

## • 污染防治技术 •

**编者按:**环境监测是环境科学的重要组成部分,又是涉及环境科学、工程技术、生物技术和管理学等多门科学的边缘科学。环境监测广泛应用并服务于环境保护事业和社会生活的各个方面。从事环境监测工作人员必须在掌握环境监测的技术层面的知识之外,广泛而有针对性地了解作为自己服务领域的相关知识,使其工作真正做到知己知彼,更有针对性和有效性。因此,我们增设“污染防治技术”栏目,以利于环境监测工作者拓展专业知识面。

## 基于微电极的生物膜分析技术的研究进展

周小红,施汉昌,蔡强

(清华大学环境科学与工程系 环境模拟与污染控制国家重点联合实验室,北京 100084)

**摘要:**文章介绍了一类尖端直径为  $1\mu\text{m} \sim 20\mu\text{m}$  的吸管型电化学传感器—微电极。由于其具有的较高空间分辨率,可用于废水生物处理反应器中生物膜及生物絮体内部等微环境的测试。综述了近年来微电极在生物膜微环境测试中的应用成果,并与一些其他的生物膜分析技术进行比较。探讨了微电极技术用于环境工程领域的发展前景和趋势。

**关键词:**微电极;生物膜;微环境

中图分类号: X703.1 文献标识码: B 文章编号: 1006-2009(2006)01-0032-04

### Study Process on Micro-profiles of Biofilm Determined by Microelectrodes

ZHOU Xiao-hong SHI Han-chang CAI Qiang

(State Key Joint Laboratory of Environmental Simulation and Pollution Control, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084 China)

**Abstract** Microelectrode is a kind of electrochemical sensor usually  $1\mu\text{m} \sim 20\mu\text{m}$  in diameter, with a relatively high spatial resolution. It can be used for micro-profile determination of bio-film and bio-flocs. First, the paper reviewed the recent study process on microenvironmental determination of biofilm based on microelectrodes, and then compared the technique with other usual analytical methods for bio-film. At last, the prospect and developing trend of microelectrode technique are also discussed.

**Key words** Microelectrode; Biofilm; Microenvironment

自 20 世纪 60 年代以来,微电极技术逐渐被引入到环境领域中来,最初用于废水处理反应器中生物膜内外微环境物质浓度的检测,其后逐渐应用于污泥絮体<sup>[1]</sup>、河流底泥<sup>[2]</sup>等微环境的研究。这些测试对象的厚度通常在几十微米到几毫米之间,缺乏有力的工具对其内外微环境进行表征和分析。随着微电极等技术在环境领域的应用,研究者可以对其内部微环境进行研究和表征。这一技术改变了以往只对污水生物处理进行宏观描述的状况,为深入地解析反应过程的机理,提炼出数学模型以指导过程的优化创造了条件。

#### 1 用于环境领域的微电极技术

生物膜分析中采用吸管型的微电极,深入生物膜内部测量特征参数的梯度分布。这种微电极尖端直径通常  $1\mu\text{m} \sim 20\mu\text{m}$ ,按照测量原理不同,可以分为两大类:电位型和电流型。

##### 1.1 电位型微电极

在生物膜微观分析中,有两类主要的电位型微

收稿日期: 2005-12-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(50478009)

作者简介: 周小红(1981-),女,江西进贤人,博士研究生,主要从事环境电化学方面的研究。

电极: 氧化还原电位 (ORP) 微电极和离子选择性微电极 (ISE)。

ORP 微电极测量的是微环境中水体的氧化还原能力, 用氧化还原电位值来表示, 其大小可用能斯特方程来描述:

$$E = \sum_i E_i^\ominus + \frac{RT}{nF} \sum_i \ln \left( \frac{a_{\text{ox}}}{a_{\text{red}}} \right)_i \quad (1)$$

其中:  $E$ ——氧化还原电位;

$E_i^\ominus$ ——第  $i$  种氧化还原对的标准电极电位;

$a_{\text{ox}}, a_{\text{red}}$ ——氧化剂与还原剂的活度;

$n$ ——转移电子数;

$T$ ——绝对温度;

$R$ ——摩尔气体常数;

$F$ ——法拉第常数。

ORP 微电极的制作最初采用玻璃毛细管包裹铂丝<sup>[3]</sup>, 其缺点是玻璃外柱与铂丝之间容易出现裂缝, 导致电极的控制成功率低。Zhang T. C. 等人<sup>[4]</sup>介绍了一种新的 ORP 电极控制方法, 用低熔点合金灌注玻璃毛坯, 尖端镀铂, 提高了电极的控制成功率。

另一种重要的电位型微电极是离子选择性微电极, 环境工程中广泛使用的  $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NH}_4^+$  和 pH 微电极均属于这一类。电极的离子选择性膜一侧与内参比溶液接触, 另一侧与待测溶液接触。当固定内参比溶液中的待测离子活度时, 膜两边的电势差 (膜电位) 与样品中的待测离子活度符合 Nicolsky-Eisenman 公式:

$$E = E^\ominus + \frac{RT}{z_i F} \ln [a_i + \sum_j K_{ij} (a_j)^{z_i/z_j}] \quad (2)$$

其中:  $E^\ominus$ ——电极电位常数;

$a_i, a_j$ ——待测离子活度和干扰离子活度;

$z_i, z_j$ ——待测离子和干扰离子的电荷数;

$K_{ij}$ ——电极对干扰离子的选择性系数;

$T$ ——绝对温度;

$R$ ——摩尔气体常数;

$F$ ——法拉第常数。

干扰离子种类及其选择性系数主要由离子选择性膜决定。

微电极的离子选择性膜有两类, 固态膜和液态膜。固态膜微电极以玻璃微电极为主, 优点是对干扰离子的选择性系数小、使用寿命长, 但制作过程复杂, 电极尖端直径通常在 20 $\mu\text{m}$  以上, 且可用的玻璃敏感膜种类少, 这些缺点限制了玻璃微电极在

环境领域的推广使用。相比较而言, 液态膜电极的制作过程简单, 电极尖端直径可以小至 1  $\mu\text{m}$ , 而且环境领域中常用的  $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NH}_4^+$  和 pH 微电极均有市售的液态离子选择性膜, 这使得液膜微电极的应用比较多。不同种类微电极液态膜组分见表 1。

液膜微电极拉制过程简单, 但缺点也较为突出, 包括对某些干扰离子产生的较大响应限制了液膜微电极的使用范围, 而且在实际应用过程中, 液膜中的疏水性组分容易与生物膜或生物絮体发生作用, 使得输出信号不稳定。鉴于此, De Beer 等人<sup>[5]</sup>在液态膜表面涂上蛋白质保护层, 阻隔生物膜中的疏水性干扰物质与液膜接触, 提高了电极的测量稳定性, 还能够降低液膜微电极的响应时间。

表 1 不同种类微电极液态膜组分

微电极	液态膜组分	质量分数 /%
$\text{NO}_3^-$	三(十二烷基)甲基硝酸铵	1.5
	2-硝基苯基辛基醚	16.25
	硝化纤维素, 35% 乙醇溶液	1.93
	甲基三苯基溴化膦	0.25
	高分子量聚氯乙烯	5.75
$\text{NO}_2^-$	四氢呋喃	74.32
	Aquocyanocobalt(III) - hepta(2-phenylethyl)-cobrylate	7.0
	四苯基硼酸钠	1.0
$\text{NH}_4^+$	2-硝基苯基辛基醚	92.0
	无活菌素	6.90
	四(4-氯代苯)硼酸钾	0.70
pH	2-硝基苯基辛基醚	92.4
	4-十九烷基苯啶 (ETH 1907)	6.0
	四(4-氯代苯)硼酸钾	1.0
	2-硝基苯基辛基醚	93.0

## 1.2 电流型微电极

常见的电流型微电极是溶解氧微电极, 电极的工作原理可以用极谱分析中的扩散电流理论来解释。传感器的输出电流大小与主体溶液中的溶解氧浓度成正比关系<sup>[6]</sup>。

$$i = k P_{\text{O}_2} \quad (3)$$

其中:  $P_{\text{O}_2}$ ——氧分压;

$k$ ——校准系数, 其大小与电极结构有关。

溶解氧微电极分为两大类: 分离式与组合式。分离式氧电极结构简单, 通常用玻璃吸管包裹铂丝或低熔点合金, 尖端镀金。铂丝或低熔点合金为导

电材料, 镀金层为溶解氧还原场所。自 Davis<sup>[7]</sup>报导了一支尖端直径为 200 $\mu\text{m}$  的溶解氧电极后, Whalen<sup>[8]</sup>、Linsenmeier<sup>[9]</sup> 等人均对分离式溶解氧电极进行了研究和改进, 形成了较为成熟的电极控制方法。

组合式溶解氧微电极又称为 Clark 溶解氧微电极, 是 Clark 溶解氧电极结构的一种微型化。它的优点是将参比电极与工作电极封装在同一玻璃吸管中, 尖端覆盖一层氧透过性薄膜, 内参比溶液对工作电极有屏蔽效果, 使得电极的抗干扰能力增强。1989 年, Revsbech<sup>[10]</sup> 对组合式溶解氧微电极进行了修正, 加入了保护阴极的概念, 降低了电极的残余电流并提高了电极测量信号的稳定性。

## 2 微电极在生物膜分析中的应用

微电极技术最初被引入环境领域是用于生物膜微环境的检测, 目前, 这仍然是微电极的主要应用方向。微电极能够表征生物膜内外沿深度 (与生物膜表面相垂直) 方向特征参数的梯度分布情况, 以及膜内部某深度上特征参数的变化情况, 同时能够测量生物膜厚度<sup>[11]</sup>。对微电极的测试结果进行分析, 可以提供两类参数<sup>[12]</sup>: 膜/水界面的物质传输速率与膜内部的生化反应速率。这两类参数是推导生物膜模型的重要参数, 也是考察生物膜降解能力的重要指标。

从 20 世纪 60 年代末, Bungay, H.<sup>[13]</sup> 首次将溶解氧微电极用于生物膜分析以来, 基于微电极的生物膜微观分析技术已经越来越受到人们的重视, 国外学者在这一领域进行了广泛的研究。

早期的研究多以溶解氧微电极为测试工具, 研究不同运行条件下滴滤池中生物膜内部的溶解氧浓度分布状况<sup>[13]</sup>。随着溶解氧微电极技术的成熟和完善, 电极的测试对象拓宽到环境领域中的各类生物膜反应器中, 包括生物转盘<sup>[14]</sup>、动态膜<sup>[15]</sup>等, 同时测试的内容也由膜内扩展膜/水界面<sup>[16]</sup>。通过对生物膜内外特性的测试和分析, 研究影响反应器运行的关键因素, 为优化反应器的运行提供依据。

80 年代末, 液膜微电极技术得到了很大发展, 监测指标包括硝酸盐、氨盐、亚硝酸盐、pH 等。这些微电极是研究生物膜内部硝化、反硝化的有力工具<sup>[17]</sup>, 在环境工程领域中陆续得到应用, 使得人们对生物膜内部特性的微观分析不只是停留在溶解

氧这个指标上。90 年代, 硫化物微电极、ORP 微电极相继被引入到生物膜微观分析中来<sup>[18]</sup>, 用于监测生物脱硫过程中膜内部特征参数的变化情况。至此, 除生物除磷过程外, 生物膜内部的各种生化反应都可以通过微电极来进行监测和分析。以上研究均建立在生物膜随深度方向的一维分析上。Yu T. 等人<sup>[19]</sup> 将以往的一维测试转变为三维测试, 除考察各参数随生物膜深度的分布外, 还考察了各参数在生物膜平面的分布情况。同时, 将溶解氧微电极用于现场环境的测试, 进一步拓展了微电极的测试范围。

## 3 微电极技术与其他微观分析技术的比较

生物膜具有各相异性的复杂结构, 很难用微电极技术来进行完整的表征, 其他较新的生物膜分析技术还有:

### 3.1 微切片技术

微切片技术是利用低温切片机将不同厚度的生物膜切割成几微米的薄片, 近似认为薄片内的生物膜各相均匀同性。微切片技术必须与其他方法连用, 对薄片进行分析, 如微电极技术、FISH 技术、生物膜磷脂分析技术、染色吸附法, 以及传统的分析方法等。

### 3.2 激光共聚焦显微镜技术

激光共聚焦显微镜技术 (CSLM) 是 20 世纪 90 年代初发展起来的一种技术, 它能够对生物样本进行光学断层扫描, 进行三维重建, 实现对生物膜的动态三维成像。

### 3.3 分子生物学技术

分子生物学技术包括 FISH 技术, DGGE (变性梯度凝胶电泳) 等, 分子生物学技术能够实现了对生物群落结构和群落动态变化的研究。

上述四种技术的研究点各有侧重, 只有相互结合才能获得完整地表征生物膜的信息。在四种常用技术中, 微电极技术与激光共聚焦显微镜技术对生物膜损害最小, 可以实现在线检测, 但后者的缺点也很明显, 主要是研究的生物膜不能太厚, 通常小于 200  $\mu\text{m}$ , 与成熟的生物膜厚度 (0.5 mm ~ 2.0 mm) 相差近一个数量级。相比较而言, 微电极技术的限制条件较少。

## 4 结语

微电极技术是研究生物膜及生物絮体内部微

观分析的重要工具,可以在无损或者微损的情况检测离子在微环境中的分布。分析结果能够为建立生物膜模型提供重要的两类参数,一是膜/水及膜内部的物质扩散速率常数,二是膜内部的物质生化反应速率常数。与其他生物膜微观分析技术相比,微电极技术的突出优点是对生物膜的损害程度小,测试范围广。

目前,除溶解氧电极外,环境工程领域中微电极的应用多局限于实验室规模,究其原因是微电极抗电磁干扰的能力弱,且多数电极的寿命较短,难以实现长期在线监测。但是随着微电极技术的发展与成熟,以上缺点正得到逐步解决,基于微电极的生物膜微观分析技术具有良好的应用前景。

#### [参考文献]

- [ 1 ] LENS P, DE BEER D, CRONENBERG C, *et al*. The use of micro-sensors to determine population distributions in UASB aggregates[ J]. *Water Science and Technology*, 1995, 31( 1): 273- 280.
- [ 2 ] LAURSEN A E, CARLTON R G. Responses to atrazine of respiration, nitrification, and denitrification in stream sediments measured with oxygen and nitrate microelectrodes[ J]. *Microbiology Ecology*, 1999, 29: 229- 240.
- [ 3 ] YU T. Stratification of microbial processes and redox potential changes in biofilms [ D ]. America University of Cincinnati 2000
- [ 4 ] PANG H, ZHANG T C. Fabrication of redox potential micro-electrodes for studies in vegetated soils or biofilm systems[ J]. *Environmental Science and Technology*, 1998, 32: 3646- 3652.
- [ 5 ] DE BEER D, SCHRAMM A, SANTEGOEDS C M, *et al*. A nitrite microsensor for profiling environmental biofilms[ J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63( 3): 973- 977.
- [ 6 ] LU R, YU T. Fabrication and evaluation of an oxygen micro-electrode applicable to environmental engineering and science [ J]. *Journal of Environmental Engineering and Science*, 2002, 1: 225- 235.
- [ 7 ] DAVIES P W, BRINK E. Microelectrodes for measuring local oxygen tension in animal tissues[ J]. *Review of Scientific Instruments*, 1942, 13: 524- 533.
- [ 8 ] WHALEN W J, RILEY J N A R P. A microelectrode for measuring intracellular  $P_{O_2}$  [ J]. *The American Physiological Society*, 1967, 23: 798- 801.
- [ 9 ] LENSEMEIER R A, YANCY C M. Improved fabrication of double-barreled recessed cathode  $O_2$  microelectrodes[ J]. *Journal of Applied Physiology*, 1987, 63( 6): 2254- 2257.
- [ 10 ] REVSBECH N P. An oxygen microsensor with a guard cathode [ J]. *Limnology and Oceanography*, 1989, 34( 2): 474- 478.
- [ 11 ] ZHANG T C, FU Y C, BISHOP P L. Competition for substrate and space in biofilms [ J]. *Water Environment Research*, 1995, 67( 6): 992- 1003.
- [ 12 ] HORN H, HEMPEL D C. Mass transfer coefficients for an autotrophic and a heterotrophic biofilm system[ J]. *Water Science and Technology*, 1995, 32( 8): 199- 204.
- [ 13 ] BUNGAY H R, WHALEN W J, SANDERS W M. Microprobe techniques for determining diffusivities and respiration rates in microbial slime systems[ J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1969, 11( 5): 765- 772.
- [ 14 ] NISHIDOME K, KUSUDA T, WATANABE Y, *et al*. Determination of oxygen transfer rate to a rotating biological contactor by microelectrode measurement [ J]. *Water Science and Technology*, 1994, 29( 10- 11): 471- 477.
- [ 15 ] 吴盈禧, 蔡强, 周小红, 等. 基于微电极的动态膜溶解氧在线研究方法 [ J]. *环境科学*, 2005, 26( 2): 113- 116.
- [ 16 ] ZHANG T C, BISHOP P L. Experimental determination of the dissolved oxygen boundary layer and mass transfer resistance near the fluid- biofilm interface[ J]. *Water Science and Technology*, 1994, 30( 11): 47- 58.
- [ 17 ] DE BEER D. Measurement of nitrate gradients with an ion-selective microelectrode [ J]. *Analytica Chimica Acta*, 1989, 219: 351- 356.
- [ 18 ] YU T, BISHOP P L. Stratification of microbial metabolic processes and redox potential change in aerobic microelectrodes[ J]. *Water Science and Technology*, 1998, 37( 4- 5): 195- 198.
- [ 19 ] YU T, ROSA C DE LA, LU R. Microsensor measurement of oxygen concentration in biofilms from one dimension to three dimensions[ J]. *Water Science and Technology*, 2004, 49( 11- 12): 353- 358.