

以聚中性红为介体的生化需氧量 微生物传感器的研制

周密, 颜家保*, 胡杰, 鲍彦舟, 孙玲玉

(武汉科技大学化学与化工学院, 煤转化与新型炭材料湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430081)

摘要:制备了一种用于生化需氧量检测的新型微生物传感器, 选用玻碳电极为基底电极、海藻酸钠(SA)改性的聚乙烯醇(PVA)凝胶为微生物包埋载体、地衣芽孢杆菌为固定化微生物, 将氧化还原介体中性红(NR)电聚合到微生物细胞表面形成聚中性红(PNR), 并对传感器电化学性能进行了探究。结果表明, 与微生物敏感膜内细胞结合的PNR能有效保持氧化还原性能, 从而促进微生物与电极表面的电子转移。该电极在4~24 mg/L BOD标准溶液中呈现良好的线性响应性能, 检出限2 mg/L (S/N=3), 响应时间400 s。固定化微生物存活率80%以上, 最适酸碱环境为中性, 最适温度为35℃。微生物传感电极在2个月内保持着良好的稳定性。

关键词:生化需氧量; 微生物传感器; 玻碳电极; 氧化还原介体; 聚中性红

中图分类号: X832

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2022)10-0247-05

DOI: 10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2022.10.048

Preparation of electrochemical biochemical oxygen demand biosensor mediated by polynuclear red

ZHOU Mi, YAN Jia-bao*, HU Jie, BAO Yan-zhou, SUN Ling-yu

(Hubei Province Key Laboratory of Coal Conversion and New Carbon Materials, School of Chemistry and Chemical Engineering, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430081, China)

Abstract: A novel electrochemical microbial sensor is prepared for the detection of biochemical oxygen demand. Taking glassy carbon electrode as the substrate electrode, sodium alginate (SA) modified polyvinyl alcohol (PVA) gel as a microbial carrier, bacillus licheniformis as the immobilized microorganism, and neutral red as a redox mediator is polymerized onto the surface of microbial cells to form polynuclear red (PNR). The electrochemical performance of the sensor is studied. Results show that PNR combined with cells in microbial sensitive membrane can effectively maintain redox performance, which can promote electron transfer between microorganisms and electrode surface. The electrode shows good linear response in 4–24 mg·L⁻¹ BOD standard solution, with a limit detection of 3 mg·L⁻¹ (S/N=3) and a response time of 400 s. The survival rate of immobilized microorganisms exceeds 80%. Neutral environment is the optimum for the immobilized microorganisms and the optimum temperature for the immobilized microorganisms is 35℃. This microbial sensing electrode has maintained a good stability in two months.

Key words: biochemical oxygen demand; biosensor; glassy carbon electrode; redox mediator; polynuclear red

生化需氧量(biochemical oxygen demand, BOD)表示水中微生物在生化作用下氧化分解有机物时所消耗的溶解氧量, 是水质监测中常用衡量水体中有机污染物的重要指标之一^[1]。BOD的标准分析方法^[2]检测程序烦琐, 分析时间长达5 d, 不能及时反映水体污染的情况, 难以实现在线监测^[3]。

微生物在氧化分解有机物的过程中, 溶解氧作为电子受体参与, 产生的电子转移可通过电化学测试仪器转化为电流响应信号, 通过电流信号的变化情况间接确定BOD值^[4]的方法大幅缩短了

检测耗时。然而, 水体中溶解氧浓度往往并不高(≤8 mg/L, 25℃), 导致响应信号微弱, 且溶解氧浓度易随环境因素发生变化, 影响检测结果的准确性。为了克服这些弊端, 研究者使用氧化还原介体替代水体中溶解氧, 作为微生物降解过程中的电子受体^[5]。这些氧化还原介体可以作为微生物与电极间的桥梁, 将电子从细胞内的氧化还原活性位点引导至电极表面, 进行更高效的电子转移, 提升电流响应性能。

常用的氧化还原介体包括硫堇、亚甲蓝、中性

收稿日期: 2021-11-30; 修回日期: 2022-08-09

基金项目: 湖北省科技创新专项重大项目(2017ACA179)

作者简介: 周密(1998-), 男, 硕士生; 颜家保(1964-), 男, 硕士, 教授, 研究方向为废水生物强化及深度处理, 通讯联系人, 972787445@qq.com。

红、二茂铁和铁氰化钾等^[6-7]。中性红(NR)属于碱性吩嗪染料,可于电极表面聚合形成聚中性红(PNR),具有优异的电化学可逆性,氧化还原电位为 -0.33 V ,与微生物主要代谢电子载体 NADH/NAD⁺的电位值 -0.32 V 高度相容^[8-9]。目前 PNR 修饰电极常用于对葡萄糖、谷氨酸、过氧化氢、多巴胺、DNA 等物质的测定^[10],其中 PNR 多位于电极表面。

利用改性的聚乙烯醇水凝胶作为微生物的包埋载体,将地衣芽孢杆菌固定于玻碳电极表面形成微生物敏感膜。在此基础上,进一步将 NR 引入至微生物敏感膜内细胞表面电聚合生成 PNR,形成氧化还原介体 PNR 和地衣芽孢杆菌的共固定,使得 PNR 可以与微生物细胞更紧密地接触,从而制备出了一种新型的生化需氧量微生物传感器。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

CHI760E 电化学工作站(上海辰华有限公司);DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司);3.0 mm 玻碳电极、0.5 mm×37 mm 铂丝电极、R0303 型 Ag/AgCl 参比电极(上海越磁电子科技有限公司);激光共聚焦显微镜(OlympusFV1200)。

地衣芽孢杆菌(*Bacilluslicheniformis*),购自中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC);海藻酸钠(SA,生化级),购自上海麦克林生化科技有限公司;聚乙烯醇(PVA)、中性红(NR),购自国药集团化学试剂有限公司;二乙酸荧光素(FDA,97%)、碘化丙啶(PI,94%),购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。其余试剂均为分析纯。

LB 培养基:10 g/L NaCl、5 g/L 酵母提取物、10 g/L 蛋白胨;电极检测液:0.5 mol/L KCl、5 mmol/L $\text{K}_3(\text{FeCN})_6$ 、0.05 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(PBS);8.953 5 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、3.402 3 g/L KH_2PO_4 ,pH 为 6.9;100 mg/L BOD 标准溶液^[11]:62.8 mg/L 葡萄糖、62.8 mg/L L-谷氨酸,以 PBS 为溶剂;荧光染色液:100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FDA、60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PI,以丙酮和 PBS 为溶剂^[12]。

1.2 实验方法

(1) 微生物的培养

取地衣芽孢杆菌菌种接种至 LB 培养基,置于 30℃ 恒温摇床,转速 150 r/min,培养 48 h 使其活化。

接种体积分数 1% 的活化液至 LB 培养基,恒温振荡培养 24 h,离心分离微生物细胞,并用 PBS 溶液反复洗涤菌体、离心,收集湿菌体备用。

(2) 修饰电极的制备

玻碳电极(GCE)经砂纸、 Al_2O_3 粉打磨抛光后,用无水乙醇和超纯水超声清洗,除去电极表面杂质和有机物质,于电极检测液中 CV 扫描检测电极活性。于 0.5 mol/L H_2SO_4 溶液中以 CV 法活化,用去离子水冲洗,晾干备用。

制备 SA 改性的 PVA 包埋凝胶,将湿菌体用 PBS 溶液分散后按一定比例与凝胶混合,取 5 μL 滴涂于 GCE 表面,放置于 4℃ 无菌环境 12 h 后自然凝固成膜,记为 GCE/*Bacilluslicheniformis*-PVA。

NR 聚合方法:选取工作电极置于 PBS+0.5 mmol/L NR 溶液中,以铂丝为对电极,Ag/AgCl 为参比电极,设置 CV 参数,先于 $-1.4\sim 1.8\text{ V}$ 扫描 10 圈进行电引发,再于 $-0.8\sim 0.8\text{ V}$ 扫描 10 圈进行电聚合,扫描速率 100 mV/s。

(3) 电化学测试

测试使用 CHI760E 电化学工作站,以铂丝为对电极,Ag/AgCl 为参比电极。在与 BOD 值相关的电化学测试进行之前,微生物传感电极需在测试溶液中孵育 30 min 以保持稳定。计时电流法用于电流响应值的测试,施加的电位为 -0.3 V (vs. Ag/AgCl),测试时间 400 s 以保证 $i-t$ 曲线达到稳定,测试温度 30℃。

(4) 荧光检测

中性红荧光检测:剥落传感电极上的微生物膜制作测试玻片,使用荧光显微镜分析,样品在 543 nm 波长下激发,接收红光,放大 400 倍拍摄。

微生物活性检测:将传感电极前端置于荧光染色液中避光浸泡 10 min,剥落微生物膜制作测试玻片,使用激光共聚焦显微镜(CLSM)进行荧光分析。样品在 488、559 nm 波长下激发,接收光范围 500~600 nm,放大 100 倍拍摄。

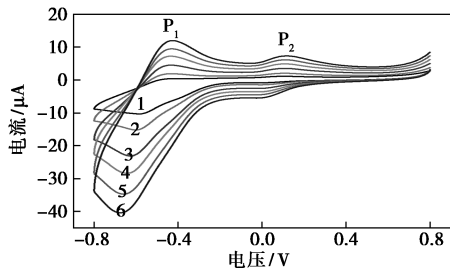
2 结果与讨论

2.1 氧化还原介体聚中性红的性能测试

探究了 2 种不同聚合方式下,PNR 作为氧化还原介体的性质。第一种聚合方式,以 GCE 为工作电极,在表面直接电聚合形成 PNR 膜,记为 GCE/PNR;第二种以 GCE/*Bacilluslicheniformis*-PVA 为工作电极,将 NR 聚合至微生物敏感膜内的细胞表面,

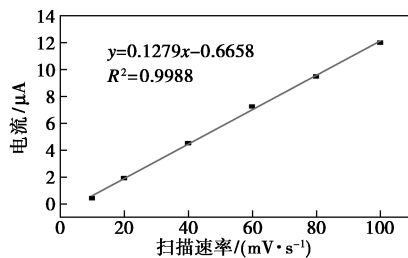
记为 GCE/*Bacilluslicheniformis*-PVA/PNR。

首先测试了 GCE/PNR 修饰电极在不同扫描速率下的 CV 曲线,以及 CV 曲线中峰电流值与扫速的关系。图 1(a) 为 GCE/PNR 在 PBS 溶液体系中的 CV 曲线,扫描电位 $-0.8 \sim 0.8$ V,扫描速率在 $10 \sim 100$ mV/s 间设置梯度。在扫描速率 100 mV/s 的 CV 曲线上,出现了 2 对明显的氧化还原峰 P_1 与 P_2 ,这显示了 GCE/PNR 电极上的氧化还原行为,随着扫描速率的减小,氧化还原峰处对应的电流值逐渐减小,峰型也逐渐趋于平缓。选取 P_1 处氧化峰的峰电流与扫速进行线性拟合,结果如图 1(b) 所示,可见峰电流与扫速的一次方呈正比,线性相关度为 0.998 8,这说明了 GCE/PNR 的电极反应为吸附过程控制。



1—10 mV/s; 2—20 mV/s; 3—40 mV/s; 4—60 mV/s;
5—80 mV/s; 6—100 mV/s

(a) 不同扫描速率下的 CV 曲线



(b) 扫描速率与响应电流值的拟合曲线

图 1 GCE/PNR 修饰电极上 PNR 的性质

图 2 显示了从 GCE/*Bacilluslicheniformis*-PVA/PNR 剥落的微生物敏感膜中,微生物细胞表面 NR 发出的红色荧光,这说明了 NR 已经聚合到了细胞表面并与其紧密结合。以 GCE/*Bacilluslicheniformis*-PVA/PNR 为工作电极进行了同样的电化学测试。从图 3(a) 可以看出,在扫速 100 mV/s 的 CV 曲线上,同样存在 2 对明显的氧化还原峰 P_1 与 P_2 ,且峰型与 GCE/PNR 的 CV 曲线中的峰型高度相似,这说明微生物细胞上的 PNR 依旧存在氧化还原性质。随着扫描速率的减小,氧化还原峰处对应的电流值同样减小,相较于 GCE/PNR 而言, P_1 峰对处峰电位

存在小幅偏移,但峰型依旧明显,这表明位于微生物膜中的 PNR 依旧存在良好的可逆性。 P_1 峰电流与扫速的线性拟合曲线如图 3(b) 所示,可见 -0.4 V 处氧化峰电流与扫速的平方根呈正比,线性相关度 0.998 8,这表明 GCE/*Bacilluslicheniformis*-PVA/PNR 的电极反应为扩散过程控制,与 GCE/PNR 相比存在差异。

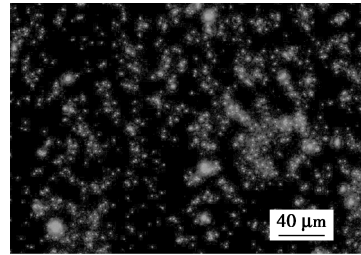
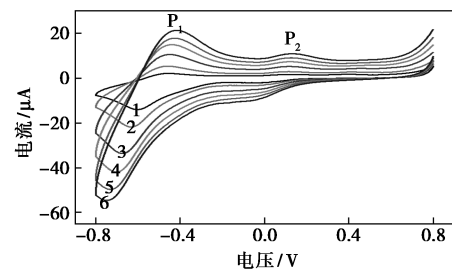
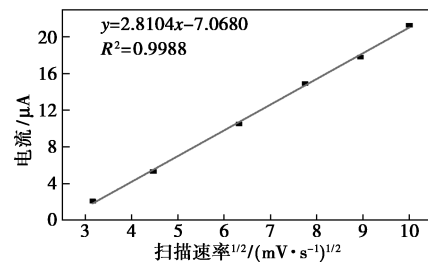


图 2 微生物敏感膜的荧光显微成像



1—10 mV/s; 2—20 mV/s; 3—40 mV/s; 4—60 mV/s;
5—80 mV/s; 6—100 mV/s

(a) 不同扫描速率下的 CV 曲线

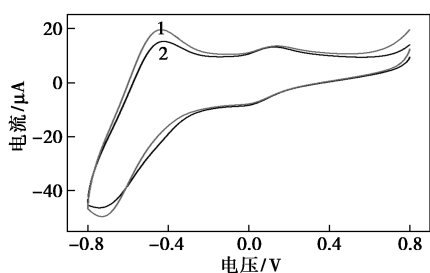


(b) 扫描速率与响应电流值的拟合曲线

图 3 GCE/*Bacilluslicheniformis*-PVA/PNR 修饰电极上 PNR 的性质

2.2 生化需氧量的响应与标准曲线的测定

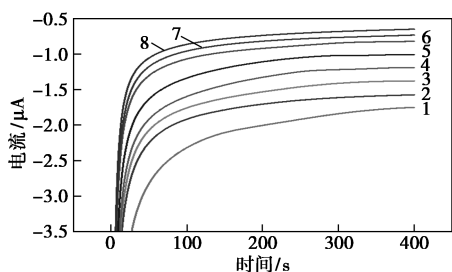
图 4 为 GCE/*Bacilluslicheniformis*-PVA/PNR 在空白溶液和 20 mg/L BOD 溶液中的 CV 曲线,扫描速率为 100 mV/s。相较于空白溶液,20 mg/L BOD 溶液中测定的 CV 曲线上, -0.4 V 处的氧化峰电流值明显增加。结果表明,固定化地衣芽孢杆菌在氧化有机底物时具有良好的呼吸代谢能力。因此,制备的微生物传感电极 GCE/*Bacilluslicheniformis*-PVA/PNR 具有良好的生化需氧量响应性能。



1—20 mg/L BOD; 2—空白溶液

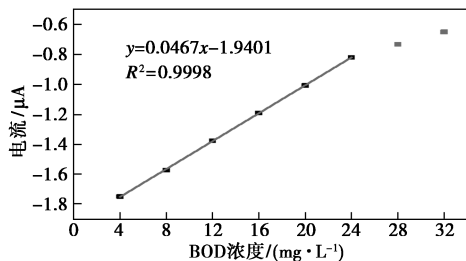
图 4 传感电极在空白溶液与 20 mg/L BOD 溶液中的 CV 曲线

图 5 为 GCE/*Bacilluslicheniformis*-PVA/PNR 在不同浓度 BOD 溶液中的 $i-t$ 曲线及电流值与浓度的拟合曲线。如图 5(a) 所示,在 4~32 mg/L BOD 浓度的溶液中,随着浓度增加, $i-t$ 曲线终电流值也相应增大,这进一步说明制备的 GCE/*Bacilluslicheniformis*-PVA/PNR 具备优良的生化需氧量传感性能。将终电流值与 BOD 浓度进行线性拟合,结果如图 5(b) 所示,在 4~24 mg/L BOD 浓度范围内,响应电流与 BOD 浓度存在良好的线性关系,线性相关度为 0.999 8。图中 28 mg/L 与 32 mg/L BOD 浓度处的响应电流值偏低,原因可能是滴涂于 GCE 表面的包埋体系中微生物的负载量存在上限的缘故。



1—4 mg/L; 2—8 mg/L; 3—12 mg/L; 4—16 mg/L; 5—20 mg/L; 6—24 mg/L; 7—28 mg/L; 8—32 mg/L

(a) 不同 BOD 浓度下的 $i-t$ 曲线



(b) BOD 浓度与响应电流拟合曲线

图 5 传感电极对不同 BOD 浓度的响应情况

2.3 电极稳定性测试与细胞活性观察

2.3.1 传感电极的稳定性

通过计时电流法测定 100 mg/L BOD 标准溶液

中的响应电流值来检测 GCE/*Bacilluslicheniformis*-PVA/PNR 的稳定性。如图 6 所示,在 61 d 内选取 17 d 进行的电极稳定性测试,响应电流值在第 1 日的测试结果相对偏低,在后续测试中趋于稳定,均在 $-1.1 \sim -0.9 \mu\text{A}$ 以内,相对标准偏差 RSD 为 4.22%。

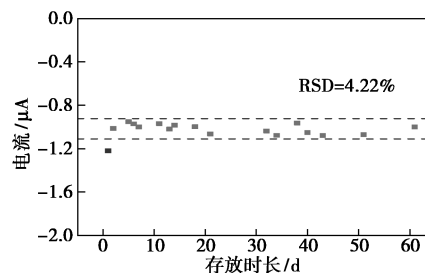
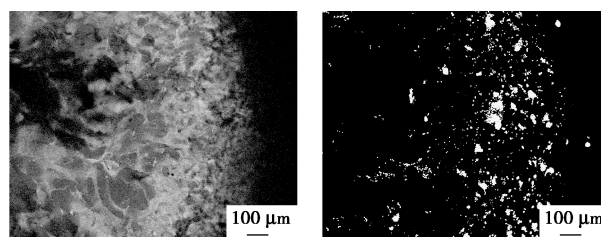


图 6 响应电流值的稳定性测试

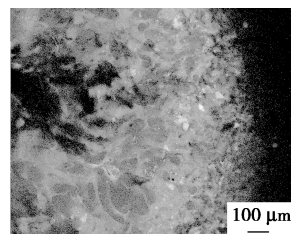
2.3.2 微生物的荧光显微成像

使用 CLSM 对染色后的微生物膜进行荧光分析,结果如图 7 所示。图 7(a) 显示了存活的地衣芽孢杆菌经 FDA 染色后发出的绿色荧光,细胞大范围均匀分布于膜内,显现出良好的活性;图 7(b) 显示了死亡的地衣芽孢杆菌经 PI 染色后发出的红色荧光,多为小范围聚集。经过图 7(c) 的红绿荧光叠加对比观察,可见 GCE/*Bacilluslicheniformis*-PVA/PNR 在存放了 30 d 后,微生物膜中的地衣芽孢杆菌依然有大部分保持着活性,存活率在 80% 以上。



(a) 存活细胞的绿色荧光

(b) 死亡细胞的红色荧光



(c) 红绿荧光叠加对比

图 7 GCE/*Bacilluslicheniformis*-PVA/PNR 在存放 30 d 后的 CLSM 荧光显微成像

2.4 电极性能影响因素的测试

pH 及温度均对微生物活性有着较大的影响,因此,探究 pH 及温度对传感电极性能的影响非常重要。

2.4.1 pH 的影响

通过测定传感电极在不同 pH 的 100 mg/L BOD 标准溶液中的电流响应值来分析 pH 的影响。不同 pH 的溶液通过改变 PBS 中 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 和 KH_2PO_4 的配比进行配置,保持 PBS 浓度始终为 0.05 mol/L。记录不同 pH 及温度下 $i-t$ 曲线终电流值,结果如图 8 所示,当溶液 pH 在 5.9~8.3 范围内, GCE/*Bacilluslicheniformis*-PVA/PNR 均有着较高的电流响应,说明此时微生物膜内的地衣芽孢杆菌活性较高。pH 为 6.9 时电流响应值达到最高,随着 pH 升高至 9.1,响应电流逐渐减小;pH 逐渐降低直至小于 5.9 时,响应电流大幅减小,说明酸性和碱性环境均会降低 GCE/*Bacilluslicheniformis*-PVA/PNR 的响应性能,酸性环境对电极性能的减幅尤为严重,微生物细胞在酸性条件下活性受到严重抑制。因此,传感电极最适的测试环境为中性。

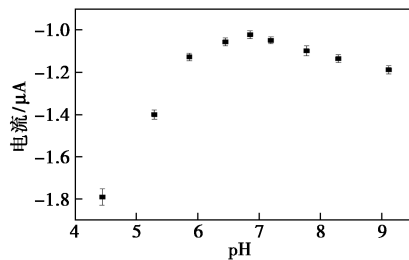
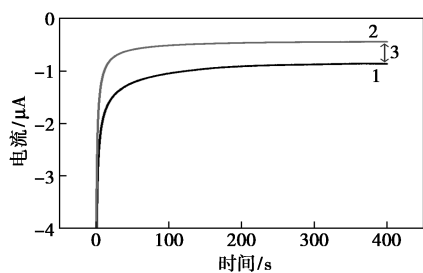


图 8 pH 对电极响应电流值的影响

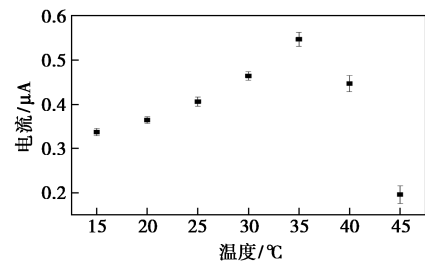
2.4.2 温度的影响

当温度变化时,溶液体系的活度也会相应变化,从而对测试电流值产生大幅影响。为了避免活度对响应电流的影响,本研究通过测定不同温度下空白溶液和 100 mg/L BOD 标准溶液中的电流响应值的差值,来体现 GCE/*Bacilluslicheniformis*-PVA/PNR 的响应性能。如图 9(a) 所示,传感电极在空白溶液和 100 mg/L BOD 标准溶液中的电流响应值存在差异。记录不同温度下的终电流差值并进行分析,结果如图 9(b) 所示,随着温度升高,响应电流差值逐



1—空白溶液;2—100 mg/L BOD;3—响应电流差值

(a) 空白溶液和 100 mg/L BOD 中的 $i-t$ 曲线



(b) 不同温度下的响应电流差值

图 9 温度对电极响应电流值的影响

渐提升,在 35 $^{\circ}\text{C}$ 时达到最高值,后大幅下降。这说明传感电极中固定的地衣芽孢杆菌在 35 $^{\circ}\text{C}$ 时有较高的活性,低温区间活性也较为低下,而过高的温度会大幅抑制微生物的活性,因此,传感电极最适测试温度为 35 $^{\circ}\text{C}$ 。

3 结论

(1) 在微生物传感电极中,固定于细胞表面的氧化还原介体 PNR 能够呈现良好的氧化还原性能,从而对电子进行传输,电极反应动力学异于裸玻碳电极表面的聚中性红,为扩散过程控制。

(2) 制备的微生物传感电极对生化需氧量有着良好的响应性能,分析测试范围为 4~24 mg/L BOD,检出限 2 mg/L,标准曲线呈现良好的线性相关性, $R^2=0.9998$ 。

(3) 微生物传感电极能够在 2 个月内的测试中保持响应电流值的稳定,响应值的相对标准偏差为 4.22%,修饰电极上固定于微生物膜内的细胞存活率达 80% 以上,最适酸碱环境为中性,最适温度 35 $^{\circ}\text{C}$ 。

参考文献

- [1] 崔行宁.基于微生物膜传感器和信息融合的海水 BOD 监测方法研究[D].秦皇岛:燕山大学,2019.
- [2] HJ 505—2009.水质五日生化需氧量(BOD₅)的测定稀释与接种法[S].
- [3] 陈长茵.微生物传感器快速测定水中 BOD 的分析研究[J].环境与可持续发展,2017,42(3):117-118.
- [4] 杨睿彬.BOD 微生物传感检测仪中生物敏感材料的研究[D].青岛:青岛理工大学,2015.
- [5] Fang D, Gao G, Yang Y, et al. Redox mediator-based microbial biosensors for acute water toxicity assessment: A critical review[J]. Chemelectrochem, 2020, 7(12): 2513-2526.
- [6] Kharkova A S, Arlyapov V A, Turovskaya A D, et al. Mediator BOD biosensor based on cells of microorganisms isolated from activated sludge[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2019, 55(2): 189-197.

(下转第 256 页)

- 醇胺[J].山东化工,2011,40(4):44-46.
- [4] 郑荣平,李格丽,林倩.气相色谱法定量分析助磨剂中的醇胺类物质[J].水泥,2014,(11):85-86.
- [5] Gamer A O, Rossbacher R, Kaufmann W, *et al.* The Inhalation toxicity of di- and triethanolamine upon repeated exposure [J]. Food Chem Toxicol, 2008, 46(6): 2173-2183.
- [6] 孙守龙,张上体,郭德宝,等.甲基橙-二甲苯氰为指示剂滴定三乙醇胺的不确定度研究[J].当代化工研究,2021,(1):148-150.
- [7] 胡玉婷.气相色谱法在助磨剂醇胺类检测中的应用[J].水泥工程,2021,(4):64-66.
- [8] Bhosale R R, Mahajani V V. Kinetics of thermal degradation of renewably prepared amines useful for flue gas treatment [J]. J Renew Sustain Ener, 2013, 5(6): 063110.
- [9] 栾琳,孙会敏.聚维酮 K90 中三乙醇胺的测定[J].中国药品标准,2018,19(1):77-80.
- [10] Sony T, Sridhar L, Sai Sachin L, *et al.* Mass spectral studies of N-oxides of chemical weapons convention-related aminoethanols by gas chromatography/mass spectrometry after silylation [J]. Eur J Mass Spectrom, 2018, 24(6): 442-453.
- [11] Ohsawa I, Seto Y. Determination of nitrogen mustard hydrolysis products, ethanolamines by gas chromatography-mass spectrometry after tert-butyltrimethylsilyl derivatization [J]. J Chromatogr A, 2006, 1122(1): 242-248.
- [12] 赵彦伟,李蕊,王海瑞,等.气相色谱-质谱法测定洗涤剂中的乙醇胺类化合物[J].分析实验室,2016,35(1):78-81.
- [13] De Ávila S G, Logli M A, Matos J R. Kinetic study of the thermal decomposition of monoethanolamine (MEA), diethanolamine (DEA), triethanolamine (TEA) and methyldiethanolamine (MDEA) [J]. Int J Greenh Gas Con, 2015, 42: 666-671.
- [14] Takeuchi A, Kitade T, Jukurogi A, *et al.* Determination method for mono- and diethanolamine in workplace air by high-performance liquid chromatography [J]. J Occup Health, 2012, 54(2): 340-343.
- [15] 陈秀. 27 种胺类物质与间甲基苯甲酰氯的衍生化特点及 LC-MS 定性分析方法[J].分析测试技术与仪器, 2016, 26(1): 28-35.
- [16] Hamzah N, Kjellberg M, Vanninen P. Optimized method for analysis of ethanolamines, hydrolysis products of nitrogen mustards, from urine samples using LC-MS/MS [J/OL]. J Chromatogr B, 2021, 1176(30). DOI: 10.1016/j.jchromb.2021.122762.
- [17] Otsuka M, Miyaguchi H, Uchiyama M. Analysis of nitrogen mustard degradation products via post-pentafluorobenzoylation liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J/OL]. J Chromatogr A, 2020, 1625(16). DOI: 10.1016/j.chroma.2020.461306.
- [18] Zhou S Q, Lin J, Qin X F, *et al.* Determination of atmospheric alkylamines by ion chromatography using 18-crown-6 as mobile phase additive [J]. J Chromatogr A, 2018, 1563(17): 154-161.
- [19] 张嫣秋,陆伟英,王嬉巧,等.离子色谱法测定化工废水中有机醇胺类化合物[J].环境监测管理与技术,2020,32(4):48-51.
- [20] 沈国军,周黎明,李楠.氮芥气及其相关化合物的气相色谱-质谱鉴定[J].分析测试学报,2007,26(4):556-558. ■

(上接第 251 页)

- [7] Zaitseva A S, Arlyapov V A, Yudina N Y, *et al.* A novel biomediator biosensor based on ferrocene and debaryomyces hansenii yeast cells [J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2017, 53(3): 381-387.
- [8] Hu J, Gao G, Xia S A Mediated BOD microsensor based on poly (neutral red) and bacteria modified interdigitated ultramicro-electrode array [J]. International Journal of Electrochemical Science, 2016, 11(7): 6387-6402.
- [9] Liu L, Zhang S, Xing L, *et al.* A co-immobilized mediator and micro-organism mediated method combined pretreatment by TiO₂ nanotubes used for BOD measurement [J]. Talanta, 2012, 93: 314-319.
- [10] 何迪.聚中性红修饰玻碳电极的制备及其在抗菌药物有效性检测中的应用[J].分析测试学报,2019,38(3):295-300.
- [11] Standard methods for the examination of water and wastewater [S]. 19th ed. American Public Health Association, Washington, D C, 1997.
- [12] 湛丽斌. FDA-PI 双色荧光法检测蓝藻细胞活性的研究[J].环境化学, 2005, 24(5): 554-557. ■

《现代化工》欢迎广大作者踊跃投稿,投稿系统:<http://www.xdhg.com.cn>