**دانشگاه صنعتی اصفهان**
دانشکده مهندسی شیمی

# ساخت و ارتقاء حسگر زیستی بر پایه‌ی سلول میکروبی به منظور اندازه گیری BOD محلول

پایان‌نامه کارشناسی ارشد مهندسی شیمی- پیشرفته

**بهنام مهدوی**

استاد راهنما

**دکتر حمید زیلویی**

۱۳۹۰

سپاس بی‌کران پروردگار یکتا را که هستی‌مان بخشید و به طریق علم و دانش رهنمونمان شد و به همنشینی رهروان علم و دانش مفتخرمان نمود و خوشه چینی از علم و معرفت را روزیمان ساخت.

با درود فراوان به پدر بزرگوارم و سپاس بیکران بر همدلی و همراهی و همگامی مادر دلسوز و مهربانم که سجده‌ی ایثارش گل محبت را در وجودم پروراند و دامان گهربارش لحظه‌های مهربانی را به من آموخت.

و با تقدیر و تشکر شایسته از استاد ارجمند و بزرگوارم، آقای دکتر حمید زیلویی که با نکته‌های دلاویز و گفته‌های بلند، صحیفه‌های سخن را علم پرور نمود و همواره راهنما و راه‌گشای اینجانب در اتمام و اکمال پایان‌نامه بوده است.

معلما مقامت ز عرش برتر باد

همیشه توسن اندیشه ات مظفر باد

از برادرهای عزیزم که در دوران تحصیل همواره مشوق و پشتیبان اینجانب بوده‌اند کمال تشکر و سپاسگزاری را دارم.

بهنام مهدوی

اسفند ماه ۱۳۹۰

دانشگاه صنعتی اصفهان

**کلیه‌ی حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان‌نامه (رساله) متعلق به دانشگاه صنعتی اصفهان است.**

# تقدیم به

**پدرم** که عالمانه به من آموخت تا چگونه در عرصه زندگی، ایستادگی را تجربه نمایم

و به **مادرم**، دریای بی کران فداکاری و عشق که وجودم برایش همه رنج بود و وجودش برایم همه مهر

## فهرست مطالب

عنوان ..... صفحه
فهرست مطالب ..... هشت
فهرست شکل‌ها ..... یازده
فهرست جداول ..... سیزده
چکیده ..... ۱

**فصل اول: مقدمه**

۱-۱- اهمیت پروژه ..... ۲
۱-۲- تاریخچه و کاربرد ..... ۳
۱-۳- هدف ..... ۴
۱-۴- محتوای سایر فصول ..... ۴

**فصل دوم: تئوری**

۲-۱- حسگر زیستی ..... ۵
۲-۲- شناساگرهای بیولوژیکی ..... ۶
۲-۲-۱- شناساگرهای بایوکاتالیستی ..... ۶
۲-۲-۲- شناساگرهای شبه زیستی ..... ۷
۲-۲-۳- شناساگرهای هیبریدی ..... ۷
۲-۳- ترانسفورماتورها ..... ۸
۲-۳-۱- حسگرهای زیستی الکتروشیمیایی ..... ۸
۲-۳-۲- حسگرهای زیستی گرمایی ..... ۱۴
۲-۳-۳- حسگرهای زیستی نوری ..... ۱۴
۲-۴- تثبیت گیرنده های بیولوژیکی ..... ۱۷
۲-۴-۱- تثبیت شیمیایی ..... ۱۸
۲-۴-۲- تثبیت فیزیکی ..... ۱۸
۲-۵- آنالیز تزریق جریان ..... ۱۹
۲-۵-۱- سیال حامل ..... ۲۰
۲-۵-۲- شدت جریان سیال حامل ..... ۲۰
۲-۵-۳- تزریق کننده ..... ۲۱
۲-۶- جداسازی آنالیت از مخلوط نمونه ..... ۲۱
۲-۷- حسگر زیستی میکروبی ..... ۲۱

۲-۷-۱- طراحی و عملکرد حسگر میکروبی ..... ۲۲
۲-۷-۲- انتخاب پذیری حسگر میکروبی ..... ۲۴
۲-۸- اندازه گیری BOD ..... ۲۵
۲-۸-۱- طراحی سیستم حسگر با پایه ی میکروبی برای اندازه گیری BOD ..... ۲۶
۲-۸-۲- عملکرد حسگر میکروبی BOD ..... ۲۶
۲-۸-۳- محلول استاندارد و کالیبراسیون حسگر میکروبی BOD ..... ۲۸
۲-۸-۴- محدوده ی خطی منحنی کالیبراسیون حسگر BOD ..... ۲۹
۲-۸-۵- زمان پاسخ و زمان احیا در حسگرهای میکروبی BOD ..... ۳۰
۲-۸- ۶- حساسیت حسگر میکروبی BOD ..... ۳۱
۲-۸-۷- پایداری حسگر میکروبی BOD ..... ۳۲
۲-۸- ۸- تأثیر اجزاء سمی بر حسگرهای میکروبی BOD ..... ۳۴
۲-۸- ۹- مقایسه ی نتایج حسگر زیستی BOD و روش استاندارد ₀BOD ..... ۳۵
۲-۸-۱۰- تکنیک هایی برای بهبود نتایج حسگر زیستی BOD ..... ۳۷

**فصل سوم: مواد و روش انجام آزمایش‌ها**

۳-۱- دستگاه های به کار رفته ..... ۳۹
۳-۲- مواد مورد استفاده ..... ۳۹
۳-۳- ساخت حسگر میکروبی BOD ..... ۴۰
۳-۴- تهیه ی محلول های مورد نیاز ..... ۴۱
۳-۴-۱- تهیه ی سیال حامل (بافر فسفاتی) ..... ۴۱
۳-۴-۲- تهیه ی محلول استاندارد ..... ۴۱
۳-۴-۳- تهیه ی خوراک لجن فعال ..... ۴۲
۳-۵- آماده سازی لجن فعال ..... ۴۲
۳-۶-نصب و اتصال اجزاء سیستم آنالیز تزریق جریان ..... ۴۲
۳-۶-۱- تثبیت لجن فعال ..... ۴۴
۳-۶-۲- راه اندازی سیستم FIA و حسگر BOD برای آزمایشات مقدماتی ..... ۴۴
۳-۷- آزمایشات مقدماتی ..... ۴۴
۳-۷-۱- بررسی تأثیر حجم لجن فعال تثبیت شده بر عملکرد حسگر ..... ۴۴
۳-۷-۲-بررسی تأثیر pH سیال حامل بر عملکرد حسگر ..... ۴۵
۳-۷-۳- بررسی تأثیر دبی سیال حامل بر عملکرد حسگر ..... ۴۵
۳-۷-۴- بررسی تأثیر حجم تزریق نمونه بر عملکرد حسگر ..... ۴۶
۳-۸- آزمایش های اصلی ..... ۴۶

۳-۸-۱- کالیبراسیون حسگر میکروبی BOD..... ۴۶
۳-۸-۲- اندازه گیری BOD چند نمونه ی مجهول ..... ۴۶
۳-۸-۳- بررسی پایداری حسگر میکروبی BOD..... ۴۷
**فصل چهارم: نتایج و بحث**
۴-۱- پارامترهای مؤثر بر عملکرد حسگر ..... ۴۸
۴-۱-۱- بررسی حجم لجن تثبیت شده ..... ۴۹
۴-۱-۲- بررسی pH مناسب برای سیال حامل ..... ۵۳
۴-۱-۳- بررسی شدت جریان سیال حامل ..... ۵۶
۴-۱-۴- بررسی حجم تزریق نمونه ..... ۶۰
۴-۲- کالیبراسیون حسگر ..... ۶۳
۴-۳- اندازه گیری BOD پساب های واقعی ..... ۶۷
۴-۴- بررسی پایداری حسگر BOD..... ۶۸
**فصل پنجم: نتیجه‌گیری و پیشنهادات**
۵-۱- نتیجه‌گیری..... ۷۰
۵-۲-ارائه ی پیشنهادات جهت ادامه ی کار ..... ۷۱
مراجع ..... ۷۲

# فهرست شکل‌ها

**عنوان** **صفحه**


شکل ۲- ۱ اندازه گیری آنالیت توسط حسگر زیستی ..... ۵

شکل ۲- ۲: سلول کلارک ..... ۱۰

شکل ۲- ۳: شمای کلی یک حسگر میکروبی ..... ۲۳

شکل ۲- ۴: شمای یک حسگر میکروبی همراه با سیستم FIA ..... ۲۳

شکل ۲- ۵: ساختار متداول حسگر با پایه میکروبی برای اندازه گیری BOD ..... ۲۶

شکل ۲- ۶: روش نقطه ی پایانی برای اندازه گیری BOD ..... ۲۷

شکل ۲- ۷: روش اندازه گیری سرعت اولیه برای اندازه گیری BOD ..... ۲۸

شکل ۳- ۱: حسگر میکروبی BOD ..... ۴۰

شکل ۳- ۲: ساختار داخلی حسگر طراحی شده. ..... ۴۱

شکل ۳- ۳: سیستم آنالیز تزریق جریان (FIA) به همراه حسگر میکروبی BOD. ..... ۴۳

شکل ۳- ۴: دستگاه پتانسیواستات ..... ۴۳

شکل ۴- ۱: پاسخ حسگر به تزریق نمونه استاندارد برای ۱۰۰ µl لجن تثبیت شده ..... ۴۹

شکل ۴- ۲: پاسخ حسگر به تزریق نمونه استاندارد برای ۳۰۰ µl لجن تثبیت شده. ..... ۵۰

شکل ۴- ۳: پاسخ حسگر به تزریق نمونه استاندارد برای ۵۰۰ µl لجن تثبیت شده. ..... ۵۰

شکل ۴- ۴: پاسخ حسگر به تزریق نمونه استاندارد برای ۷۰۰ µl لجن تثبیت شده ..... ۵۱

شکل ۴- ۵: پاسخ حسگر به تزریق نمونه استاندارد برای ۹۰۰ µl لجن تثبیت شده ..... ۵۱

شکل ۴- ۶: تغییرات سرعت پاسخ حسگربه ازای حجم های متفاوت از لجن فعال تثبیت شده ..... ۵۲

شکل ۴- ۷: تغییرات نسبت اختلاف جریان به جریان اولیه به ازای حجم های متفاوت از لجن فعال تثبیت شده. ..... ۵۲

شکل ۴- ۸: پاسخ حسگر به ازای بافر فسفاتی با pH=۵. ..... ۵۳

شکل ۴- ۹: پاسخ حسگر به ازای بافر فسفاتی با pH=۶ ..... ۵۴

شکل ۴- ۱۰: پاسخ حسگر به ازای بافر فسفاتی با pH=۷ ..... ۵۴

شکل ۴- ۱۱ : پاسخ حسگر به ازای بافر فسفاتی با pH =۸. ..... ۵۵

شکل ۴- ۱۲: پاسخ حسگر به ازای بافر فسفاتی با pH=۹. ..... ۵۵

شکل ۴- ۱۳: تغیرات سرعت پاسخ حسگر با pH ..... ۵۶

شکل ۴- ۱۴: پاسخ حسگر در شدت جریان ۰/۳ ml/min از سیال حامل. ..... ۵۶

شکل ۴- ۱۵: پاسخ حسگر در شدت جریان ۰/۵ ml/min از سیال حامل ..... ۵۷

شکل ۴- ۱۶: پاسخ حسگر در شدت جریان ۰/۷ ml/min از سیال حامل ..... ۵۷

شکل ۴- ۱۷: پاسخ حسگر در شدت جریان ۰/۹ ml/min از سیال حامل ..... ۵۸

شکل ۴- ۱۸: پاسخ حسگر در شدت جریان ۱.۱ ml/min از سیال حامل ..... ۵۸

شکل ۴- ۱۹: پاسخ حسگر در شدت جریان ۱.۳ ml/min از سیال حامل ..... ۵۹

شکل ۴- ۲۰: تغییرات سرعت پاسخ حسگر به ازای شدت جریان های مختلف از سیال بافر ..... ۵۹

شکل ۴- ۲۱: پاسخ حسگر به تزریق ۱ میلی لیتر از نمونه ای با $BOD_۵$=۵ $mgO_۲/L$. ..... ۶۰

شکل ۴- ۲۲: پاسخ حسگر به تزریق ۲ میلی لیتر از نمونه ای با $BOD_۵$=۵ $mgO_۲/L$ ..... ۶۱

شکل ۴- ۲۳: پاسخ حسگر به تزریق ۳ میلی لیتر از نمونه ای با $BOD_0$=۵ $mgO_2/L$ ..... ۶۱
شکل ۴- ۲۴: پاسخ حسگر به تزریق ۴ میلی لیتر از نمونه ای با $BOD_0$=۵ $mgO_2/L$ ..... ۶۲
شکل ۴- ۲۵: پاسخ حسگر به تزریق ۵ میلی لیتر از نمونه ای با $BOD_0$=۵ $mgO_2/L$ ..... ۶۲
شکل ۴- ۲۶: تغییرات سرعت پاسخ حسگر با حجم نمونه ی تزریق شده ..... ۶۳
شکل ۴- ۲۷: پاسخ حسگر به ازای تزریق نمونه ای با $BOD_0$= ۱۰ mg $O_2/L$ ..... ۶۴
شکل ۴- ۲۸: پاسخ حسگر به ازای تزریق نمونه ای با $BOD_0$= ۵۰ mg $O_2/L$ ..... ۶۴
شکل ۴- ۲۹: پاسخ حسگر به ازای تزریق نمونه ای با $BOD_0$= ۸۰ mg $O_2/L$ ..... ۶۵
شکل ۴- ۳۰: پاسخ حسگر به ازای تزریق نمونه ای با $BOD_0$= ۱۲۰ mg $O_2/L$ ..... ۶۵
شکل ۴- ۳۱: منحنی کالیبراسیون حسگر BOD ..... ۶۶
شکل ۴- ۳۲: تغییرات روزانه ی پاسخ حسگر ..... ۶۸

# فهرست جداول

**عنوان** **صفحه**


جدول ۲- ۱: فهرستی از آنالیت هایی که از حسگرهای جریان سنج برای اندازه گیری آنها استفاده می شود ..... ۱۲

جدول ۲- ۲: برخی از حسگرهای زیستی پتانسیل سنج ..... ۱۳

جدول ۲- ۳: کاربردحسگرهای بیولومینسانس برای اندازه گیری برخی از آنالیت ها ..... ۱۵

جدول ۲- ۴: کاربرد حسگرهای زیستی فلوئورسانس در شناسایی برخی از آنالیت ها ..... ۱۶

جدول ۲- ۵: محدوده ی خطی برای چند حسگرمیکروبی BOD. ..... ۳۰

جدول ۲- ۶: زمان پاسخ حسگرهای BOD ..... ۳۱

جدول ۲- ۷: مدت زمان پایداری حسگرهای جریان سنج BOD ..... ۳۴

جدول ۲- ۸: مقایسه ی مقدار BOD حسگرهی زیستی و روش استاندارد $BOD_5$ برای نمونه های مختلف پساب ..... ۳۶

جدول ۴- ۱: تأثیر مقدار حجم لجن تثبیت شده بر پاسخ حسگر. ..... ۵۲

جدول ۴- ۲: مقادیر پاسخ حسگر به ازای pH های مختلف ..... ۵۵

جدول ۴- ۳: مشخصات پاسخ حسگر به ازای شدت جریان های مختلف از سیال حامل. ..... ۵۹

جدول ۴- ۴: مشخصات پاسخ حسگر به حجم های متفاوت از نمونه ی تزریق شده. ..... ۶۳

جدول ۴- ۵: مقدار پاسخ حسگر برای نمونه های مختلف در فرایند کالیبراسیون حسگر. ..... ۶۶

جدول ۴- ۶: مقایسه نتایج حاصل از حسگر و روش استاندارد $BOD_5$ برای چند پساب واقعی. ..... ۶۷

## چکیده

امروزه تولید پساب و به دنبال آن، تصفیه پساب یکی از مشکلات اساسی برای هر صنعت و به طور کلی برای جامعه ی بشری تلقی می شود. در طی فرایند تصفیه، تعیین مشخصات کیفی پساب، امری ضروری می باشد. در میان تمامی این پارامترها و مشخصات کیفی، اکسیژن خواهی بیوشیمیایی (BOD) یکی از مهمترین و پرکاربردترین پارامترها برای تخمین مقدار آلودگی پساب محسوب می شود. فرایند کنترل تصفیه با استفاده از روش سنتی اندازه گیری BOD به دلیل زمانبر بودن این روش، بسیار سخت و حتی ناممکن است. نیاز به روشی سریع، کم هزینه و با قابلیت جابه جایی تجهیزات برای اندازه گیری BOD پساب ها، محققان را به سوی تولید حسگرهای زیستی سوق داده است. حسگرهای زیستی تجهیزاتی با شکل های گوناگون می باشند که مواردی از جمله، اندازه ی کوچک، قابلیت جابجایی، کارکرد ساده، هزینه ی کم، سرعت پاسخ دهی بالا و آنالیز تک مرحله بدون نیاز به معرف های گوناگون شیمیایی از مزایای این تجهیزات به شمار می روند. در روش سنتی $BOD_5$ اندازه گیری BOD پساب ها در مدت زمان ۵ روز انجام می گیرد. در حالی که حسگرهای زیستی توانایی اندازه گیری BOD نمونه های مختلف را در عرض چند دقیقه فراهم می سازند. در این پروژه یک حسگر زیستی از نوع میکروبی برای اندازه گیری BOD طراحی شده است. در ساختار این حسگر از یک سلول کلارک به عنوان ترانسفورماتور و از لجن فعال تهیه شده از تصفیه خانه ی آب و فاضلاب شاهین شهر اصفهان به عنوان گیرنده ی بیولوژیکی حسگر استفاده شده است. در ساختار سلول کلارک، از الکترود نقره به عنوان آند، از الکترود پلاتین به عنوان کاتد و از پتاسیم کلراید با غلظت ۰/۱ مولار به عنوان الکترولیت استفاده شده است. در انتهای سلول کلارک از یک غشاء با جنس تفلون استفاده شده است که تنها اجازه ی عبور هوا را می دهد و از نفوذ مواد آلی به داخل سلول جلوگیری می کند. لجن فعال بر روی یک غشاء نایلونی تثبیت شده و بر روی سلول کلارک نصب می شود. تأثیر پارامترهای حجم لجن تثبیت شده بر روی غشاء نایلونی، pH سیال حامل، دبی سیال حامل و حجم تزریق نمونه بر روی عملکرد حسگر بررسی شده و مقدار بهینه برای هریک از این پارامترها انتخاب شده است. مقدار بهینه برای حجم لجن تثبیت شده برابر با ۵۰۰ میکرولیتر، برای pH سیال حامل برابر با ۷، برای دبی سیال حامل برابر با ۰/۹ میلی لیتر بر دقیقه و برای حجم تزریق نمونه برابر با ۳ میلی لیتر به دست آمده است. نتایج مربوط به کالیبراسیون حسگر نشان می دهد رابطه ی خطی بین اختلاف جریان الکتریکی و غلظت محلول گلوکز- گلوتامیک اسید در محدوده ی ۵-۴۸ mg $O_2$/L برقرار می باشد. مقدار BOD پساب های ورودی و خروجی از واحد تصفیه ی شرکت مواد غذایی آردینه، پساب های ورودی و خروجی از تصفیه خانه ی آب و فاضلاب شاهین شهر اصفهان و پساب خروجی از واحد تصفیه ی شرکت پگاه اصفهان توسط حسگر اندازه گیری شده است. مقایسه ی نتایج به دست آمده از حسگر و نتایج حاصل از روش سنتی $BOD_5$ نشان می دهد، میانگین درصد خطای اندازه گیری BOD نمونه های ذکر شده توسط حسگر برابر با ٪ ۲۶/۱۴ می باشد. نتایج مربوط به ارزیابی پایداری حسگر طراحی شده نشان می دهد، مدت زمان پایداری پاسخ حسگر برابر با ۳ روز می باشد و پس از ۳ روز استفاده از حسگر، لازم است لجن تثبیت شده بر روی حسگر تعویض گردد.



**کلمات کلیدی:** حسگرزیستی، پساب، ا کسیژن خواهی بیوشیمیایی (BOD)، لجن فعال، آنالیز تزریق جریان

# فصل اول

## مقدمه

### ۱-۱- اهمیت پروژه

با توسعه و رشد روز افزون صنایع و افزایش جمعیت جهانی، پساب های صنعتی و خانگی افزایش می یابد که نتیجه ی آن افزایش آلودگی های آلی در پساب ها می باشد. امروزه تعیین کیفیت آب از مهمترین جنبه های مدیریت پساب محسوب می شود. اکسیژن خواهی بیوشیمیایی یا به عبارتی BOD یکی از پارامترهای مورد استفاده و مهم به منظور تعیین آلودگی های آلی آب و فاضلاب می باشد. این پارامتر از طریق اندازه گیری اکسیژن مورد نیاز میکروارگانیسم های هوازی به منظور تجزیه ی اجزاء آلی تعیین می شود، در واقع مقدار BOD بیانگر مقدار مواد آلی قابل تجزیه است[۱].

روش استاندارد اندازه گیری رده های آلی قابل تجزیه، $BOD_5$ می باشد. برای اندازه گیری مقدار BOD، یک نمونه از آب انتخاب شده و به خوبی هوادهی می شود، سپس به مدت ۵ روز در دمای $20^{\circ}C$ و در محیط تاریک در یک ظرف قرار داده می شود. مقدار مصرف اکسیژن در طول این دوره بیانگر $BOD_5$ می باشد. بنابراین در روش استاندارد اندازه گیری BOD، مدت زمان ۵ روز مورد نیاز است واز این لحاظ وجود روشی که توانایی اندازه گیری BOD را به مدت چند دقیقه داشته باشد بسیار حائز اهمیت است.به مدت چندین سال مطالعات زیادی برای به دست آوردن روشی که توانایی اندازه گیری BOD را در مدت زمان کم داشته باشد انجام شد تا اینکه حسگرهای زیستی[۱] با چنین قابلیتی پس از تلاش های بسیار طراحی شدند پس از آن، حسگرهای زیستی با قابلیت اندازه گیری سریع آلاینده ها به شدت مورد توجه قرار گرفتند[۲و۳و۴].

---

[۱] Biosensors

فناوری حسگر زیستی در حقیقت نشان دهنده ی ترکیبی از علوم بیوشیمی، بیولوژی مولکولی، شیمی، فیزیک، الکترونیک و کامپیوتر است. یک حسگر زیستی در حقیقت شامل یک حسگر کوچک و ماده ی بیولوژیک تثبیت شده بر آن می باشد. از آنجا که حسگرهای زیستی ابزاری توانمند جهت شناسایی مولکول های زیستی می باشند، امروزه از آنها در علوم مختلف پزشکی، صنایع شیمیایی، صنایع غذایی، مانیتورینگ محیط زیست، تولید محصولات دارویی، بهداشتی و غیره بهره می گیرند. در واقع این حسگرها ابزاری توانمند جهت شناسایی مولکولهای زیستی می باشند. حواس بویایی و چشایی انسان که به شناسایی بوها و طعمهای مختلف می پردازد و یا سیستم ایمنی بدن که میلیونها نوع مولکول مختلف را شناسایی می کند، نمونه هایی از حسگرهای زیستی طبیعی می باشند. در حقیقت حسگرهای زیستی ابزارهای تحلیلی به شمار می روند که می توانند با بهره گیری از هوشمندی مواد بیولوژیک، ترکیب یا ترکیباتی را شناسایی نموده، با آنها واکنش دهند و بدین ترتیب یک پیام شیمیایی، نوری و یا الکتریکی ایجاد نمایند.

مسلما امروزه دستگاههای آنالیز گرانقیمت و پیچیده همچون GC، GC-MS، HPLC، AAS، اسپکتروفوتومتر و... موجود می باشندکه طی یک مرحله آنالیز پیچیده، وقت گیر وخسته کننده، نتایج مناسبی می دهند اما استفاده از حسگرهای زیستی در مقایسه با روش های دیگر دارای مزایایی است که می توان به هزینه ی کم، سرعت پاسخ دهی بسیار بالا، قابلیت حمل و استفاده در محل حتی در منازل، شرایط عملیاتی بسیار ساده وحساسیت بالا اشاره کرد. توسعه و کاربرد حسگرهای زیستی به شدت مورد توجه بوده چرا که در حال حاضر اشکال مختلف واکنش های بیوشیمیایی کاملا شناخته شده اند و روش های آنالیز آنها در دهه های اخیر کاملا توسعه یافته است [۵].

### ۱-۲- تاریخچه و کاربرد

اولین حسگر BOD بر پایه ی حسگر زیستی در سال ۱۹۷۷ میلادی توسط کاروب[۱] مورد استفاده قرار گرفت، وی در طراحی حسگر خود از لجن فعال استفاده کرد[۳و۴]. پس از آن، افراد زیادی بر روی حسگرهای BOD با میکروارگانیسم های مختلف که از لجن فعال به دست می آمدند، کار کرده و در پی ارتقاء نتایج حسگر بودند. هیکوما[۲] در سال ۱۹۷۹ میلادی از میکروارگانیسم Trichosporon cutaneum در حسگر خود استفاده نمود [۲]. در سال ۱۹۸۰ میلادی، کولیز[۳] بر روی حسگر BOD با میکروارگانیسم Hansensula anamola کار کرد [۴]. رایدل[۴] و همکارانش و ناکامورا[۵] در سال ۱۹۸۶ میلادی به استفاده از میکروارگانیسم Escherichia coli در حسگر خود پرداختند [۱]. رایدل در سال ۱۹۸۸ از Bacillus subtilis در حسگر خود استفاده نمود [۱و۲]. تمامی این

[۱] Karube
[۲] Hikuma
[۳] Kulys
[۴] Riedel
[۵] Nakamura

محققان در پی اندازه گیری سریع و در عین حال، دقیق BOD پساب های مختلف بوده اند. و تا امروز حسگرهای زیستی به دلیل سرعت پاسخ دهی مناسب در طول سه دهه ارتقاء داده شده اند.

حسگرهای زیستی کاربردهای بسیار مختلفی دارند که در علوم مختلف از جمله پزشکی ،صنایع غذایی ومحیط زیست وبه منظور شناسایی و اندازه گیری مواد مختلف استفاده می شوند.بسته به اینکه مولکلول هدف ویا به عبارتی آنالیت مورد نظر برای شناسایی چه باشد، نوع وساختمان یک حسگر زیستی متفاوت خواهد بود. حسگرهای زیستی می توانند درشناخت مکانیسم برخی بیماریها و اختلالات، در امر تشخیص و درمان بیماریها و عوارض آنها و شناسایی علل و زمینه های به وجود آورنده آنها و نیز در سایر علوم مرتبط نظیر داروسازی، سامانه های پیشرفته دارورسانی و شناسایی داروهای جدید و ارزیابی فعالیت بیولوژیک آنها استفاده شوند. امروزه حسگرهای زیستی در زمینه ی محیط زیست کاربرد بسیاری دارند. شناسایی و اندازه گیری ترکیبات گوناگون موجود در پساب های شهری و صنعتی همچون BOD، ترکیبات آروماتیک، فلزات سنگین، فسفات، نیترات، فنول، فرمالدهید و اتانول از مهمترین کاربرد حسگرهای زیستی در محیط زیست می باشد [۵].

### ۱-۳- هدف

در این پروژه، هدف ساخت یک حسگر میکروبی BOD، کالیبراسیون حسگر واندازه گیری BOD چند نمونه از پساب های واقعی و مقایسه ی نتایج حاصل با نتایج روش استاندارد $BOD_5$ می باشد. پساب های به کار رفته برای اندازه گیری عبارتند از: پساب ورودی به واحد تصفیه ی شرکت آردینه، پساب خروجی از واحد تصفیه ی شرکت آردینه، پساب خروجی از واحد تصفیه ی شرکت پگاه اصفهان، پساب ورودی به تصفیه خانه ی آب و فاضلاب شاهین شهر و پساب خروجی از تصفیه خانه ی آب و فاضلاب شاهین شهر. برای دسترسی به اندازه گیری صحیح، در مراحل ابتدایی پروژه، اندازه گیری ها به منظور انتخاب مقادیر مناسب و بهینه برای حجم لجن فعال تثبیت شده، pH سیال حامل، دبی سیال حامل و حجم تزریق نمونه ی اندازه گیری انجام گرفته است.

### ۱-٤- محتوای سایر فصول

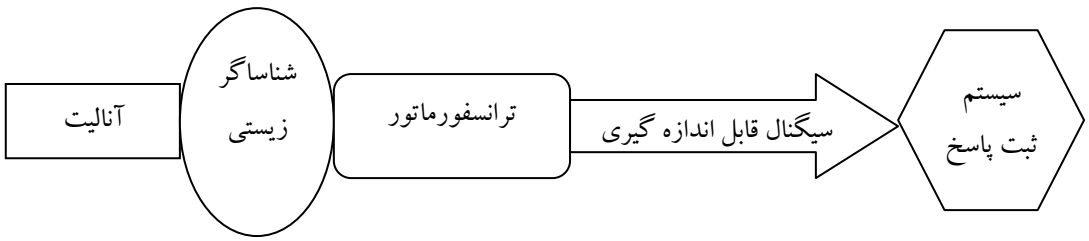
این پایان نامه مشتمل بر پنج فصل می باشد. در فصل اول مقدمه و اهمیت حسگرهای زیستی و اندازه گیری BOD بیان شده است. در فصل دوم حسگر زیستی و اجزاء مختلف آن معرفی شده و دسته بندی حسگرهای زیستی بر اساس اجزاء تشکیل دهنده انجام گرفته است و در نهایت روش اندازه گیری BOD توسط حسگر زیستی توضیح داده شده و در کنار توضیحات ارائه شده، نتایج دیگر محققان گنجانده شده است. فصل سوم به شرح آزمایشات و روش انجام آنها اختصاص داده شده است و در فصل چهارم نتایج به دست آمده ارائه شده و به بحث پیرامون نتایج و تحلیل آنها پرداخته شده است. در انتها و در فصل پنجم، جمع بندی نتایج و ارائه ی پیشنهاداتی جهت ادامه ی کار آورده شده است.

# فصل دوم
# تئوری

## ۲-۱- حسگر زیستی

حسگر زیستی، ابزاری برای شناسایی و اندازه گیری یک یا چند آنالیت با استفاده از یک گیرنده ی بیولوژیکی[۱] در ارتباط با یک ترانسفورماتور[۲] می باشد [۵و۶و۷].

در ابتدا، برای آشنایی با یک حسگر زیستی، شمای کلی یک حسگر زیستی که برای اندازه گیری یک آنالیت استفاده می شود را می توان در شکل ۲-۱ مشاهده کرد.




شکل ۲- ۱- اندازه گیری آنالیت توسط حسگر زیستی

همانطور که در شکل ۲- ۱ مشاهده می شود، اجزاء اصلی یک حسگر زیستی شامل یک گیرنده ی زیستی(شناساگر بیولوژیکی)، یک ترانسفورماتور و یک سیستم ثبت پاسخ می باشد. وظیفه ی شناساگر زیستی، ایجاد یک برهمکنش با آنالیت مورد نظر می باشد. نتیجه ی این برهمکنش، یک خروجی از شناساگر زیستی می باشد. نقش ترانسفورماتور

---

[۱] Biological receptor
[۲] Transducer

در حسگر زیستی، تبدیل خروجی شناساگر زیستی(پاسخ بیولوژیکی) به یک سیگنال قابل اندازه گیری است. با توجه به این که پاسخ شناساگر زیستی به آنالیت مورد نظر در شکل های گوناگون ظاهر می شود، لذا انتخاب نوع ترانسفورماتور به پاسخی که از شناساگر زیستی مبنای اندازه گیری قرار می گیرد، بستگی دارد. خروجی ترانسفور ماتور، یک سیگنال قابل اندازه گیری است که می تواند گونه های مختلف داشته باشد.سیستم ثبت پاسخ، آخرین جزء یک حسگر زیستی است که وظیفه ی آن ثبت سیگنال قابل اندازه گیری می باشد.نوع سیستم ثبت پاسخ به نوع سیگنال قابل اندازه گیری بستگی دارد [۵].

## ۲-۲- شناساگرهای بیولوژیکی

حسگرهای زیستی را می توان بر اساس جزء فعال بیولوژیکی دسته بندی کرد. نوع عنصر زیستی انتخاب شده در حسگر زیستی، درجه ی انتخاب پذیری حسگر زیستی را تعیین می کند. شناساگرهای زیستی به سه گروه تقسیم می شوند که عبارتند از: شناساگرهای بایوکاتالیستی[۱]، شناساگرهای هیبریدی [۲]و شناساگرهای شبه زیستی [۳] [۸].

### ۲-۲-۱-شناساگرهای بایوکاتالیستی

عنصر شناسایی بایوکاتالیستی می تواند شامل: آنزیم (آنزیم منفرد یا مخلوط آنزیم)، سلول کامل ( میکروارگانیسم ها، برخی باکتری ها، مخمر و...)، بافت حیوان یا گیاه باشد. حسگرهای زیستی که در ساختار آنها از میکروارگانیسم ها، گیاه یا بافت حیوانی به عنوان عنصر شناسایی استفاده می شود، در مقایسه با حسگر هایی که در آن ها از آنزیم استفاده می شود، مزایایی از جمله عدم نیاز به فرایندهای استخراج و خالص سازی را دارند. حسگرهای میکروبی در مقایسه با سایر حسگرهای زیستی حساسیت کمی به خاصیت ممانعت کنندگی اجزاء موجود در نمونه دارند و مقاومت بالایی در برابر تغیرات شرایط دمایی و pH داشته و به طور کلی از طول عمر بالایی برخوردارند.

اساس این حسگرها به اتصال سیستم ترانسفورماتور با سلولهای زنده ی تثبیت شده استوار بوده و ساخت آنها برای کاربرد به صورت غوطه ور در یک محلول آسان می باشد. از طرف دیگر، حسگرهای زیستی با این مشخصات، با توجه به نوع فرایندهای متابولیکی که در سلول زنده اتفاق می افتد، دارای پاسخ کند و انتخاب پذیری پایینی می باشند. چنین حسگرهایی معمولا برای شناسایی و اندازه گیری اجزاء آلی استفاده می شوند. مشکلاتی از جمله انتخاب پذیری پایین و سرعت پاسخ کند حسگرهای میکروبی را می توان با کمک آنزیم ها برطرف کرد.حسگرهای آنزیمی گونه های مختلفی از جمله آمپرومتری، کالری متری، فیزوالکتریک و... دارند. به طور کلی در تمام حسگرهای آنزیمی، آنزیم ها بر روی ترانسفورماتور تثبیت می شوند. رایج ترین آنزیم ها که کاربرد زیادی دارند، آنزیم های اکسیداز می باشند. این نوع آنزیم پایداری بالایی داشته و در برخی حالات، نیاز به کوانزیم و کوفاکتور ندارد [۸].

---

[۱] Biocatalytic receptors
[۲] Bioaffinity receptors
[۳] Hybrid receptors

**۲-۲-۲- شناساگر های شبه زیستی**

گیرنده های شبه زیستی شامل شناساگر های شیمیایی، پادتن ها و یا نوکلوئیک اسید ها می باشند. حسگرهای شبه زیستی برهمکنش های انتخابی با یک لیگاند را فراهم می کنند تا یک کمپلکس پایدار از لحاظ ترمودینامیکی ایجاد شود. دلیل استفاده از چنین حسگر پایدار، به خاطر کاربرد و نیاز به این حسگر و به خاطر اختصاصی بودن و گزینش پذیری واکنش پادتن- پادزا و حساسیت بالای این روش می باشد.

کمپلکس پادتن[۱]- پادزا[۲] را می توان در تمام حسگرها استفاده کرد. تغییرات فیزیکی- شیمیایی حاصل از پیوند پادتن- پادزا، نمی تواند یک سیگنال الکتروشیمیایی قابل تشخیص ایجاد کند، بنابر این، آنزیم ها، اجزا فلوئوروسان، سوبسترا های فعال الکتروشیمیایی و رادیونوکلوئیدها به عنوان برچسب و یا به عبارتی عنصر همراه، با پادتن و یا پادزاها استفاده می شوند [۸].

**۲-۲-۳- شناساگر های هیبریدی**

گیرنده های هیبریدی به مانند ردیاب های DNA و RNA کاربرد زیاد و نتایج رضایت بخشی در آنالیزهای غذایی و به منظور شناسایی و اندازه گیری میکروارگانیزم ها در محیط دارند.

اصول شناسایی در این حسگرها بر شناسایی رشته ی منحصر به فرد نوکلئیک اسیدها از طریق فرایند هیبریداسیون استوار است. ساختار نوکلئیک اسید شامل یک صورتبندی مارپیچ دوتایی از دو لایه ی پلی نوکلئوتید می باشد. هر لایه از یک رشته ی پلیمری ساخته شده اند که این رشته ها شامل پایه های تیمین[۳]، آدنین[۴] و گوآنین[۵] می باشد. این پایه ها توسط سه پیوند هیدروژنی در جفت پایه ای C-G و دو پیوند هیدروژنی در جفت پایه ای T-A تکمیل شده اند. این جفت ها، این توانایی را به هر یک از لایه ها می دهند تا بتوانند با اتصال به هم یک لایه ی دو تایی را تشکیل دهند. حسگرهای DNA از یک سلسله از این لایه های منفرد تشکیل شده اند که نقش این لایه ها در این حسگرها، گیرنده می باشد. حسگر DNA، در مجاورت DNA یا RNA از یک نمونه ی مجهول قرار می گیرد، در صورتی که فرایند هیبریداسیون به خاطر جفت شدن دو لایه انجام شود، فرایند شناسایی و اندازه گیری نمونه ی مجهول امکان پذیر خواهد بود. به نظر می رسد روشهای تحلیلی بر پایه ی DNA تنها روش ممکن برای شناسایی تغیرات ژنتیکی باشند، علاوه براین، روش هایی بسیار حساس برای شناسایی میکروارگانیزم ها محسوب می شوند. انواع حسگرهای تجاری DNA برای شناسایی عوامل بیماری زای موجود در مواد غذایی استفاده می شوند [۸].

---

[۱] Antibody
[۲] Antigen
[۳] Thymine
[۴] Adenine
[۵] Guanine

### ۲-۳- ترانسفورماتورها

ترانسفورماتورها، یکی از اجزای حسگرهای زیستی بوده که وظیفه ی آنها تبدیل پاسخ بیولوژیکی گیرنده ی بیولوژیکی به یک سیگنال قابل اندازه گیری می باشد. نوع ترانسفورماتور انتخاب شده در ساختار یک حسگر زیستی به نوع پاسخ بیولوژیکی انتخاب شده بستگی دارد.

فعالیت اجزاء بیولوژیکی برای یک سوبسترای معین را می توان با اندازه گیری مصرف اکسیژن، تشکیل پراکسید اکسیژن، فلوئورسانس، جذب سطحی، تغییرات pH ، هدایت سنجی، تغییرات دما، جرم و ... اندازه گیری کرد. بنابراین، حسگرهای زیستی با توجه به ترانسفورماتور مورد استفاده، به انواع مختلف دسته بندی می شوند. در ادامه به دسته بندی و معرفی حسگرهای زیستی با توجه به نوع ترانسفورماتور به کار رفته در آنها پرداخته می شود.

#### ۲-۳-۱- حسگرهای زیستی الکتروشیمیایی[۱]

یک حسگر زیستی الکتروشیمیایی با توجه به تعریف IUPAC ، ابزاری است که توانایی تولید اطلاعات تحلیلی کمی و یا شبه کمی با استفاده از یک شناساگر بیولوژیکی(گیرنده ی بیوشیمیایی) در تماس مستقیم با یک ترانسفورماتور از طریق یکی از فرایند های الکتروشیمیایی را دارا می باشد.

سیستم های الکتروشیمیایی متداولترین ترانسفورماتورهای مورد استفاده در سیستم های حسگر زیستی محسوب میشوند.ترانسفورماتورهای الکتروشیمیایی، یک پدیده ی شیمیایی (یا یک پدیده ی بیوشیمیایی در حسگرهای زیستی) را به صورت یک سیگنال الکتریکی منعکس می کنند. در واقع روشهای الکتروشیمیایی یک رابطه ی مستقیم بین سیگنال الکتریکی اندازه گیری شده و غلظت نمونه ی تزریق شده برقرار می کنند [۵].

حسگرهای زیستی از نوع الکتروشیمیایی دارای مزایایی از جمله پاسخ سریع، امکان اتوماسیون فرایند و اقتصادی بودن فرایند می باشند. این حسگرها به انواع حسگرهای زیستی جریان سنج[۲]، حسگرهای زیستی پتانسیل سنج[۳]، حسگرهای زیستی هدایت سنج[۴] و حسگرهای زیستی مقاومت سنج[۵] تقسیم می شوند [۵و۶و۷و۸].

**الف. حسگرهای زیستی جریان سنج**

در حسگرهای زیستی جریان سنج، همانطور که از نام آنها مشخص است، از ترانسفورماتورهای جریان سنج استفاده می شود. در ترانسفور ماتور جریان سنج، الکترود در یک پتانسیل مشخص برای تبدیل شیمیایی ماده ی فعال قرار می گیرد و جریان حالت پایا اندازه گیری می شود.

در سطح الکترود انتقال الکترون به صورت هتروژن بین ماده و الکترود صورت می گیرد. با استفاده از قانون اول فیک جریان الکتریکی را می توان از رابطه ی ۲-۱ به دست آورد.

---

[۱] Electrochemical biosensors

[۲] Amperometric biosensor

[۳] Potentiometric biosensor

[۴] Conductimetric biosensor

[۵] Impedimetry biosensor

$$I=nfDA\frac{c_s}{\varepsilon} \qquad (۱-۲)$$

که داریم :

n : تعداد اکترون های جابه جا شده

F: ثابت فارادی

A : سطح الکترود

ε : ضخامت لایه ی نفوذ

$c_s$ : غلظت ماده ی فعال در توده ی محلول

D: ضریب نفوذ مواد فعال در واکنش اکسایش- کاهش

با توجه به این قانون کاملا مشخص است که رابطه ی جریان الکتریکی با غلظت ماده ی فعال یک رابطه ی خطی است به شرطی که ضخامت لایه ی نفوذ ثابت باشد. در سیستم حسگرهای زیستی ضخامت لایه ی نفوذ معمولا همان ضخامت غشاء مورد ستفاده می باشد که قطعا مقدار ثابتی دارد [۵].

روش جریان سنج یک روش بسیار حساس بوده به طوری که غلظت های در حد میلی مولار از آنالیت قابل اندازه گیری می باشد. علاوه بر آن سرعت پاسخ در این روش بسیار بالا بوده که بالا بودن سرعت پاسخ و حساسیت از مزایای قابل توجه در این روش می باشند.

در ترانسفورماتورهای جریان سنج دو نوع ساختمان کلی برای اندازه گیری وجود داد که عبارتند از: سیستم سه الکترودی وسیستم دو الکترودی. به طور کلی استفاده از سیستم سه الکترودی مناسبتر از نوع دو الکترودی می باشد چرا که هیچ جریان الکتریکی از الکترود مرجع عبور نمی کند و اندازه گیری دقیق در یک پتانسیل الکتریکی مشخص ممکن می باشد. در جریان های الکتریکی کم، سیستم دو الکترودی مناسب تر است چرا که هیچ نشانه ای از اختلال در کار سیستم اندازه گیری مشاهده نمی شود. در سیستم دو الکترودی،الکترود مرجع و الکترود شمارنده به عنوان یک الکترود ترکیب شده و مقاومت کمتری حاصل شده که از پلاریزاسیون الکترودها جلوگیری می شود. از آنجایی که پتانسیل اکسایش مواد موجود در نمونه متنوع است، پتانسیل اعمال شده در الکترود مرجع در انتخاب پذیری روش جریان سنج بسیار حائز اهمیت می باشد. چنانچه پتانسیل اکسایش آنالیت و مواد مزاحم بسیار به هم نزدیک باشند، جریان اندازه گیری شده تنها بیانگر غلظت آنالیت نخواهد بود. برای حل این مشکل روشهای گوناگونی وجود دارد. یکی از ساده ترین روش ها استفاده از یک فیلم غشاء است که تنها اجازه ی عبور به آنالیت داده شود، در این صورت عوامل مزاحم حضور نخواهند داشت و جریان اندازه گیری شده به تنهایی بیانگر غلظت آنالیت خواهد بود. یکی از رایجترین ترانسفورماتورهای جریان سنج، سلول کلارک می باشد [۵].

**سلول کلارک( الکترود اکسیژن)**[۱]

یکی از رایج ترین ترانسفورماتورهای جریان سنج، سلول کلارک می باشد. نمونه ای از یک سلول کلارک را می توان در شکل ۲-۲ مشاهده کرد:

[۱] Clark electrode