Archive of SID

ساخت آزمایشگاهی حسگر میکربی اندازه‌گیری BOD نمونه‌های پساب صنعتی

بهنام مهدوی[۱] حمید زیلوئی[۲] نوراله میرغفاری[۳]

(دریافت ۹۱/۱/۳۰ پذیرش ۹۱/۱۰/۱)

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 BOD_5 برابر با ۵۰ میلی‌گرم اکسیژن در لیتر برقرار است. مقدار BOD فاضلابهای ورودی و پسابهای خروجی از واحدهای تصفیه‌خانه شرکت مواد غذایی آردینه، شاهین‌شهر اصفهان و شرکت پگاه اصفهان توسط حسگر اندازه‌گیری شد. مقایسه نتایج به‌دست آمده از حسگر و نتایج حاصل از روش استاندارد BOD_5 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. Mahdavi [1] *H. Zilouei [2]* *N. Mirghaffari [3]*

(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 (BOD_5) 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.

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 (۰۳۱۱) hzilouei@cc.iut.ac.ir

۳- دانشیار، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان

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

www.SID.ir

Archive of SID

۱- مقدمه

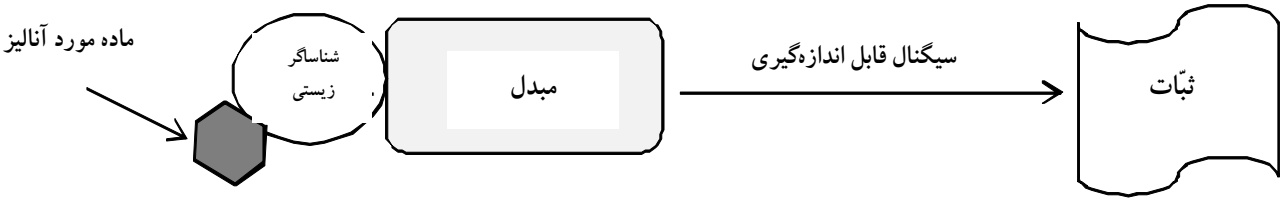
با توسعه و رشد روز افزون صنایع و افزایش جمعیت جهانی، پساب‌های صنعتی و خانگی افزایش یافته و آلودگی‌های آلی از اجزای اصلی و اجتناب ناپذیر این پسابها بوده است. امروزه تعیین کیفیت آب از مهم‌ترین جنبه‌های مدیریت پساب و فرایندهای تصفیه آن محسوب می‌شود. BOD یکی از پارامترهای مورد استفاده و مهم به‌منظور تعیین آلودگی‌های آلی آب و فاضلاب است. این پارامتر از طریق اندازه گیری 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 اندازه گیری رده‌های آلی قابل تجزیه در نمونه‌های پساب، اندازه‌گیری BOD_5 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، معمولا وقت گیر 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 قابلیتی پس از تلاشهای بسیار طراحی شده‌اند. حسگرهای زیستی با قابلیت اندازه‌گیری سریع آلاینده‌ها به‌شدت مورد توجه قرار دارند [۲-۴].

امروزه دستگاههای آنالیز پرهزینه و پیچیده همچون GC، GC-MS، HPLC، AAS، اسپکتروفوتومتر 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 کرد. توسعه و کاربرد حسگرهای زیستی به‌شدت 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 مبدل است که تغییرات ناشی از واکنش جزء بیولوژیکی با ترکیب هدف را به سیگنال قابل اندازه‌گیری تبدیل می‌کند. در پایان به یک ثبّات 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 الکترود کلارک قرار گرفته و در واقع واکنش بیولوژیکی بین سلول میکربی و ترکیب هدف سبب تولید محصولاتی می‌شود که به‌وسیله الکترود 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 مبدل 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*[1] در حسگر خود استفاده نموده‌اند [۹]. در سال ۱۹۸۰ میلادی،

[1] *Trichosporon cutaneum*



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

www.SID.ir

Archive of SID

کولیز و همکاران بر روی حسگر BOD با میکروارگانیسم *هانسنسولا آناملا*[1] کار کرده‌اند [۱۰]. کاواباتا و ناکامورا در سال ۱۹۸۶ میلادی به استفاده از میکروارگانیسم *اشریشیا کلی*[2] در حسگر خود پرداخته‌اند [۱۱]. در پژوهشی در سال ۱۹۸۸ از *باسیلوس سابتیلیس*[3] 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 به‌دلیل سرعت پاسخ‌دهی مناسب در طول سه دهه، ارتقا یافته‌اند. مقایسه بین حسگرهای مختلف بر مبنای نوع میکروارگانیسم مورد استفاده به‌عنوان شناساگر (به‌صورت خالص، مخلوط، باکتری و مخمر)، بر مبنای سرعت پاسخ‌دهی به تزریق نمونه، بر مبنای محدوده عملیاتی (محدوده خطی منحنی کالیبراسیون)، کمترین مقدار تشخیص آلاینده[4] و نیز بر مبنای شرایط بهینه عملیاتی قابل مقایسه و تقسیم‌بندی هستند [۱۳].

هدف از این تحقیق، ساخت و توسعه حسگر زیستی آمپرومتریک به‌منظور 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 به‌عنوان شناساگر بیولوژیکی از تصفیه‌خانه آب و فاضلاب شاهین شهر اصفهان تهیه شد و به‌منظور 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 به‌مدت 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 به‌منظور جلوگیری از ته‌نشینی میکرب‌ها انجام گرفت. برای هوادهی از یک پمپ هوادهی و برای خوراک‌دهی از محیط کشت با مشخصات زیر استفاده شد: ۲۰ میلی‌گرم سولفات منیزم، ۱/۵گرم پپتون، ۶گرم 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 و۱۵].

۲-۲- محلول استاندارد BOD

از محلول گلوکز و گلوتامیک اسید به‌عنوان 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 BOD_5 برابر ۵±۲۰۰ میلی‌گرم اکسیژن در لیتر بود. این محلول نیز تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد [۱۶-۱۹].

۲-۳- بافر فسفاتی

بافر فسفاتی 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 فسفاتی 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 فسفاتی ۰/۱ مولار با pH برابر ۷ به‌دست 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 میکروارگانیسم‌ها

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 فسفاتی تهیه شده، برای دو تا سه مرتبه شستشو داده شد و مجدداً به‌مدت 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 [۱و۱۴].

۲-۶- طراحی حسگر

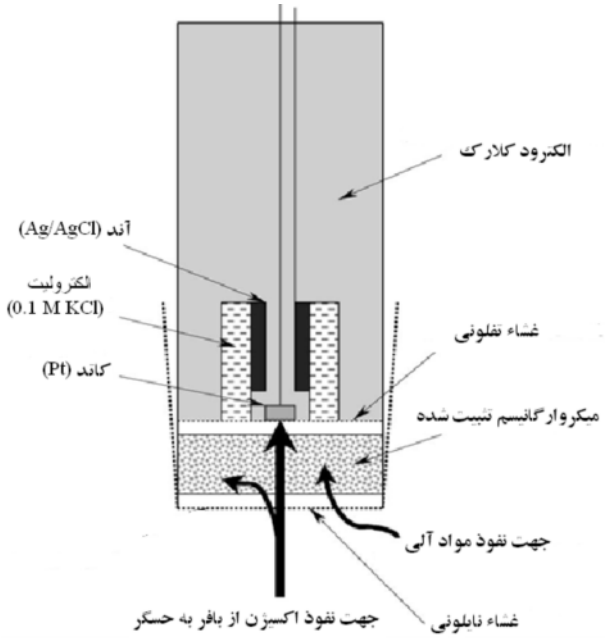
به‌منظور ساخت حسگر BOD ، ابتدا یک الکترود کلارک طراحی و ساخته شد. در الکترود مورد نظر از یک سیم نقره‌ای به‌عنوان الکترود مرجع و از یک سیم پلاتینی به‌عنوان الکترود در حال کار استفاده شد. پلاتین در یک لایه پلاستیکی قرار گرفت و سیم نقره‌ای به دور آن پیچیده شد به‌گونه‌ای که هیچ تماس مستقیمی بین نقره و پلاتین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

[1] *Hansensula anamola*
[2] *Escherichia coli*
[3] *Bacillus subtilis*
[4] Detection Limit

www.SID.ir

Archive of SID

به‌عنوان بدنه سلول کلارک قرار گرفت و در انتهای محفظه پلاستیکی، یک غشاء تفلونی به‌کمک یک درپوش تعبیه شد. این غشاء تنها اجازهٔ عبور هوا به داخل سلول را می‌دهد [۱۴]. از کلراید پتاسیم با غلظت ۰/۱ مولار به‌عنوان الکترولیت استفاده شد [۲و۱۶]. 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.



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

۲-۷- روش اندازه گیری

برای فرایند اندازه‌گیری BOD از سیستم آنالیز تزریق جریان (FIA) استفاده شد. در ساختار این سیستم از یک پمپ پریستالتیک واتسون مارلو ساخت کشور انگلستان[1]، دستگاه پتانسیواستات[2]، پمپ هوادهی[3] 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 پریستالتیک به سیستم پمپاژ می‌شود. حسگر میکربی 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 پریستالتیک 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[4] به دستگاه پتانسیواستات وارد شد. مهم‌ترین پارامتر موجود در این نرم افزار، پتانسیل اعمال شده به حسگر از طرف پتانسیواستات است که مقدار این پتانسیل برابر با ۰/۶۵- ولت ثابت شد. خروجی حسگر که به‌کمک نرم افزار 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

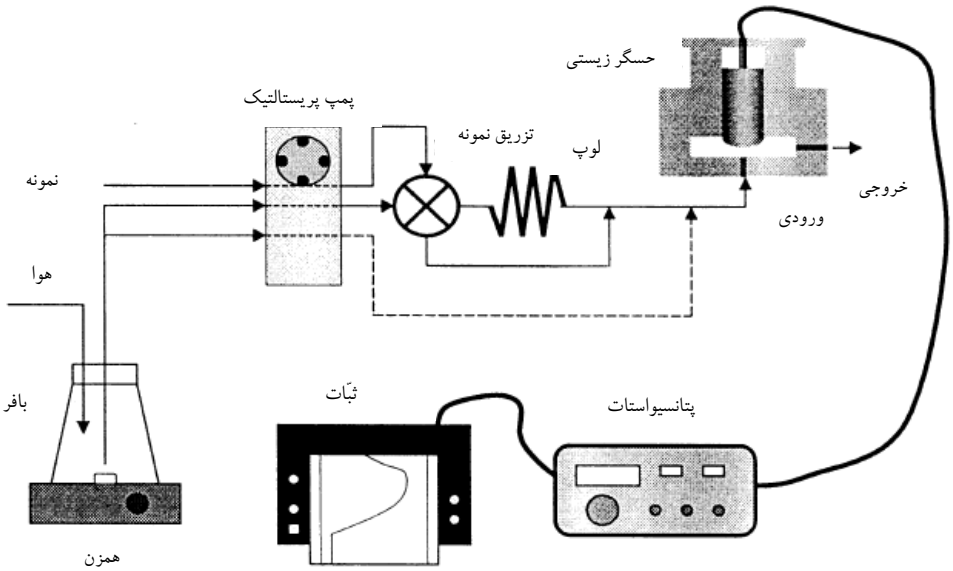
۳-۱- کالیبراسیون حسگر

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،

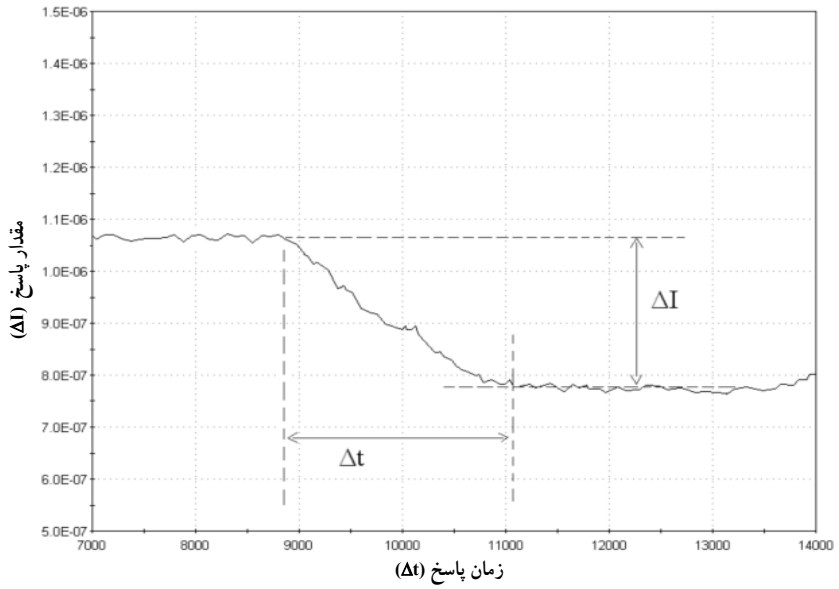
[1] 401U/DM2, Watson-Marlow, UK
[2] Potentiostat /Galvanostat Model 273, EG&G Instrument
[3] Aco -5505, HAILEA
[4] Electrochemistry Power Suite Software

www.SID.ir

Archive of SID



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

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 به‌عبارتی منحنی $\Delta I\text{-}BOD_5$ حاصل و از روی نمودار، محدوده خطی اندازه‌گیری تعیین شد. محدوده خطی به‌دست آمده، محدوده ای است که اندازه گیری دقیق BOD در آن میّسر خواهد بود [۱۴، ۱۷ و ۲۲]. نتایج به‌دست آمده به‌صورت منحنی کالیبراسیون در شکل ۵ نمایش داده شده است.

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 به‌دست آمده است. بنابراین این حسگر توانایی اندازه‌گیری نمونه‌هایی را دارد که مقدار BOD آنها در این محدوده باشد. به‌ازای نمونه‌هایی با BOD بالاتر از ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، مقدار پاسخ حسگر از ۶۰۰ تا ۶۱۰ nA تجاوز نخواهد کرد. بنابراین برای نمونه‌هایی که مقدار BOD آنها بالاتر از محدوده خطی باشد، لازم است عملیات رقیق‌سازی انجام شود.

www.SID.ir

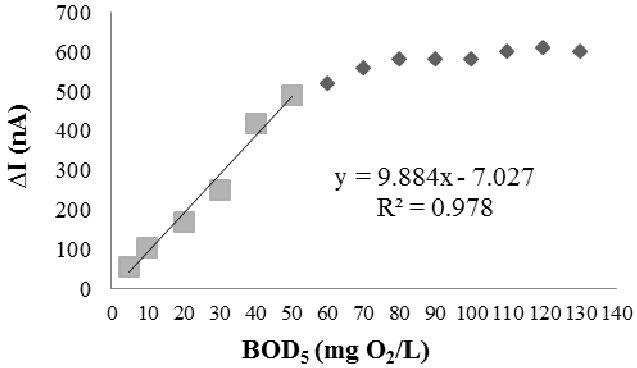
Archive of SID

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

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

میکرب تثبیت شده	محدوده خطی ($mg\ O_2 / L$)
سیتروباکتر و انترو باکتر[1]	۶-۱۸
تریکوسپرون کوتانیوم[2]	< ۶۰
تریکوسپرون کوتانیوم	۴-۱۰۰
هانسنولا آنوملا[3]	۱-۴۵
سودوموناس[4]	۱-۳۰
سودوموناس پوتیدا[5]	۱-۴۰
کلبسیلا اکستیوکا[6]	< ۴۴
باسیلوس سابتیلیس[7]	۲-۲۲
آرزولا ادنیووران[8]	۲-۵۵۰
باسیلوس سابتلیس و باسیلوس لیچنفرمیس[9]	< ۸۰
لجن فعال	< ۶۰

همان‌طور که در شکل ۴ دیده می‌شود، 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 اندازه‌گیری 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 می‌شود. لذا هر چه مقدار BOD موجود در نمونه بیشتر باشد، مدت زمان بیشتری برای



شکل ۵- منحنی کالیبراسیون حسگر BOD_5 (حجم لجن فعال تثبیت شده برابر ۵۰۰ میکرو لیتر، شدت جریان سیال حامل برابر ۰/۹ میلی‌لیتر 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 می‌شود [۱۳ و ۱۴]. در تحقیقات صورت گرفته با روش اندازه گیری حالت پایا، زمان پاسخ در محدوده ۱۳ تا ۲۰ دقیقه برای میکروارگانیسم‌های خالص و زمان پاسخ حدود ۳۰ دقیقه برای مخلوط میکربی گزارش شده است [۱۳].

۳-۲- اندازه‌گیری BOD نمونه‌های واقعی و مقایسه نتایج با نتایج روش استاندارد BOD_5

برای اندازه‌گیری BOD نمونه‌ها، پس از برقراری حالت پایای اولیه، مقدار ۳ میلی‌لیتر از هریک از نمونه‌ها در ورودی پمپ تزریق و پس از برقراری حالت پایای ثانویه، مقدار پاسخ حسگر، اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری صحیح، زمانی انجام می‌شود که BOD نمونه‌ها در محدودهٔ خطی باشد، اما از آنجا که مقدار BOD نمونه‌ها نامشخص است، برای هر یک از آنها رقیق‌سازی تا رسیدن مقدار پاسخ حسگر در محدوده خطی انجام شد. در تمام اندازه‌گیری‌ها، مقدار حجم لجن تثبیت شده برابر با ۵۰۰ میکرولیتر، شدت جریان سیال حامل برابر با ۰/۹ میلی لیتر بر دقیقه و pH سیال حامل برابر با ۷ انتخاب شد. نتایج به‌دست آمده در جدول ۲ نشان داده شده است. خطای حاصل در مقایسه با مقادیر استاندارد برای نمونه‌های آردینه و پگاه کمتر از مقدار خطای اندازه‌گیری برای نمونه تصفیه‌خانه آب و فاضلاب بود که دلیل آن می‌تواند سبک‌تر بودن اجزاء در پسابهای آردینه و پگاه در مقایسه با پساب تصفیه‌خانه آب و فاضلاب باشد. مجموع نتایج به‌دست آمده بیانگر این مطلب است که مقادیر BOD به‌دست آمده از حسگر کمتر از مقادیر استاندارد BOD_5 است. دلیل این مطلب این است که در روش استاندارد BOD_5، فرایند تجزیه اجزاء آلی موجود در نمونه در مدت زمان ۵ روز انجام می‌شود، در حالی که

[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 adeninivorans LS3*
[9] *B. subtilis + B. licheniformis*

www.SID.ir

Archive of SID

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 BOD_5 است. با توجه به بهترین مقادیر به‌دست آمده برا ی هر یک از نمونه‌ها، میانگین خطای اندازه‌گیری حسگر برابر ۲۶/۹۱ درصد است.

انحراف نتایج به‌دست آمده حسگر از نتایج روش استاندارد BOD_5 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 BOD_5 ، 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 تخمین سریع مقادیر BOD نمونه‌های مختلف در مدت زمان بسیار کم است. بنابراین انتظار نمی‌رود نتایج به‌دست آمده از حسگرهای زیستی برای اندازه گیری BOD با نتایج روش استاندارد BOD_5 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 BOD_5 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 می شود، برای هر سه نمونه مقدار پاسخ حسگر در روز چهارم افت شدیدی پیدا می‌کند. برای نمونه‌ها با BOD_5 برابر با ۱۰ و ۳۰ میلی‌گرم در لیتر، از روز هفتم به بعد، برای نمونه با BOD_5 برابر با ۵۰ میلی‌گرم در لیتر از

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

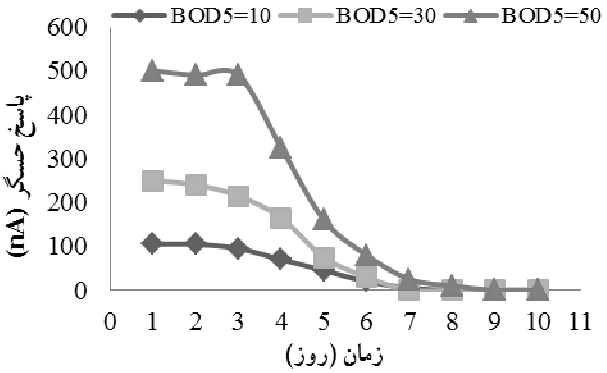
نوع پساب	BOD_5[a] (mg/L)	BOD حسگر (mg/L)	
		درصد نمونه مصرفی	مقدار BOD[b]
پساب ورودی به واحد لجن فعال تصفیه‌خانه شرکت آردینه	۳۶۰	۴	۲۷۶
		۸	۲۵۳
		۱۲	۲۸۴
پساب خروجی از واحد لجن فعال تصفیه خانه شرکت آردینه	۱۹۱	۵	۱۴۷
		۱۵	۱۵۶
		۲۵	۱۲۸
پساب ورودی به واحد لجن فعال تصفیه‌خانه آب و فاضلاب شاهین شهر	۲۷۱	۵	۱۲۴
		۱۰	۱۳۸
		۱۵	۱۴۶
پساب خروجی از واحد لجن فعال تصفیه‌خانه آب و فاضلاب شاهین شهر	۱۸۸	۵	۱۱۸
		۱۵	۱۰۸
		۲۵	۱۲۷
پساب خروجی از واحد لجن فعال تصفیه‌خانه شرکت پگاه اصفهان	۳۱۰	۵	۲۴۵
		۱۰	۲۷۷
		۱۵	۲۵۵

[a] مقدار اندازه‌گیری شده BOD با روش استاندارد ۵ روزه.

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

www.SID.ir

Archive of SID



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 میکرب‌های 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 با اینکه اندازه گیری BOD یک نمونه توسط این حسگر، به‌مدت زمانی در حدود ۴ تا ۵ ساعت نیاز دارد (با احتساب زمان لازم برای رسیدن به شرایط پایای اولیه)، پایداری سه روزهٔ این حسگر، کافی به‌نظر می‌رسد.

۴- نتیجه گیری

یکی از اساسی‌ترین اهداف طراحی حسگرهای BOD، دسترسی به 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 به‌دست آمد و با توجه به اینکه از روش حالت پایا برای اندازه‌گیری نمونه‌ها استفاده شد، زمان پاسخ حسگر مقداری مناسب و معقول به‌نظر می‌رسد. محدودهٔ خطی برای حسگرهای BOD بسیار متنوع است که بستگی به شناساگر بیولوژیکی مورد استفاده در ساختار آنها دارد، ولی در مجموع، معمولا محدودهٔ کوتاهی را پوشش می‌دهند. محدوده خطی برای حسگر طراحی شده در بازه ۵ تا ۵۰ میلی‌گرم اکسیژن در لیتر به‌دست آمد که در بین حسگرهای BOD، محدوده مناسب تلقی می‌شود. مقدار BOD اکثر نمونه‌های واقعی، بالاتر از محدوده خطی به‌دست آمده است، بنابراین لازم است فرایند رقیق سازی نمونه‌ها به‌گونه‌ای انجام شود تا مقدار پیک جریان الکتریکی به‌دست آمده در محدوده خطی یعنی محدوده nA 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 نمی توان مشکل اساسی به‌شمار آورد.

۵- قدردانی

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

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.

www.SID.ir

Archive of SID

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 Svirmickas, G. J. S. (1980). "Electron exchange between the enzyme active center and organic metal." *FEBS. Lett*., 114 (1), 7-10.

11- Kawabata, N., and Nakmura, 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 (BODst) 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.

www.SID.ir