092] 待测水样替换为含有 $2.6\text{mg/L}\ \text{Co}^{2+}$ 的标准液,其他与实施例1相同,检测得到平均抑制率为 11.02% 。

[0093] 实施例3

[0094] 待测水样替换为含有 $3.5\text{mg/L}\ \text{Pb}^{2+}$ 的标准液,其他与实施例1相同,检测得到平均抑制率为 33.81% 。

[0095] 实施例4

[0096] 生物阳极替换为稳定运行的富集酶(葡萄糖氧化酶)的阳极,待测水样替换为含有 $5.0\text{mg/L}\ \text{Cu}^{2+}$ 的标准液,其他与实施例1相同,检测得到平均抑制率为 66.56% 。

[0097] 实施例5

[0098] 双室MFC生物阳极对含乳酸水样的比色检测

[0099] 步骤一-步骤五和实施例1相同,

[0100] 步骤六、标准曲线的获得

[0101] 6.1断开电路,先取出阳极室和阴极室内的溶液,用清洗液清洗阳极室,并向阳极室加入与步骤五相同的标准液,用阴极电解液清洗阴极室三次,并向阴极室加入阴极电解液,然后取一片PB/ITO片,测试其吸光度 Abs_0 后,用该PB/ITO片替换阴极,对阳极室除氧后,再连接电路,反应时间25s后取出PB/ITO片,用去离子水冲洗,氮气吹干,测试其吸光度 $Abs(a)$,计算吸光度变化 $\delta Abs(a) = Abs_0 - Abs(a)$;

[0102] 6.2多次重复6.1,检测有机物浓度不同的标准液,用有机物浓度不同的标准液得到的不同颜色PB/ITO片制作比色卡,并且以有机物浓度为横坐标,吸光度变化为纵坐标作标准曲线,得到线性方程:

[0103] 步骤七、检测液的检测

[0104] 断开电路,先取出阳极室和阴极室内的溶液,用清洗液清洗阳极室,并向阳极室加入检测液,用阴极电解液清洗阴极室三次,并向阴极室加入阴极电解液,然后取另外一片PB/ITO片,测试其吸光度 Abs_0' ,用该PB/ITO片替换阴极,对阳极室除氧后,再连接电路,反应与步骤四相同时间后取出PB/ITO片,用去离子水冲洗,氮气吹干,立即测试其吸光度 Abs_x ,计算吸光度变化 $\delta Abs(x) = Abs_0' - Abs_x$;

[0105] 步骤五-七中,阳极室内加入的液体体积相等,阴极室内加入的液体体积相等,阴极电解液为pH=6的0.1M KCl和0.1M KH_2PO_4 的水溶液;每1L的标准液中,含有0.62g NH_4Cl , 0.26g KCl, 4.904g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 9.152g Na_2HPO_4 , 12.5mL的微量元素和5mL的维生素,有机物乳酸的质量依次为10mg、50mg、100mg、200mg、300mg、400mg、500mg,余量为去离子水,不同有机物浓度的标准液对应的吸光度变化分别为0.07、0.08、0.12、0.15、0.18、0.21、0.22;清洗液为不含有机物的标准液;检测液为以待测水样替换去离子水的标准液,检测液中含乳酸150mg/L。

[0106] 步骤七、浓度确定

[0107] 检测液对应的吸光度变化为0.13,对照比色卡或者依据线性方程 $y = 3.4878e^{-4}x + 0.07476$, $R^2 = 0.96$,得到检测液的乳酸浓度为158mg/L,与检测液的实际浓度相差不大,可见本方法准确度较高。待测水样的浓度可以由检测液的浓度根据稀释比例计算得到。

[0108] 实施例6

[0109] M3C生物阳极对水样生化需氧量(BOD)的检测

[0110] 阳极标准液替换为,每1L的标准液中,含有0.62g NH_4Cl 、0.26g KCl、4.904g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 9.152g Na_2HPO_4 , 12.5mL的微量元素和5mL的维生素,不同标准水样的BOD依次为10mg/L、40mg/L、80mg/L、120mg/L、160mg/L、200mg/L、240mg/L、280mg/L、320mg/L,余量为去离子水,不同BOD的标准液对应的吸光度变化分别为0.04、0.05、0.08、0.10、0.14、0.17、0.19、0.21、0.22;清洗液为不含有机物的标准液;检测液为以待测水样替换去离子水的标准液,检测液的BOD为100mg/L,其他与实施例5相同。

[0111] 得到的曲线方程为 $y = 6.875e^{-4}x + 0.02429$, $R^2 = 0.98897$,检测液对应的吸光度变化为0.09,对照比色卡或者依据线性方程得到检测液的BOD为96mg/L,与实际浓度相差不

大。待测水样的BOD值可以由检测液的BOD值根据稀释比例计算得到。

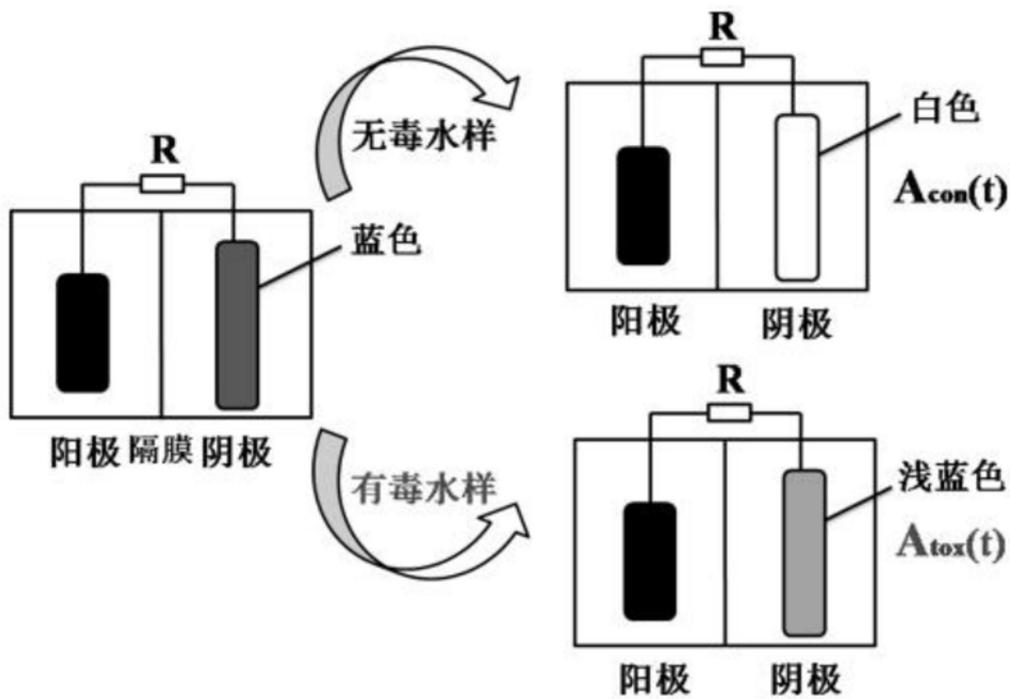


图1

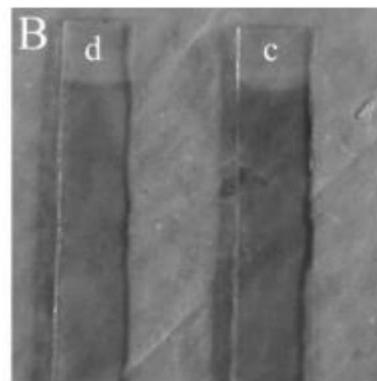
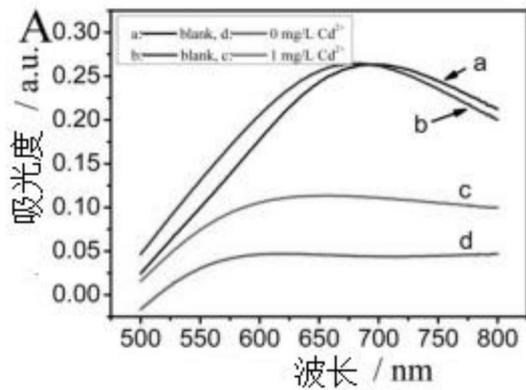


图2