

ساخت آزمایشگاهی حسگر میکربی اندازه گیری BOD نمونه‌های پساب صنعتی

نوراله میرغفاری^۳

حمید زیلوئی^۲

بهنام مهدوی^۱

پذیرش ۹۱/۱۰/۱

(دریافت ۹۱/۱/۳۰)

چکیده

در این تحقیق یک حسگر میکربی برای اندازه گیری BOD طراحی شد. در ساختار این حسگر از یک سلول کلارک به‌عنوان ترانسفورماتور و از لجن فعال تهیه شده از تصفیه‌خانه آب و فاضلاب شاهین شهر اصفهان به‌عنوان شناساگر حسگر استفاده شد. نتایج مربوط به کالیبراسیون حسگر نشان می‌دهد رابطه خطی بین اختلاف جریان الکتریکی و غلظت محلول استاندارد گلوکز- گلوتامیک اسید، تا مقدار BOD₅ برابر با ۵۰ میلی گرم اکسیژن در لیتر برقرار است. مقدار BOD فاضلابهای ورودی و پسابهای خروجی از واحدهای تصفیه‌خانه شرکت مواد غذایی آردینه، شاهین شهر اصفهان و شرکت پگاه اصفهان توسط حسگر اندازه‌گیری شد. مقایسه نتایج به‌دست آمده از حسگر و نتایج حاصل از روش استاندارد BOD₅ نشان داد میانگین درصد خطای اندازه‌گیری BOD نمونه‌های ذکر شده توسط حسگر، برابر با ۲۹/۶ درصد است و نتایج مربوط به ارزیابی پایداری حسگر طراحی شده نشان داد مدت زمان پایداری پاسخ حسگر برابر با ۳ روز است.

واژه‌های کلیدی: حسگر زیستی، پساب صنعتی، BOD، لجن فعال، آنالیز تزریق جریان

Construction of Microbial-based Biosensor to Measure BOD of Industrial Wastewaters

B. Mahdavi¹

H. Zilouei²

N. Mirghaffari³

(Received Apr. 18, 2012 Accepted Dec. 21, 2012)

Abstract

In this study a cell-based biosensor for measurement of BOD was designed and developed. Activated sludge collected from wastewater treatment plant of Shahinshahr was used as biological receptor and a Clark cell was used as transducer. According to the results obtained from the sensor calibration, a linear relationship between the current changes and glucose-glutamic acid (GAA) standard concentrations up to 50 mg/L was observed. The BOD values of different industrial wastewaters, inlet and outlet of treatment plant of Ardineh Company (Isfahan), and also inlet and outlet of domestic wastewater treatment plant of Shahinshahr, and outlet of treatment plant of Pegah Company (Isfahan) were measured using this biosensor. Comparison of the results of this biosensor and the results of the standard BOD test (BOD₅) showed that the mean percentage error measured by the sensor was +29.6%. The results concerning the stability of the designed biosensor showed a stability time of 3 days for the response of biosensor.

Keywords: Microbial-based Biosensor, Industrial Wastewater, Biochemical Oxygen Demand (BOD), Activated Sludge, Flow Injection Analysis.

1. M.Sc. of Chemical Eng., Dept of Chemical Eng., Isfahan University of Technology, Isfahan
2. Assist. Prof. of Environmental Biotech., Dept. of Chemical Eng., Isfahan University of Technology, Isfahan (Corresponding Author) (+98 311) 3915632 hzilouei@cc.iut.ac.ir
3. Assoc. Prof., Dept. of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan

- ۱- کارشناس ارشد مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی اصفهان
- ۲- استادیار بیوتکنولوژی محیط زیست، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی اصفهان (نویسنده مسئول) ۳۹۱۵۶۳۲ (۰۲۱۱) hzilouei@cc.iut.ac.ir
- ۳- دانشیار، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان

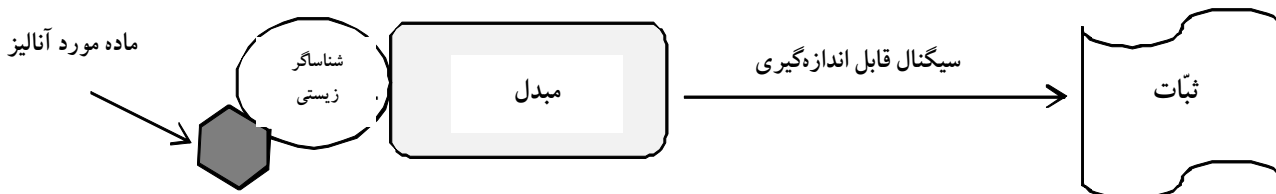
کرد. توسعه و کاربرد حسگرهای زیستی به شدت مورد توجه است زیرا در حال حاضر اشکال مختلف واکنش‌های بیوشیمیایی کاملاً شناخته شده‌اند و روشهای آنالیز بر پایه آنها در دهه‌های اخیر کاملاً توسعه یافته است.

اساس کار حسگرهای زیستی بر دو قسمت اصلی بنا شده‌اند (شکل ۱). قسمت اول شناساگر بیولوژیکی است که در واقع از خصوصیات و ویژگی‌های یک جزء بیولوژیکی برای تشخیص و شناسایی ترکیب هدف استفاده می‌شود. استفاده از جزء بیولوژیکی به‌عنوان شناساگر سبب انتخاب‌پذیری و حساسیت بالای حسگر زیستی نهایی می‌شود. قسمت دوم شامل یک میدل است که تغییرات ناشی از واکنش جزء بیولوژیکی با ترکیب هدف را به سیگنال قابل اندازه‌گیری تبدیل می‌کند. در پایان به یک ثبات برای ثبت نتایج سیگنال‌های حاصله به‌منظور بررسی و مقایسه نتایج نیاز است. از آنجا که جزء شناساگر بیولوژیکی می‌تواند سلول میکربی یا هر یک از اجزای داخل سلول مانند پروتئین، آنزیم، DNA یا حتی یک ژن موردنظر از DNA باشد، دامنه ساخت، حساسیت، انتخاب‌پذیری و کاربرد بسیار وسیع حسگرهای زیستی ایجاد می‌شود. در این کار جزء بیولوژیکی، سلول میکربی است که بر سر الکتروکد کلاک قرار گرفته و در واقع واکنش بیولوژیکی بین سلول میکربی و ترکیب هدف سبب تولید محصولاتی می‌شود که به‌وسیله الکتروکد اندازه‌گیری شده و سیگنال تولید می‌کند. در واقع سلول میکربی به‌عنوان شناساگر استفاده شده و تغییرات ناشی از واکنش بین سلول میکربی و آلاینده توسط میدل به ثبت می‌رسد [۵ تا ۷].

اولین حسگر BOD بر پایه سلول میکربی در سال ۱۹۷۷ میلادی توسط کاروب و همکاران مورد استفاده قرار گرفت. وی در طراحی حسگر خود از لجن فعال استفاده کرد [۸]. پس از آن، افراد زیادی بر روی حسگرهای BOD با میکروارگانیسم‌های مختلف کار کرده و در پی ارتقاء نتایج حسگر بوده‌اند. هیکوما و همکاران در سال ۱۹۷۹ میلادی از میکروارگانیسم *تریکوسپورون کوتانوم*^۱ در حسگر خود استفاده نموده‌اند [۹]. در سال ۱۹۸۰ میلادی،

با توسعه و رشد روز افزون صنایع و افزایش جمعیت جهانی، پساب‌های صنعتی و خانگی افزایش یافته و آلودگی‌های آلی از اجزای اصلی و اجتناب‌ناپذیر این پسابها بوده است. امروزه تعیین کیفیت آب از مهم‌ترین جنبه‌های مدیریت پساب و فرایندهای تصفیه آن محسوب می‌شود. BOD یکی از پارامترهای مورد استفاده و مهم به‌منظور تعیین آلودگی‌های آلی آب و فاضلاب است. این پارامتر از طریق اندازه‌گیری اکسیژن مورد نیاز میکروارگانیسم‌های هوازی در حین تجزیه اجزای آلی تعیین شده، و در واقع مقدار BOD بیانگر مقدار مواد آلی قابل تجزیه در نمونه پساب است [۱]. روش استاندارد اندازه‌گیری رده‌های آلی قابل تجزیه در نمونه‌های پساب، اندازه‌گیری BOD₅ است. در روش استاندارد اندازه‌گیری BOD، مدت زمان ۵ روز مورد نیاز است و به این دلیل توسعه روشهای اندازه‌گیری سریع BOD بسیار حائز اهمیت است. آنالیز و نمایش پارامترهای کیفیت آب و پساب، از جمله BOD که معیاری از ترکیبات آلی تجزیه‌پذیر زیستی است، نقش بسیار مهمی در طراحی و کنترل عملکرد بهینه فرایندهای تصفیه آب و پساب دارد. روشهای متداول اندازه‌گیری BOD، معمولاً وقت‌گیر بوده و برای اندازه‌گیری در محل و نیز نمایش لحظه‌ای و آنی BOD مناسب نیستند. در نتیجه توسعه روش جدید اندازه‌گیری BOD که شامل محدودیت‌های مذکور نباشد، احساس می‌شود. مطالعات زیادی برای به‌دست آوردن روشی که توانایی اندازه‌گیری سریع BOD را داشته باشد، صورت گرفته و حسگرهای زیستی با چنین قابلیت‌هایی پس از تلاشهای بسیار طراحی شده‌اند. حسگرهای زیستی با قابلیت اندازه‌گیری سریع آلاینده‌ها به شدت مورد توجه قرار دارند [۲-۴]. امروزه دستگاههای آنالیز پرهزینه و پیچیده همچون GC، GC-MS، HPLC، AAS، اسپکتروفتومتر و غیره موجود است که طی یک مرحله آنالیز با پیش‌فرآوری پیچیده، وقت‌گیر و خسته کننده، نتایج مناسبی می‌دهند. اما استفاده از حسگرهای زیستی در مقایسه با روشهای دیگر دارای مزایایی است که می‌توان به هزینه کم، سرعت پاسخ دهی بسیار بالا، قابلیت حمل و استفاده در محل حتی در منازل، شرایط عملیاتی بسیار ساده و حساسیت بالا اشاره

¹ *Trichosporon cutaneum*



شکل ۱- اساس کار حسگرهای زیستی (آرایش اجزای مختلف)

کولیز و همکاران بر روی حسگر BOD با میکروارگانسیم *Hansensula anamola*^۱ کار کرده‌اند [۱۰]. کاواباتا و ناکامورا در سال ۱۹۸۶ میلادی به استفاده از میکروارگانسیم *Escherichia coli*^۲ در حسگر خود پرداخته‌اند [۱۱]. در پژوهشی در سال ۱۹۸۸ از *Bacillus subtilis*^۳ در حسگر استفاده شده است [۱۲]. تمامی این محققان در پی اندازه‌گیری سریع و در عین حال دقیق BOD پساب‌های مختلف بوده‌اند و تا امروز حسگرهای زیستی به دلیل سرعت پاسخ‌دهی مناسب در طول سه دهه، ارتقا یافته‌اند. مقایسه بین حسگرهای مختلف بر مبنای نوع میکروارگانسیم مورد استفاده به عنوان شناساگر (به صورت خالص، مخلوط، باکتری و مخمر)، بر مبنای سرعت پاسخ‌دهی به تزریق نمونه، بر مبنای محدوده عملیاتی (محدوده خطی منحنی کالیبراسیون)، کمترین مقدار تشخیص آلاینده^۴ و نیز بر مبنای شرایط بهینه عملیاتی قابل مقایسه و تقسیم‌بندی هستند [۱۳].

هدف از این تحقیق، ساخت و توسعه حسگر زیستی آمپرومتریک به منظور اندازه‌گیری BOD نمونه پساب‌های واقعی بود و از سیستم آنالیز تزریق جریان برای اندازه‌گیری استفاده شد.

۲- مواد و روشها

۲-۱- لجن فعال و محیط کشت

لجن فعال به عنوان شناساگر بیولوژیکی از تصفیه‌خانه آب و فاضلاب شاهین شهر اصفهان تهیه شد و به منظور ایجاد یک مخلوط میکربی پایدار و یکنواخت، یک مرحله آماده سازی لجن فعال انجام شد. برای این منظور مقدار ۲ لیتر از لجن فعال در یک ظرف به مدت ۳ هفته هوادهی و خوراک دهی شد. هوادهی برای رسیدن اکسیژن مورد نیاز برای رشد میکرب‌ها و در عین حال برای هم زدن محیط کشت به منظور جلوگیری از ته نشینی میکرب‌ها انجام گرفت. برای هوادهی از یک پمپ هوادهی و برای خوراک‌دهی از محیط کشت با مشخصات زیر استفاده شد: ۲۰ میلی‌گرم سولفات منیزم، ۱/۵ گرم پپتون، ۶ گرم گلوکز، ۴۰ میلی‌گرم کلراید کلسیم، ۲۸۰ میلی‌گرم دی پتاسیم هیدروژن فسفات، ۷۰ میلی‌گرم کلراید سدیم و ۱/۱ گرم عصاره مخمر در یک لیتر آب مقطر و تا زمان استفاده، در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد [۱۴ و ۱۵].

۲-۲- محلول استاندارد BOD

از محلول گلوکز و گلوتامیک اسید به عنوان محلول استاندارد استفاده شد. برای ساخت این محلول مقدار ۱۵۰ میلی‌گرم از گلوکز

و ۱۵۰ میلی‌گرم از گلوتامیک اسید در یک لیتر آب مقطر حل شد. مقدار BOD این محلول طبق روش استاندارد BOD₅ برابر 200 ± 5 میلی‌گرم اکسیژن در لیتر بود. این محلول نیز تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد [۱۶-۱۹].

۲-۳- بافر فسفاتنی

بافر فسفاتنی نقش سیال حامل را ایفا می‌کند که یکی از اجزای سیستم آنالیز تزریق جریان محسوب می‌شود. سیال حامل باید به گونه‌ای انتخاب شود که هیچ‌گونه برهمکنشی با مواد موجود در سیستم و لجن فعال نداشته باشد [۲۰]. برای سیال حامل از یک بافر فسفاتنی استفاده شد. برای این کار، محلولهای ۱ مولار از پتاسیم دی هیدروژن فسفات و دی پتاسیم هیدروژن فسفات تهیه شده و در نهایت مقدار ۳۸/۵ میلی لیتر از محلول ۱ مولار پتاسیم دی هیدروژن فسفات و ۶۱/۵ میلی لیتر از محلول ۱ مولار دی پتاسیم هیدروژن فسفات مخلوط و با آب مقطر به حجم ۱ لیتر رسید. محلول بافر فسفاتنی ۰/۱ مولار با pH برابر ۷ به دست آمد.

۲-۴- نمونه‌های پساب

فاضلاب ورودی به واحد لجن فعال تصفیه‌خانه شرکت آردینه و پساب خروجی از این واحد، پساب خروجی از واحد لجن فعال تصفیه‌خانه شرکت پگاه اصفهان، فاضلاب ورودی به واحد لجن فعال تصفیه‌خانه آب و فاضلاب شاهین شهر و پساب خروجی از این واحد برای اندازه‌گیری مورد استفاده قرار گرفتند.

۲-۵- تثبیت میکروارگانسیم‌ها

برای تثبیت لجن فعال بر روی حسگر، مقدار ۵۰ سی سی از محیط کشت لجن فعال به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. رسوب ایجاد شده توسط بافر فسفاتنی تهیه شده، برای دو تا سه مرتبه شستشو داده شد و مجدداً به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ، و مقداری از رسوب حاصل بر روی غشاء نایلونی قرار داده شد و سپس غشاء نایلونی بر روی حسگر نصب شد [۱ و ۱۴].

۲-۶- طراحی حسگر

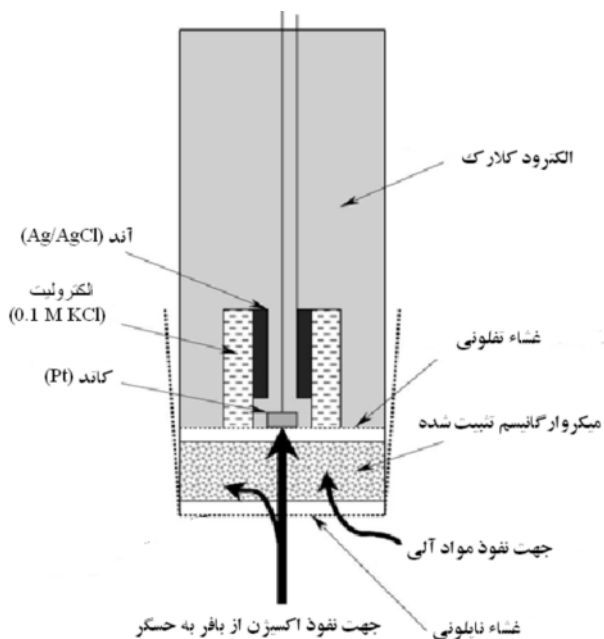
به منظور ساخت حسگر BOD، ابتدا یک الکتروود کلارک طراحی و ساخته شد. در الکتروود مورد نظر از یک سیم نقره‌ای به عنوان الکتروود مرجع و از یک سیم پلاتینی به عنوان الکتروود در حال کار استفاده شد. پلاتین در یک لایه پلاستیکی قرار گرفت و سیم نقره‌ای به دور آن پیچیده شد به گونه‌ای که هیچ تماس مستقیمی بین نقره و پلاتین برقرار نگردد. مجموعه دو الکتروود در یک محفظه پلاستیکی

^۱ *Hansensula anamola*

^۲ *Escherichia coli*

^۳ *Bacillus subtilis*

^۴ Detection Limit



شکل ۲- اجزا و ساختار حسگر میکروبی BOD [۱۲]

به‌عنوان بدنه سلول کلارک قرار گرفت و در انتهای محفظه پلاستیکی، یک غشاء نفلونی به‌کمک یک درپوش تعبیه شد. این غشاء تنها اجازه عبور هوا به داخل سلول را می‌دهد [۱۴]. از کلراید پتاسیم با غلظت ۰/۱ مولار به‌عنوان الکترولیت استفاده شد [۱۶ و ۲]. با توجه به نشت الکترولیت از غشاء در طول زمان و نیاز به تزریق مجدد الکترولیت به داخل سلول، یک مجرا در بالای سلول برای تزریق الکترولیت تعبیه شد. ساخت سلول کلارک به‌گونه‌ای انجام شد که هیچ‌گونه راه نفوذ هوا (جز از طریق غشاء) به داخل سلول وجود نداشته باشد. در نهایت از یک غشاء نایلونی استفاده شد. این غشاء که تنها اجازه عبور مواد آلی را از سیال حامل به داخل سلول می‌دهد، در انتهای سلول و بر روی درپوش نصب شد به‌گونه‌ای که قابل تعویض باشد [۲۱]. عمل تثبیت لجن فعال بر روی این غشاء انجام می‌شود. پس از ساخت حسگر، یک سل از جنس شیشه به‌منظور جاسازی حسگر در آن، ساخته شد. شمایی از این حسگر در شکل ۲ نشان داده شده است.

۲-۷- روش اندازه‌گیری

برای فرایند اندازه‌گیری BOD از سیستم آنالیز تزریق جریان (FIA) استفاده شد. در ساختار این سیستم از یک پمپ پرستالتیک واتسون مارلو ساخت کشور انگلستان^۱، دستگاه پتانسیواستات^۲، پمپ هوادهی^۳ و یک رایانه برای ثبت نتایج استفاده شد. شمایی از این سیستم در شکل ۳ نشان داده شده است. پس از اتصال اجزای مختلف سیستم، بافر فسفاتی که در یک منبع توسط پمپ هوادهی، به‌خوبی هوادهی می‌شود، به‌کمک پمپ پرستالتیک به سیستم پمپاژ می‌شود. حسگر میکروبی با سیم‌های رابط به پتانسیواستات وصل می‌شود و پتانسیلی برابر با ۶۵۰- میلی‌ولت از طرف پتانسیواستات به حسگر اعمال می‌شود. پس از تثبیت لجن بر روی غشاء نایلونی و نصب بر روی حسگر و نیز هوادهی بافر فسفاتی با یک شدت هوادهی مناسب، شدت جریان پمپ پرستالتیک بر روی ۰/۹ میلی‌لیتر بر دقیقه تنظیم شد.

پس از برقراری تمام اتصالات بین حسگر، پتانسیواستات و رایانه و روشن کردن آنها، مشخصات روش جریان‌سنج توسط یک نرم‌افزار^۴ به دستگاه پتانسیواستات وارد شد. مهم‌ترین پارامتر موجود در این نرم‌افزار، پتانسیل اعمال شده به حسگر از طرف پتانسیواستات است که مقدار این پتانسیل برابر با ۰/۶۵- ولت

ثابت شد. خروجی حسگر که به‌کمک نرم‌افزار و دستگاه پتانسیواستات ثبت می‌شود، یک منحنی جریان الکتریکی- زمان است. برای اینکه جریان الکتریکی خروجی از حسگر به یک مقدار پایا برسد، لازم است مدت زمانی در حدود ۱ تا ۳ ساعت به سیستم فرصت داده شود. پس از این که جریان الکتریکی خروجی از حسگر به‌مدت حداقل ۳۰ دقیقه ثابت ماند، سیستم آماده اندازه‌گیری است.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- کالیبراسیون حسگر

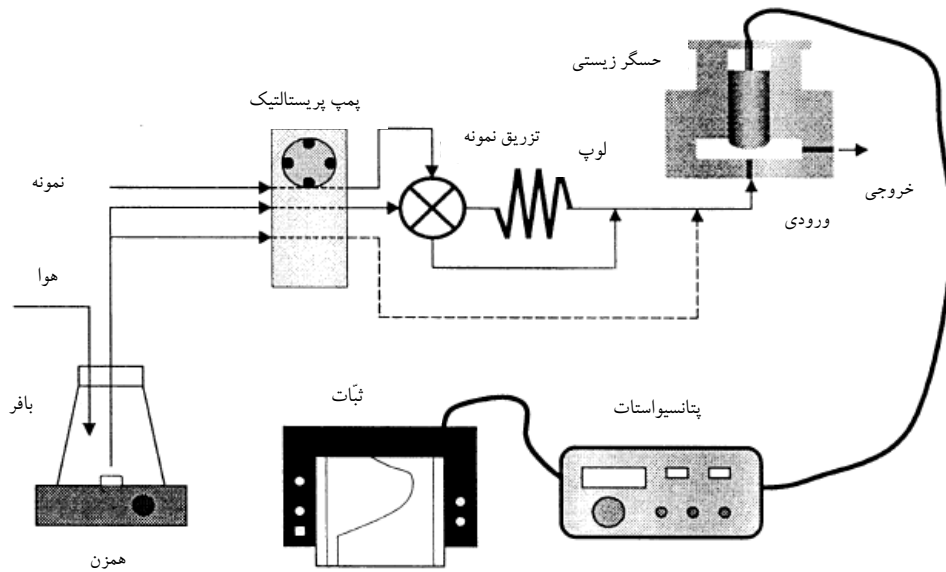
کالیبره کردن حسگر اساسی‌ترین و مهم‌ترین مرحله اندازه‌گیری BOD است. برای کالیبراسیون از محلول استاندارد GGA استفاده شد. رقیق‌سازی محلول استاندارد به‌گونه‌ای انجام شد تا محلولهایی با BOD_5 برابر با ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰، ۱۱۰، ۱۲۰ و ۱۳۰ میلی‌گرم اکسیژن در لیتر به‌دست آید. در راه‌اندازی سیستم، مقدار حجم لجن فعال تثبیت شده بر روی غشاء نایلونی برابر با ۵۰۰ میکرو لیتر، شدت جریان سیال حامل برابر با ۰/۹ میلی لیتر بر دقیقه و pH سیال حامل برابر با ۷ انتخاب شد. پس از آن برای هر یک از محلولهای به‌دست آمده، فرایند اندازه‌گیری انجام شد. برای اندازه‌گیری نمونه‌های استاندارد، مقدار ۳ میلی لیتر از محلول مورد نظر در ورودی پمپ تزریق شد. برای تمامی نمونه‌ها، مقدار پاسخ حسگر و یا به‌عبارتی اختلاف جریان الکتریکی (ΔI) بین دو حالت پایای قبل و بعد از تزریق نمونه،

¹ 401U/DM2, Watson-Marlow, UK

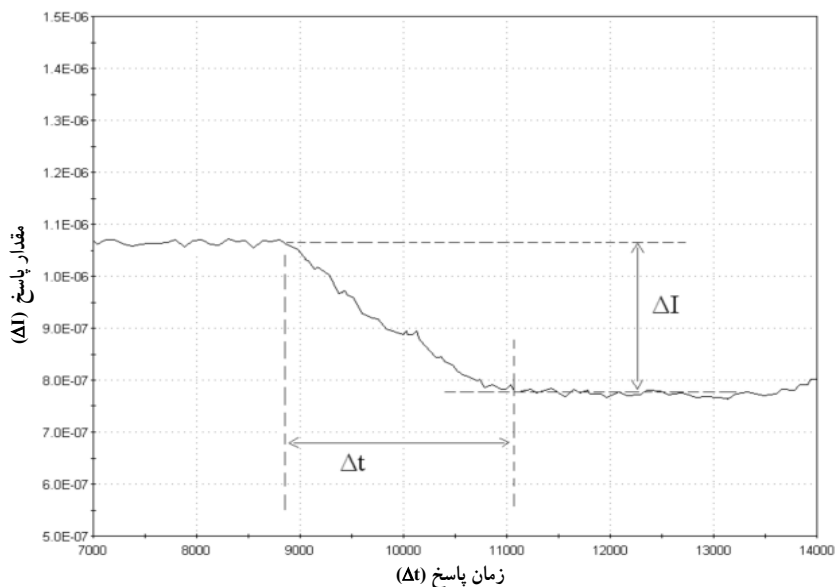
² Potentiostat /Galvanostat Model 273, EG&G Instrument

³ Aco-5505, HAILEA

⁴ Electrochemistry Power Suite Software



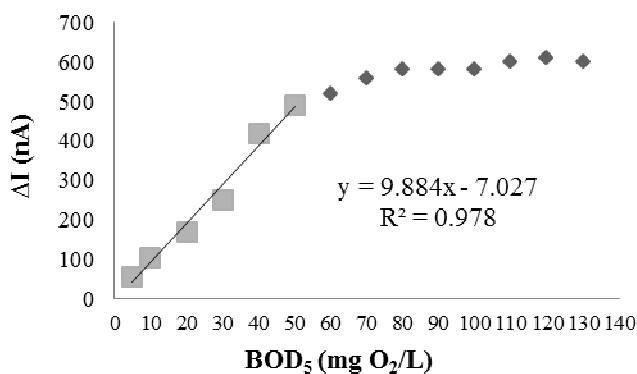
شکل ۳- سیستم آنالیز تزریق جریان به همراه حسگر زیستی [۵]



شکل ۴- مقدار پاسخ (ΔI) و زمان پاسخ (Δt) در منحنی جریان الکتریکی خروجی از حسگر در مقابل زمان

همان‌طور که در شکل ۵ دیده می‌شود، بهترین محدوده خطی برای مقادیر BOD_5 بین ۵ تا ۵۰ میلی‌گرم در لیتر با ضریب همبستگی ۰/۹۷۸ به دست آمده است. بنابراین این حسگر توانایی اندازه‌گیری نمونه‌هایی را دارد که مقدار BOD_5 آنها در این محدوده باشد. به ازای نمونه‌هایی با BOD_5 بالاتر از ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، مقدار پاسخ حسگر از ۶۰۰ تا ۶۱۰ nA تجاوز نخواهد کرد. بنابراین برای نمونه‌هایی که مقدار BOD_5 آنها بالاتر از محدوده خطی باشد، لازم است عملیات رقیق‌سازی انجام شود.

اندازه‌گیری شد. نمونه‌ای از خروجی حسگر (منحنی جریان الکتریکی- زمان) در شکل ۴ دیده می‌شود. در نهایت با استفاده از مقادیر اختلاف جریان الکتریکی برای هر یک از نمونه‌ها، منحنی کالیبراسیون یا به عبارتی منحنی $\Delta I-BOD_5$ حاصل و از روی نمودار، محدوده خطی اندازه‌گیری تعیین شد. محدوده خطی به دست آمده، محدوده‌ای است که اندازه‌گیری دقیق BOD_5 در آن میسر خواهد بود [۱۴، ۱۷ و ۲۲]. نتایج به دست آمده به صورت منحنی کالیبراسیون در شکل ۵ نمایش داده شده است.



شکل ۵- منحنی کالیبراسیون حسگر BOD₅ (حجم لجن فعال تثبیت شده برابر ۵۰۰ میکرو لیتر، شدت جریان سیال حامل برابر ۰/۹ میلی لیتر بر دقیقه و pH سیال حامل برابر ۷)

رسیدن حسگر به حالت پایا نیاز خواهد بود. در عوض از انباشتگی ترکیبات در لایه میکربی حسگر جلوگیری می شود [۱۳ و ۱۴]. در تحقیقات صورت گرفته با روش اندازه گیری حالت پایا، زمان پاسخ در محدوده ۱۳ تا ۲۰ دقیقه برای میکروارگانیسم های خالص و زمان پاسخ حدود ۳۰ دقیقه برای مخلوط میکربی گزارش شده است [۱۳].

۲-۳- اندازه گیری BOD نمونه های واقعی و مقایسه نتایج با

نتایج روش استاندارد BOD₅

برای اندازه گیری BOD نمونه ها، پس از برقراری حالت پایای اولیه، مقدار ۳ میلی لیتر از هر یک از نمونه ها در ورودی پمپ تزریق و پس از برقراری حالت پایای ثانویه، مقدار پاسخ حسگر، اندازه گیری شد. اندازه گیری صحیح، زمانی انجام می شود که BOD نمونه ها در محدوده خطی باشد، اما از آنجا که مقدار BOD نمونه ها نامشخص است، برای هر یک از آنها رقیق سازی تا رسیدن مقدار پاسخ حسگر در محدوده خطی انجام شد. در تمام اندازه گیری ها، مقدار حجم لجن تثبیت شده برابر با ۵۰۰ میکرو لیتر، شدت جریان سیال حامل برابر با ۰/۹ میلی لیتر بر دقیقه و pH سیال حامل برابر با ۷ انتخاب شد. نتایج به دست آمده در جدول ۲ نشان داده شده است. خطای حاصل در مقایسه با مقادیر استاندارد برای نمونه های آردینه و پگاه کمتر از مقدار خطای اندازه گیری برای نمونه تصفیه خانه آب و فاضلاب بود که دلیل آن می تواند سبک تر بودن اجزاء در پسابهای آردینه و پگاه در مقایسه با پساب تصفیه خانه آب و فاضلاب باشد. مجموع نتایج به دست آمده بیانگر این مطلب است که مقادیر BOD به دست آمده از حسگر کمتر از مقادیر استاندارد BOD₅ است. دلیل این مطلب این است که در روش استاندارد BOD₅، فرایند تجزیه اجزاء آلی موجود در نمونه در مدت زمان ۵ روز انجام می شود، در حالی که

به طور کلی، محدوده خطی برای حسگرهای BOD، پارامتر ثابتی نبوده و وابستگی شدیدی به چگونگی آماده سازی حسگر دارد. نوع و مقدار میکروارگانیسم تثبیت شده، فرایند تثبیت، نوع محلول استاندارد و غیره تأثیر زیادی بر محدوده خطی در منحنی کالیبراسیون دارد [۱۴، ۱۷ و ۲۲]. محدوده خطی اندازه گیری برای حسگرهای BOD با میکروارگانیسم های مختلف در جدول ۱ مقایسه شده است.

جدول ۱- محدوده خطی عملکرد چند نمونه مختلف حسگر زیستی BOD

محدوده خطی (mg O ₂ / L)	میکرب تثبیت شده
۶-۱۸	سیتروباکتر و انتروباکتر ^۱
< ۶۰	تریکوسپرون کوتانیوم ^۲
۴-۱۰۰	تریکوسپرون کوتانیوم
۱-۴۵	هانسنولا آنومالا ^۳
۱-۳۰	سودوموناس ^۴
۱-۴۰	سودوموناس پوتیدا ^۵
< ۴۴	کلبسیلا اکستیوکا ^۶
۲-۲۲	باسیلوس سابتیلیس ^۷
۲-۵۵۰	آرزولا ادنیووران ^۸
< ۸۰	باسیلوس سابتیلیس و باسیلوس لیچنفرمیس ^۹
< ۶۰	لجن فعال

همان طور که در شکل ۴ دیده می شود، زمان پاسخ حسگر حدود ۳۰ دقیقه است. زمان پاسخ در حسگرهای BOD، علاوه بر پارامترهای هیدرولیکی مانند شدت جریان بافر، pH و مقدار تزریق نمونه و پارامترهای میکربی مانند نوع و مقدار میکروارگانیسم تثبیت شده و خالص یا مخلوط بودن نمونه میکربی تثبیت شده، به تکنیک استفاده شده برای اندازه گیری و کالیبراسیون حسگر بستگی دارد. زمان پاسخ در روش حالت پایا بیشتر از زمان پاسخ در روش سرعت اولیه است. در روش حالت پایا که در این تحقیق استفاده شد، به حسگر فرصت رسیدن به حالت پایا داده می شود. لذا هر چه مقدار BOD موجود در نمونه بیشتر باشد، مدت زمان بیشتری برای

¹ *Citrobacter sp. And Enterobacter sp.*

² *Trichosporon cutaneum*

³ *Hansenula anomala*

⁴ *Pseudomonas sp.*

⁵ *Pseudomonas putida*

⁶ *Klebsiella oxytoca AS1*

⁷ *Bacillus subtilis*

⁸ *Arxula adenivorans LS3*

⁹ *B. subtilis + B. licheniformis*

تخمین سریع مقادیر BOD نمونه‌های مختلف در مدت زمان بسیار کم است. بنابراین انتظار نمی‌رود نتایج به‌دست آمده از حسگرهای زیستی برای اندازه‌گیری BOD با نتایج روش استاندارد BOD₅ تطابق کامل داشته باشد، بلکه تکرارپذیری نتایج در این حالت باید مناسب باشد.

۳-۳- بررسی پایداری حسگر میکربی BOD

پایداری حسگر BOD از طریق بررسی تغییرات روزانه مقدار پاسخ حسگر بررسی شد. برای این کار از سه نمونه محلول استاندارد رقیق شده با مقادیر BOD₅ برابر با ۱۰، ۳۰ و ۵۰ میلی‌گرم اکسیژن در لیتر استفاده شد. مقدار ۳ میلی‌لیتر از هر یک از نمونه‌ها به سیستم تزریق و پس از برقراری حالت پایای ثانویه، مقدار پاسخ حسگر اندازه‌گیری شد. این عملیات به‌صورت روزانه و در طول مدت ۱۰ روز انجام شد. سپس برای هر یک از نمونه‌ها، نموداری ترسیم شد که محور عمودی آن مقدار پاسخ حسگر و محور افقی آن زمان (روز) است. همانطور که در شکل ۶ دیده می‌شود، برای هر سه نمونه مقدار پاسخ حسگر در روز چهارم افت شدیدی پیدا می‌کند. برای نمونه‌ها با BOD₅ برابر با ۱۰ و ۳۰ میلی‌گرم در لیتر، از روز هفتم به بعد، برای نمونه با BOD₅ برابر با ۵۰ میلی‌گرم در لیتر از

زمان در دسترس برای میکرب‌های تثبیت شده در حسگر در حدود چند دقیقه است. بنابراین، مدت زمان کافی برای تجزیه تمام مواد آلی به‌خصوص مواد آلی سنگین‌تر را نداشته و در نتیجه مقدار BOD حاصل از حسگر کمتر از مقدار حاصل از روش استاندارد BOD₅ است. با توجه به بهترین مقادیر به‌دست آمده برای هر یک از نمونه‌ها، میانگین خطای اندازه‌گیری حسگر برابر ۲۶/۹۱ درصد است.

انحراف نتایج به‌دست آمده حسگر از نتایج روش استاندارد BOD₅ دو دلیل عمده دارد. دلیل اول، زمان بسیار کم در دسترس میکرب‌های تثبیت شده بر روی حسگر به‌منظور تجزیه مواد آلی است. در روش استاندارد BOD₅، میکروارگانیسم‌ها مدت زمانی برابر با پنج روز برای تجزیه مواد آلی موجود در نمونه دارند و قطعا میکروارگانیسم‌ها در مدت زمان چند دقیقه قادر به تجزیه تمام مواد آلی به‌خصوص مواد سنگین نیستند. دلیل دوم انحراف نتایج، تفاوت محلول استاندارد استفاده شده و پسابهای واقعی است. در این کار از محلول GGA (ترکیبی از گلوکز و گلوتامیک اسید) به‌عنوان محلول استاندارد استفاده شده است که قطعا تفاوت بسیار زیادی بین ترکیبات موجود در محلول استاندارد و ترکیبات پیچیده موجود در نمونه‌های واقعی وجود دارد. اندازه‌گیری BOD توسط حسگرهای زیستی، روش تقریبی و سریعی است که هدف آن

جدول ۲- نتایج حاصل از حسگر و روش استاندارد برای مقدار BOD چند پساب واقعی

BOD حسگر (mg/L)		BOD ₅ ^a (mg/L)	نوع پساب
مقدار BOD ^b	درصد نمونه مصرفی		
۲۷۶	۴	۳۶۰	پساب ورودی به واحد لجن فعال تصفیه‌خانه شرکت آردینه
۲۵۳	۸		
۲۸۴	۱۲		
۱۴۷	۵	۱۹۱	پساب خروجی از واحد لجن فعال تصفیه‌خانه شرکت آردینه
۱۵۶	۱۵		
۱۲۸	۲۵		
۱۲۴	۵	۲۷۱	پساب ورودی به واحد لجن فعال تصفیه‌خانه آب و فاضلاب شاهین شهر
۱۳۸	۱۰		
۱۴۶	۱۵		
۱۱۸	۵	۱۸۸	پساب خروجی از واحد لجن فعال تصفیه‌خانه آب و فاضلاب شاهین شهر
۱۰۸	۱۵		
۱۲۷	۲۵		
۲۴۵	۵	۳۱۰	پساب خروجی از واحد لجن فعال تصفیه‌خانه شرکت پگاه اصفهان
۲۷۷	۱۰		
۲۵۵	۱۵		

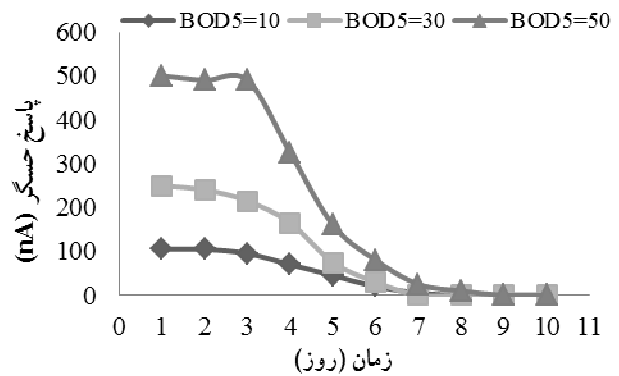
^a مقدار اندازه‌گیری شده BOD با روش استاندارد ۵ روزه.

^b مقدار اندازه‌گیری شده BOD توسط حسگر به‌دست آمده در این مقاله.

پاسخ در مدت زمان کم است. از آنجا که مدت زمان اندازه‌گیری در روش استاندارد BOD_5 ، برابر با پنج روز است، زمان پاسخ در حد چند دقیقه بسیار مطلوب است. زمان پاسخ حسگر طراحی شده در حدود ۳۰ دقیقه به دست آمد و با توجه به اینکه از روش حالت پایا برای اندازه‌گیری نمونه‌ها استفاده شد، زمان پاسخ حسگر مقداری مناسب و معقول به نظر می‌رسد. محدوده خطی برای حسگرهای BOD بسیار متنوع است که بستگی به شناساگر بیولوژیکی مورد استفاده در ساختار آنها دارد، ولی در مجموع، معمولاً محدوده کوتاهی را پوشش می‌دهند. محدوده خطی برای حسگر طراحی شده در بازه ۵ تا ۵۰ میلی‌گرم اکسیژن در لیتر به دست آمد که در بین حسگرهای BOD، محدوده مناسب تلقی می‌شود. مقدار BOD اکثر نمونه‌های واقعی، بالاتر از محدوده خطی به دست آمده است، بنابراین لازم است فرایند رقیق سازی نمونه‌ها به گونه‌ای انجام شود تا مقدار پیک جریان الکتریکی به دست آمده در محدوده خطی یعنی محدوده ۵۵ تا ۴۹۰ قرار گیرد. زمان پایداری برای این حسگر کمتر از چهار روز بود. لازم است پس از چهار روز استفاده از حسگر، لجن فعال تثبیت شده تعویض شود. از آنجا که فرایند تثبیت لجن فعال، فرایندی ساده و سریع است، تعویض لجن تثبیت شده بعد از چند روز را نمی‌توان مشکل اساسی به‌شمار آورد.

۵- قدردانی

از صندوق حمایت از پژوهشگران ریاست جمهوری به دلیل تامین مالی پروژه و از آزمایشگاه محیط زیست دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان به دلیل اندازه‌گیری استاندارد BOD_5 تشکر و قدردانی می‌شود.



شکل ۶- بررسی پایداری حسگر با ثبت تغییرات روزانه پاسخ حسگر

روز نهم به بعد هیچ‌گونه پاسخی از حسگر دیده نمی‌شود که علت آن از بین رفتن میکروب‌های تثبیت شده است. همانطور که انتظار می‌رفت، پایداری حسگر BOD که در آن از لجن فعال استفاده می‌شود، بسیار پایین بوده و تعویض لجن فعال تثبیت شده پس از سه روز امری ضروری است. از آنجا که فرایند تثبیت لجن فعال بر روی حسگر نیازمند زمان کم و فرایند ساده است، تعویض لجن تثبیت شده بعد از چند روز را نمی‌توان مشکل اساسی به‌شمار آورد. با توجه به اینکه اندازه‌گیری BOD یک نمونه توسط این حسگر، به مدت زمانی در حدود ۴ تا ۵ ساعت نیاز دارد (با احتساب زمان لازم برای رسیدن به شرایط پایای اولیه)، پایداری سه روزه این حسگر، کافی به نظر می‌رسد.

۴- نتیجه گیری

یکی از اساسی‌ترین اهداف طراحی حسگرهای BOD، دسترسی به

۶- مراجع

- 1- Rastogi, S., Kumar, A., Mehra, N. K., Makhijani, S. D., Gangal, V., and Kumar, R. (2003). "Development and characterization of a novel immobilized microbial membrane for rapid determination of biochemical oxygen demand load in industrial wastewater." *Biosens. Bioelectron*, 18(1), 23-29.
- 2- Jia, J., Tang, M., Chen, X., Qi, L., and Dong, S. (2003). "Co-immobilized microbial biosensor for BOD estimation based on sol-gel derived composite material." *Biosens. Bioelectron*, 18(8), 1023-1029.
- 3- Chang, I. S., Jang, J. K., Gil, G. C., Kim, M., Kim, H. J., and Kim, B. H. (2004). "Continuous determination of biochemical oxygen demand using microbial fuel cell type biosensor." *Biosens. Bioelectron*, 19(6), 607-613.
- 4- Oota, S., Hatae, Y., Amada, K., Koya, H., and Kawakami, M. (2010). "Development of mediated BOD biosensor system of flow injection mode for shochu distillery wastewater." *Biosens. Bioelectron*, 26(1), 262-266.
- 5- Lei, Y., Chenb, W., and Mulchandani, A. (2006). "Microbial biosensors." *Anal. Chim. Acta*, 568, 200-210.

- 6- Kumlanghan, A., Kanatharana, P., Asawatreratanakul, P., and Mattiasson, B. (2008). "Microbial BOD sensor for monitoring treatment of wastewater from a rubber latex industry." *Enzyme Microb., Technol.*, 42(6), 483-491.
- 7- Velling, S., and Tenno, T. (2009). "Different calibration methods of a microbial BOD sensor for analysis of municipal wastewaters." *Sens. Actuators B.*, 141(1), 233-238.
- 8- Karube, I., Matsunga, T., Mitsuda, S., and Suzuki, S. (1977). "Microbial electrode BOD sensors." *Biotechnol. Bioeng.*, 19(1), 153-157.
- 9- Hikuma, M., Suzuki, H., Yasuda, T., Karube, I., and Suzuki, S. (1979). "Amperometric estimation of BOD by using living immobilized yeast." *Eur. J. APPL. Microbial. Biotech.*, 8(4), 289-297.
- 10- Kulys, J. J., samaline, A.S., and Svirnickas, G. J. S. (1980). "Electron exchange between the enzyme active center and organic metal." *FEBS. Lett.*, 114 (1), 7-10.
- 11- Kawabata, N., and Nakamura, N. (1986). "New BOD sensor utilizing a functional polymer which captures microorganisms alive." In: *Abstracts of the International Symposium on New Sensor and Methods for Environmental Characterization*, Kyoto, Japan.
- 12- Riedel, K., Renneberg, R., Kuehn, M., and Sheller, F. (1988). "A fast estimation of biochemical oxygen demand using microbial sensors." *Appl. Microbial Biotech.*, 28 (3), 316-318.
- 13- Mahdavi, B. (2012). "Construction and development of cell-based biosensor to measure soluble BOD." M.Sc. Thesis, Isfahan University of Technology, Iran. (In Persian)
- 14- Liu, J., Bjornddon, L., and Mattiasson, B. (2000). "Immobilized activated sludge based biosensor for biochemical oxygen demand measurement." *Biosens. Bioelectron*, 14(12), 883-893.
- 15- Liu, J., Olsson, G., and Mattiasson, B. (2004). "Short-term BOD (BOD_{st}) as a parameter for on-line monitoring of biological treatment process Part I. A novel design of BOD biosensor for easy renewal of bio-receptor." *Biosens. Bioelectron*, 20(3), 562-570.
- 16- Rastogi, S., Rathee, P., Saxena, T. K., Mehra, N. K., and Kumar, R. (2003). "BOD analysis of industrial effluents: 5 days to 5 min." *Curr. Appl. Phys.*, 3(2-3), 191-194.
- 17- Liu, J., and Mattiasson, B. (2002). "Microbial BOD sensors for wastewater analysis." *Water Res.*, 36(15), 3786-3802.
- 18- Tan, T. C., and Lim, E. W. C. (2005). "Thermally killed cells of complex microbial culture for biosensor measurement of BOD of wastewater." *Sens. Actuators B.*, 107(2), 546-551.
- 19- Nakamura, H., Suzuki, K., Ishikuro, H., Kinoshita, S., Koizumi, R., and Karube, I. (2007). "A new BOD estimation method employing a double-mediator system by ferricyanide and menadione using the eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*." *Talanta*, 72(1), 210-216.
- 20- Bilitewski, U., and Turner, A. P. F. (2000). *Biosensors for environmental monitoring*, Harwood Academic Publishers, The Netherlands.
- 21- Dhall, P., Kumar, A., Joshi, A., Saxsena, T. K., Manoharan, A., and Kumar, R. (2008). "Quick and reliable estimation of BOD load of beverage industrial wastewater by developing BOD biosensor." *Sens. Actuators B.*, 133(2), 478-483.
- 22- Yoshida, N., Hoashi, J., Morita, T., McNiven, S. J., Nakamura, H., and Karube, I. (2001). "Improvement of a mediator-type biochemical oxygen demand sensor for on-site measurement." *J. Biotechnol.*, 88(3), 269-275.