

# 微生物菌剂在船舶生化需氧量快速检测仪中的应用

周娟<sup>1</sup>, 李捷<sup>1\*</sup>, 于雪婷<sup>1</sup>, 俄保巴毛<sup>2</sup>, 扎西求忠<sup>2</sup>, 李松枝<sup>1</sup>, 明志军<sup>1</sup>

1 青岛理工大学 环境与市政工程学院, 山东 青岛

2 玉树州生态环境监测站, 青海 玉树

周娟, 李捷, 于雪婷, 俄保巴毛, 扎西求忠, 李松枝, 明志军. 微生物菌剂在船舶生化需氧量快速检测仪中的应用[J]. 微生物学报, 2025, 65(2): 715-728.

ZHOU Juan, LI Jie, YU Xueting, Ebaobamao, Zhaxiqiuzhong, LI Songzhi, MING Zhijun. Application of microbial agents in the rapid detector for BOD in the wastewater from ships[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(2): 715-728.

**摘要:** 【目的】针对国际海事组织对进港船舶生化需氧量(biochemical oxygen demand, BOD)检测中的特殊要求, 本研究开发一种 BOD 快速检测仪, 旨在实现对大量进港船舶生活污水进行快速检测的目的。【方法】丁酸梭菌与枯草芽孢杆菌制作的生物敏感元件在检测 BOD 标准溶液的过程中, 通过消耗溶解氧(dissolved oxygen, DO)引发电子转移, 使电导率(conductivity, COND)改变。溶解氧是监测过程中的关键指标及中介桥梁。通过建立电导率与溶解氧的二次多项式拟合模型, 并将溶解氧与样品浓度建立联系, 由此探索电导率变化与样品浓度之间的相关性。【结果】不同溶液表现的电导率变化趋势使 BOD 快速检测器能够区分 BOD 浓度超过 25 mg/L (COND 变化值的斜率小于-0.01)和低于 25 mg/L (COND 变化值的斜率大于-0.01)的废水。通过构建溶解氧与电导率值之间的高度相关性拟合曲线(决定系数  $R^2=0.97783$ ), 实现了对超低浓度范围(生化需氧量 BOD<25 mg/L)样品的高精度读取, 并在中国河北秦皇岛的船舶测试中获得超过 85% 的准确率。【结论】BOD 快速检测仪所读取的测量数据与传统的稀释接种法所获结果高度一致, 并且能够在 30 min 内对进港船舶生活污水中 BOD 进行快速量化分析, 确保了检测的高效性。

**关键词:** BOD 快速检测仪; BOD 监测; 丁酸梭菌; 枯草芽孢杆菌; 快速检测

资助项目: 青海省重点研发与转化项目(2024-SF-143); 山东省生态环境厅生态环境标准制修订项目(37000000040200120220031)

This work was supported by the Qinghai Province Key Research and Development and Transformation Project (2024-SF-143) and the Environmental Standards Formulation and Revision Project of Shandong Province Ecological Environment Bureau (37000000040200120220031).

\*Corresponding author. E-mail: jli@qut.edu.cn

Received: 2024-09-02; Accepted: 2024-11-13; Published online: 2024-12-31

## Application of microbial agents in the rapid detector for BOD in the wastewater from ships

ZHOU Juan<sup>1</sup>, LI Jie<sup>1\*</sup>, YU Xueting<sup>1</sup>, Ebaobamao<sup>2</sup>, Zhaxiqiuzhong<sup>2</sup>, LI Songzhi<sup>1</sup>, MING Zhijun<sup>1</sup>

1 School of Environmental and Municipal Engineering, Qingdao University of Technology, Qingdao, Shandong, China

2 Monitoring Station of Ecology and Environment of Yushu Prefecture, Yushu, Qinghai, China

**Abstract:** [Objective] To develop a rapid detector for biochemical oxygen demand (BOD) in the wastewater from ships entering ports in response to the stringent mandates of the International Maritime Organization (IMO). The objective is to facilitate swift detection of domestic wastewater produced by the multitude of vessels arriving at the port. [Methods] When testing the BOD standard solution, *Clostridium butyricum* and *Bacillus subtilis* were used to manufacture the biosensitive elements inducing electron transfer during the consumption of dissolved oxygen (DO), which led to a change in electrical conductivity (COND). By treating dissolved oxygen as a pivotal indicator and an intermediary in the monitoring process, this study explored the correlation between changes in electrical conductivity and sample concentration. Through the development of a quadratic polynomial fitting model that correlates electrical conductivity with dissolved oxygen levels, and by establishing a connection between dissolved oxygen and sample concentration, this research delves into the correlation between variations in electrical conductivity and the concentration of the sample. [Results] The changes in electrical conductivity exhibited by different solutions enabled the detector to rapidly distinguish between the wastewater with a BOD concentration higher than 25 mg/L (the slope of the COND variation value is less than  $-0.01$ ) and that below 25 mg/L (the slope of the COND variation value is greater than  $-0.01$ ). By establishing a highly correlated fitting curve between dissolved oxygen and electrical conductivity (coefficient of determination  $R^2=0.977\ 83$ ), this study achieved precise reading of samples within the ultra-low concentration range (BOD<25 mg/L). The accuracy rate of the measurements exceeded 85% in the *in-suit* tests conducted in Qinhuangdao, Hebei, China. [Conclusion] The measurement data read by the rapid detector for BOD is highly consistent with the results obtained by the dilution inoculation method. Moreover, the detector is capable of performing rapid quantitative analysis of BOD in domestic wastewater from ships entering ports within 30 min, demonstrating high detection efficiency.

**Keywords:** rapid detector for biochemical oxygen demand (BOD); BOD monitoring; *Clostridium butyricum*; *Bacillus subtilis*; rapid detection

人类产生的污水主要来自陆地，如城市下水道或污水处理厂。然而，船舶向海洋排放污水也会造成海洋污染和生态入侵。国际海事组

织 (International Maritime Organization, IMO) 在 2011 年 7 月 15 日通过的防污公约附件 IV [RESOLUTION MEPC.200(62)] 要求总吨位在

400 t 及以上或经认证可载运 15 人以上的国际航运船舶必须配备经批准的污水处理装置或经批准的污水混合和消毒系统或污水贮槽<sup>[1]</sup>。《污水处理装置排放标准和性能测试实施指南》(IMO 发布)中对特殊区域外的船舶出水样品的耐热大肠菌群数、总悬浮固体(total suspended solid, TSS)、无硝化的五日生化需氧量(biochemical oxygen demand, BOD)和化学需氧量(chemical oxygen demand, COD)、pH 等指标规定了限值<sup>[2]</sup>。上述指标中, BOD 是海事部门无法对进港船舶进行大量检查的关键因素。

传统的 BOD 检测采用的稀释接种法受水温、接种液活性、稀释比例等多种因素影响, 需要耗费较长时间(5 d), 导致大量进港船舶无法及时得到检测<sup>[3-4]</sup>。目前, BOD 的快速测定有 2 种方法可以实现。一种是通过 BOD 和 COD、总有机碳(total organic carbon, TOC)、溶解氧(dissolved oxygen, DO)、混合液悬浮固体(mixed liquor suspended solid, MLSS)、氧化还原电位(oxidation-reduction potential, ORP)、pH 等参数构建 BOD 检测模型, 利用机器学习实现 BOD 含量的间接检测, 但由于诸多模型参数间不易调节, 从而限制了该方法的使用<sup>[5-6]</sup>。1977 年, 日本科学家 Karube 等发明的微生物传感器仅几十分钟就可完成 BOD 测量, 自此传感器成为 BOD 快速测量的第二种方法<sup>[7]</sup>。微生物传感器是根据微生物消耗代谢有机物时产生的各种变化对 BOD 进行测定, 如荧光传感器<sup>[8]</sup>、生物电化学系统的生物传感器<sup>[9-11]</sup>、介质传感器<sup>[12-16]</sup>等。荧光传感器利用微生物代谢过程中产生色氨酸进行测定, 将色氨酸的荧光信号转化为等效的 BOD 值。荧光传感器检测速度极短, 灵敏性和自动化程度高, 但水中荧光干扰物质的存在会影响鉴定结果<sup>[3,17]</sup>。基于微生物电化学技术的传感器通过电位、电荷、电流、电导率

(conductivity, COND)、工作电极阻抗等的变化响应不同的分析物浓度, 包括微生物燃料电池(microbial fuel cell, MFC)和微生物电解池(microbial electrolytic cell, MEC)类型的传感器, 该方法稳健、准确, 可用于定量和定性分析<sup>[9,18-19]</sup>。

电话性生物膜是电信号输出的主要来源<sup>[20-23]</sup>, 决定信号响应过程和灵敏度。随着时间的推移, 生物膜堵塞以及恒温自降解等问题影响 BOD 监测<sup>[20]</sup>。生物膜的适应性较差, 在检测印染废水这类含毒重金属离子的污水时, 受到毒害的微生物无法发挥作用, 从而导致测试结果偏差增大<sup>[24]</sup>。固定化技术在限制微生物流失的基础上具有良好的机械强度, 对微生物具有一定的保护能力, 操作上减少了微生物培养和测量前的离心和洗涤等烦琐的工作过程<sup>[14,25]</sup>。常用的固定化材料包括聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA)<sup>[26]</sup>、海藻酸钠(sodium alginate, SA)<sup>[27]</sup>、聚丙烯酰胺(polyacrylamide, PAM)<sup>[28]</sup>、琼脂<sup>[29]</sup>等在内的多种材料, 有研究将 PVA-SA 凝胶中包埋地变形杆菌(*Proteus terrae*) ZQ02-MB, 制备的包埋颗粒对农药污染物具有良好的降解效果<sup>[30]</sup>。本研究使用 PVA 和 SA 作为固定化材料, 将微生物截留在一定空间内, 保持高浓度、高活性的状态, 在增强了对外界环境抵抗能力的同时减少了反应过程中微生物的流失<sup>[31]</sup>。

由于船舶生活污水中有可能存在海水成分, 这与陆地污水水体性质存在差异。呼吸速率型传感器往往会因为真实废水样品中复杂的有机成分而导致分析结果变得不真实<sup>[21,32]</sup>。使用单菌株的微生物传感器具有相对较好的稳定性和较长的寿命, 但受其对广谱底物的有限检测能力的限制, 混合群落在面对复杂培养基时有自我优化的能力<sup>[32-33]</sup>。从海水提取培养的多种微生物组成的生物膜可耐受高浓度盐, 从而提高了生物膜在极端条件下的寿命和稳定性<sup>[34-35]</sup>。以

上研究为生物敏感元件的改进提供了研究思路——即采用混合微生物来制备包埋剂,构建适应性强、功能稳定的生物敏感元件来提高其对海水的耐受性。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是单菌株传感器的常用菌种<sup>[14,36-37]</sup>,由于混合菌种对有机物的广谱性比较好,识别性比较强,可以扩大被氧化底物的范围<sup>[38]</sup>,本研究引入丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)。丁酸梭菌优势在于其耐高温、耐胃酸、耐胆盐等特性,能在复杂的环境中维持较强的活力,有望适应各种类型的检测样品<sup>[39]</sup>。微生物产生的胞外活性氧可促进有机污染物生物降解,为理解丁酸梭菌在微氧条件下的行为提供了可参考的背景信息<sup>[40]</sup>。易至等研究了丁酸梭菌的遗传多样性和生物学特性,有助于理解其在不同环境条件下的行为,包括微氧条件下的表现<sup>[41]</sup>。青贮好氧变质时,氧气的渗透间接刺激厌氧微生物的生长,说明了微氧状态下丁酸梭菌存在的合理性<sup>[42]</sup>。丁酸梭菌在微氧条件下对某些环境污染物的降解能力,使其在环境修复和监测领域具有应用潜力。

本研究旨在解决船舶污水中 BOD 的快速检测问题,研发了一种基于新型生物敏感材料的快速检测仪器。期望实现对超低浓度 BOD 的快速、准确检测,同时考察所制备的包埋颗粒在海水环境中的适应性。通过在河北秦皇岛地区的船舶上进行测试,验证该快速检测仪在实际应用中的性能,以期为进一步推广该技术至国内外的船舶生活污水 BOD 快速检测领域提供科学依据和技术保障。

## 1 材料与方法

### 1.1 传感器介绍

BOD 速测仪测量系统的示意图如图 1A 所示。将新材料包埋颗粒(直径约为 3 mm)作为反

应元件,采用的电导率探头(上海仪电科学仪器股份有限公司),可以捕捉有机物消耗时的电子转移信号,表现为电导率值(每 30 s 读取 1 次)。电子的产生和转移参与活细胞内各种酶催化的代谢活动,包括呼吸、光合作用、乳酸代谢和其他酶催化的反应<sup>[43]</sup>。Han 等使用的兼性电养生物呼吸产生的电流作为基准值,水样被有机物污染时,微生物转为异养呼吸,变现为阴极电流的下降。这是由于外源呼吸时,可生物降解的有机物质中获取的电子被转移到细菌细胞内部,扩散电流从恒定状态表现为电流下降<sup>[44]</sup>。按照传统的快速监测方法,根据溶解氧传感器的输出信号和目标底物浓度与 BOD 的相关性,可以通过溶解氧的还原计算出 BOD<sup>[25]</sup>。电导率探头插在反应器的中心,采集到的电流信号经过发送器到达控制器,根据已经编辑好的计算方式,控制器会对接收到的电导率信号执行移动平均处理,并输出测试结果至显示屏。BOD 速测仪实物如图 1B 所示,内部由发送器、控制器、显示屏、温度控制装置、磁力搅拌装置构成。为适应海上实地检测的环境,在测定之前需用温度控制装置分别对包埋剂和 BOD 标准溶液保温 15 min,在 180 r/min 的转速下电磁搅拌 10 s 使包埋剂与水样充分混合。

### 1.2 主要试剂

聚乙烯醇(PVA)、氯化钾(KCl),天津市光复精细化工研究所;海藻酸钠(SA),上海强顺化学试剂有限公司;葡萄糖( $C_6H_{12}O_6$ ),上海埃彼化学试剂有限公司;谷氨酸( $C_5H_9NO_4$ ),无水氯化钙( $CaCl_2$ ),国药集团化学试剂有限公司;磷酸二氢钾( $KH_2PO_4$ ),天津市科密欧化学试剂有限公司;磷酸氢二钠( $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ),天津市恒兴化学试剂制造有限公司。除非另有说明,本研究中使用的所有试剂均为实验室级材料,所有溶液均使用高纯度去离子水(Milli-Q)制备。

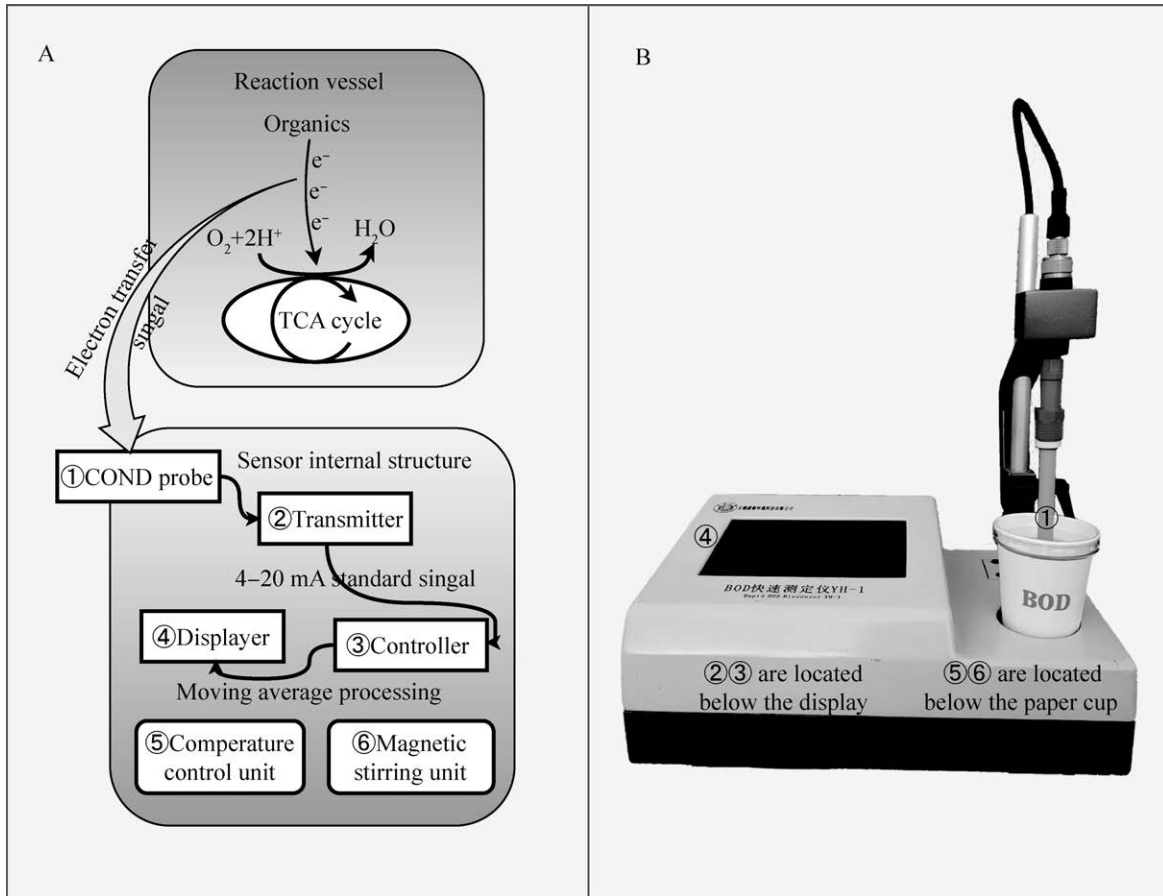


图1 BOD快速检测仪运行原理(A)及实物图(B)。A图中仪器组成各部分所处位置在B图的相应位置进行了标注。

Figure 1 Operating principle of the BOD rapid detector (A) and physical image (B). The positions of each component of the instrument in Figure A are marked in the corresponding positions in Figure B.

**BOD 标准溶液的制备：**将葡萄糖和谷氨酸在 103 °C 下干燥 2 h，冷却至室温，分别称取 136.4 mg 葡萄糖和谷氨酸配制 BOD 标准溶液，该溶液已知生化需氧量值为(2 000±160) mg/L，低浓度的 BOD 溶液通过稀释该 BOD 标准溶液制备。

**电解质溶液：**低浓度电解质溶液配制方法为称取 745 mg 氯化钾(KCl)溶解于去离子水中并定容至 100 mL。高浓度电解质溶液配制方法为称取 12 g 氯化钾(KCl)溶解于去离子水中并定容至 100 mL。

磷酸盐缓冲溶液(PBS, 5 mol/L, pH 7.0)用

于稀释样品和活化并洗涤微生物球形颗粒，根据标准方法制备。

**交联溶液(浓度为 6%)：**称取 6 g CaCl<sub>2</sub> 固体溶解于去离子水中并定容至 100 mL。

### 1.3 固定化微生物细胞颗粒

本研究中使用枯草芽孢杆菌、丁酸梭菌以及二者混合菌的菌粉进行包埋，菌粉均由无锡虞衡环境科技有限公司生产。丁酸梭菌菌粉与枯草芽孢杆菌菌粉制备步骤如下：(1) 生物发酵：将丁酸梭菌和枯草芽孢杆菌分别进行生物发酵，得到大量的微生物菌体；(2) 沸腾干燥：分别对发酵后的产物进行 70 °C 干燥，获得含水量≤5%

的微生物菌剂产品；(3) 粉碎：分别将干燥后的生物发酵产物进行粉碎，丁酸梭菌含菌量为 100 亿/g，枯草芽孢杆菌含菌量为 1 000 亿/g。混合菌粉是由丁酸梭菌和枯草芽孢杆菌粉碎后的生物发酵产物按含菌量的比例混合复配。

将质量比为 1:10 的 PVA 与 SA (PVA 质量为 0.12 g) 溶于 20 mL 去离子水中，然后冷却至 40 °C，混合溶液中添加 0.8 g 丁酸梭菌或 0.08 g 枯草芽孢杆菌或 0.12 g 混合菌(每 1 mL 包埋剂中约含 4 亿菌种)。取适量交联剂(CaCl<sub>2</sub> 溶液)置于培养皿中，利用 5 mL 注射器吸取一定量的加有菌种的混合液，将混合液体缓慢滴入交联剂中形成大小均匀(直径约为 3 mm)的球形颗粒。交联一定时间后，用生理盐水洗涤颗粒，然后在 4 °C 下干燥 24 h。使用前在 4 °C 条件下储存。包埋颗粒如图 2 所示。

#### 1.4 菌种的选取

微生物传感器检测方法中，生物识别元件为微生物传感器的核心部件，对待测底物具有高选择性分子识别功能。本文将单一菌种或者混合菌种作为生物敏感元件，对包埋剂的类型以及配比进行优化，为包埋剂在实际工程中的应用提供了标准化流程。

(1) 为探究投加不同菌种对不同 BOD 溶液

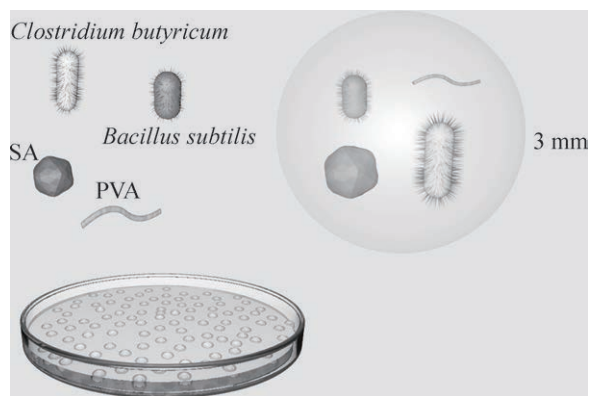


图2 包埋颗粒示意图

Figure 2 Schematic diagram of embedded particles.

区分的准确度，进行目标菌的筛选。实验室有好氧菌枯草芽孢杆菌、厌氧菌丁酸梭菌以及两者的混合菌种。丁酸梭菌含量为 100 亿/g，枯草芽孢杆菌含量为 1 000 亿/g。采用单一菌粉以及混合菌粉所制作的包埋剂分别对 BOD 标准溶液进行测量，选择出读数最为稳定准确的菌种。

(2) 探究投加不同质量的包埋剂对曲线制作的影响。在筛选出合适菌种条件下，设置 32、64、96、128 亿单位菌种 4 个浓度梯度，分别投进标样中进行实验测量(实际操作时为加入 8、16、24、32 mL 包埋剂作为含菌量变化梯度)，确定合适的投加量。当适宜投加量超出此区间后，增加 3.5、5、6.5 mL 的含菌量变化梯度。

(3) 对 BOD 标准溶液 (BOD<sub>10</sub>、BOD<sub>30</sub>、BOD<sub>60</sub>、BOD<sub>100</sub>、BOD<sub>400</sub>) 进行测量，通过电导率变化值区分不同浓度的 BOD 标准溶液。

#### 1.5 关系曲线的确定

Liu 等<sup>[25]</sup>之前已经确立了针对市政污水、生活污水的高(>800 mg/L)、中(400–800 mg/L)、低(<400 mg/L) 3 种针对不同浓度范围的 BOD 曲线<sup>[25]</sup>。这 3 条曲线不能满足 IMO 对 BOD 的检测需求。因此需对检测范围进行重新地划分 (BOD ≤ 25 mg/L, 25 mg/L < BOD < 50 mg/L, BOD ≥ 50 mg/L)。本研究建立的一条超低浓度曲线可针对 BOD ≤ 25 mg/L 的溶液进行测量，并重复多次试验，校准曲线系数。

#### 1.6 实际废水测定

现场的船舶测试是检测该快速检测仪是否符合 IMO 检测标准的重要手段。在实际应用前，将开发出的 BOD 速测仪与拥有 CMA、CNAS 资质的第三方检测机构秦皇岛清宸环境检测技术有限公司对国家标准样品的测定结果进行比较。仪器测试结果符合 IMO 要求后，与河北秦皇岛海事局一同进行海上船试，并与第三方测验 BOD 进行比对。所取溶液在未经稀释的情况

下进行保温, 对包埋剂进行活化后, 经过磁力搅拌器混合 10 s 后即可上机测量。

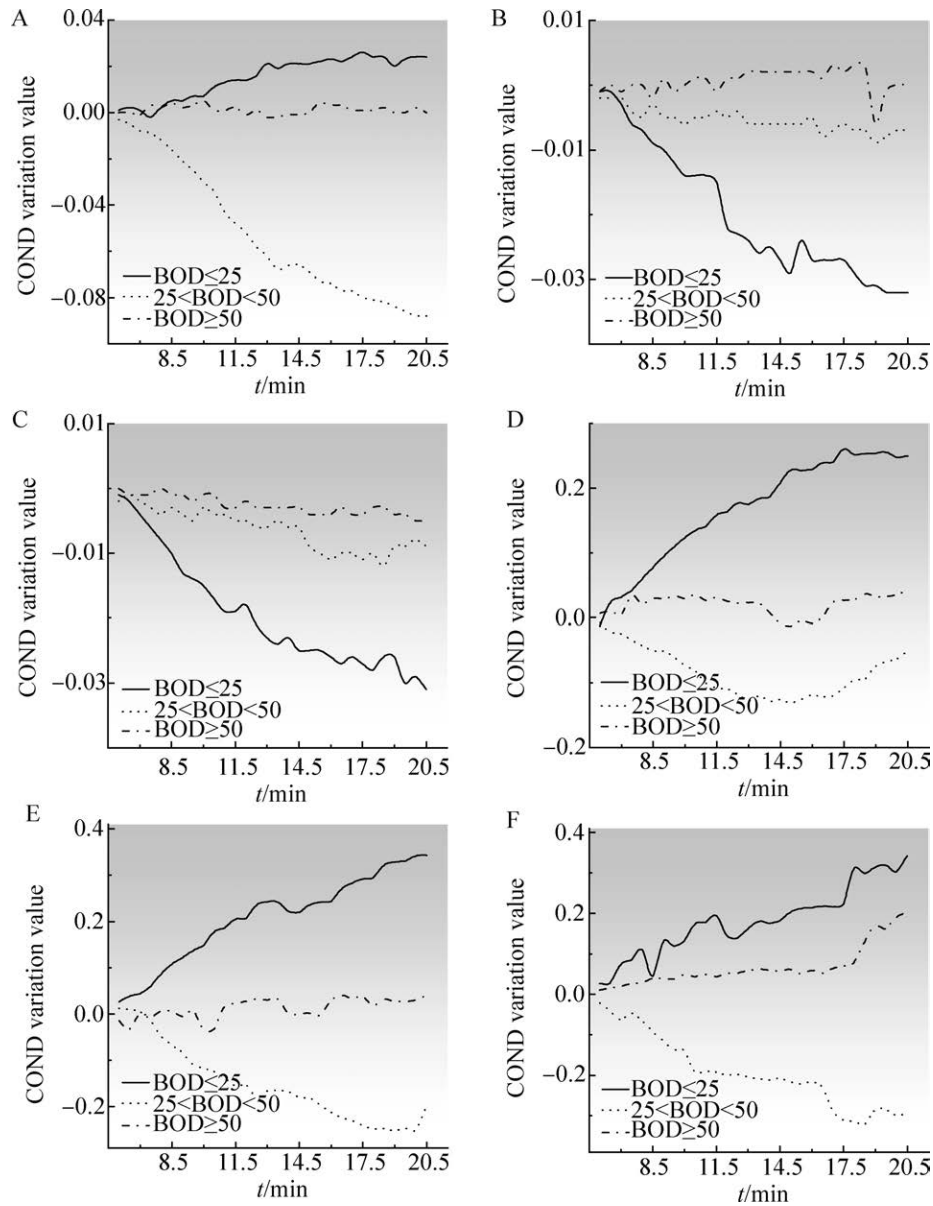
## 2 结果与分析

### 2.1 菌种和菌量的确定

图 3 展示了在引入不同菌种时电导率 (COND) 的变化情况, 包埋剂添加量为 5 mL。将瞬时电导率值减去初始状态下的电导率值, 以消除初始电导率值的影响, 图中显示的是 6 min 后的处理值, 去除了不稳定的测量前期读数。根据 IMO 对船舶出水样品的管控要求, 对  $BOD \leq 25$  mg/L (曲线 1, BOD 浓度为 10 mg/L)、 $25$  mg/L  $< BOD < 50$  mg/L (曲线 2, BOD 浓度为 30 mg/L)、 $BOD \geq 50$  mg/L (曲线 3, BOD 浓度为 60 mg/L) 3 种标准溶液的斜率进行区分与判读。在单独添加丁酸梭菌的情况下, 曲线 2 呈现出显著的离散趋势, 曲线 1 与曲线 3 则相互靠近, 这一现象与预期目标不符。然而, 值得注意的是, 在测定丁酸梭菌时, 曲线的波动幅度较小, 显示出较高的稳定性, 这为检测仪器在数据提取与分析过程中提供了极大的便利。当仅投加枯草芽孢杆菌时, 曲线 1 与其他曲线相比展现出显著的区分度, 枯草芽孢杆菌的介入显著影响了低浓度 BOD 溶液的电导率变化。在检测过程中, 曲线 3 在后期出现了急剧的下降和上升, 其波动幅度较大, 这一现象可能引起检测仪器的误判。此外, 在活化枯草芽孢杆菌菌液的过程中, 振荡混合时产生了大量气泡, 这些气泡在菌液中弥漫, 可能导致取样过程中出现不准确的情况。混合菌种测量过程中, 曲线 1 与其他曲线的显著差异为判断 25 mg/L 以下 BOD 标准溶液提供了更为精确的依据。样品检测时处于封闭状态, 在检测后期, 随着 DO 的消耗, 水体逐渐趋近于厌氧状况, 丁酸梭菌开始发挥作用。Sun 等富集筛选了非严格厌氧条件下化工厂

废水样品中能够将粗甘油转化为 1,3-丙二醇的微生物联合体, 其中严格厌氧的梭菌类占比达 85%<sup>[45]</sup>。这是因为在发酵初期, 克雷伯氏菌和埃希氏菌等兼性厌氧菌消耗 DO, 促进厌氧条件的建立, 为丁酸梭菌的生长提供条件。微氧条件下, 乙酰丁酸梭菌和蜡样芽孢杆菌共生体系生产乙醇时微厌氧条件的建立与此类似<sup>[46]</sup>。这也是工业上采用的混合菌种包括丁酸梭菌的原因, 正是由于兼性菌的存在, 操作者不需要创造严格厌氧环境<sup>[47-48]</sup>。丁酸梭菌的存在使电导率变化值更加稳定, 从而提高了检测的可靠性。本快速检测仪对高盐度的 BOD 溶液进行测定, 发现, 曲线 1、曲线 2、曲线 3 依然能够明确区分, 见图 3D-3F。在盐度较高的存在下, 曲线的区分形状与添加单一的丁酸梭菌类似(图 3A), 丁酸梭菌抵抗不良环境的干扰强, 使该包埋剂仍然能够发挥作用。

包埋剂的制备原料选用了混合菌粉, 通过精确调配其加入量, 以便绘制后续的反应曲线。在此过程中, 通过调整包埋剂的加入体积来控制其投加量, 结果如图 4 所示。在保持 BOD 标准溶液浓度为 50 mg/L 的条件下, 记录了不同包埋剂体积加入后溶液中 DO 和 COND 的变化情况。实验结果显示, 当包埋剂小球的投加量为 5 mL 时, DO 值在最初的 5 min 内迅速下降, 并在 5-10 min 内逐渐趋于平衡, 这符合快速检测的要求。相比之下, 当包埋剂投加量分别为 8、16、24、32 mL 时, DO 值的下降速度过快, 导致有效监测时间大幅缩短。此外, 随着包埋剂投加量的增加, 溶液的原始 COND 值也逐渐增大, 表明包埋剂投加量越小, 对水质初始 COND 的影响越小。选择添加 5 mL 的包埋剂进行检测, 这是为保证其在不良环境中能够活化使用的稳妥选择。



**图3** 菌种类型和盐度对电导率的影响。A、B、C为不同菌种测定标准BOD溶液时的电导率变化值。A：添加单一丁酸梭菌；B：引入单一枯草芽孢杆菌；C：添加混合菌。D、E、F：不同盐度下测定标准BOD溶液时的电导率变化值(使用混合菌，D、E、F分别加入高浓度电解质溶液10、20、30 mL)。图中纵坐标为每隔30 s读取的瞬时电导率值与初始状态下电导率值的差。

**Figure 3** The impact of strain type and salinity on electrical conductivity. A, B, C represent the changes in electrical conductivity when different bacterial species are used to measure the standard BOD solution. A is treated with a single *Clostridium butyricum*; B is introduced with a single *Bacillus subtilis*; C is supplemented with a mixed bacterial culture. D, E, F are the changes in electrical conductivity when measuring the standard BOD solution at different salinities (using a mixed bacterial culture, with D, E, F respectively adding 10, 20, 30 mL of high-concentration electrolyte solution). The vertical axis of the graph represents the difference between the instantaneous conductivity values read every 30 seconds and the conductivity value at the initial state.



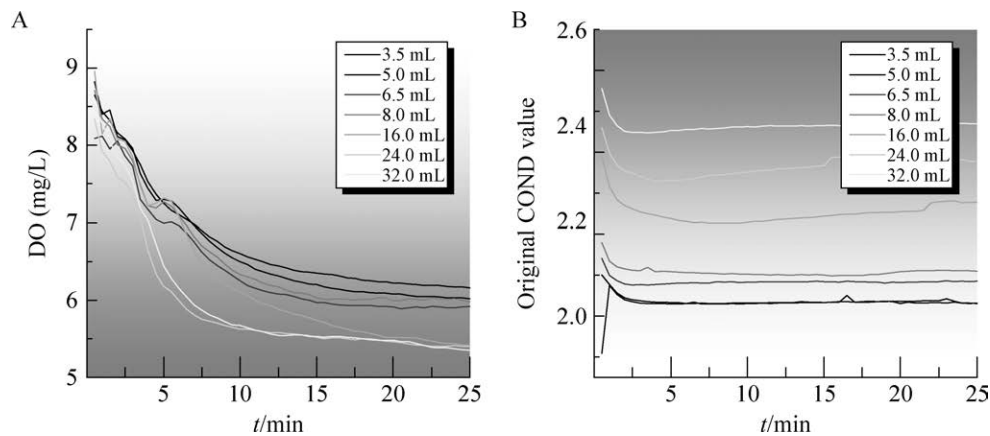


图4 不同体积的包埋剂投加时DO与COND的变化

Figure 4 The changes in dissolved oxygen (A) and conductivity (B) when different volumes of embedded particles are added.

## 2.2 BOD 标准溶液的区分

通过对不同 BOD 标准溶液的斜率进行多次试验的统计与分析, 发现在 BOD 浓度为 10 mg/L (代表  $BOD \leq 25$  mg/L 的溶液), COND 变化值的斜率均小于 -0.01, 超低浓度的溶液由超低浓度关系曲线进一步读取具体数值。在 BOD 浓度为 30 mg/L (代表  $25$  mg/L  $< BOD < 50$  mg/L 的溶液), COND 变化值的斜率均小于 -0.002, 这足以将该浓度与其他更高浓度的溶液区分开来。值得注意的是, 当 BOD 浓度进一步增加时 ( $BOD \geq 50$  mg/L 的溶液), COND 变化值的斜率往往呈现出正值, 如图 5 所示, 这可能是由于细菌细胞在高浓度有机物条件下发生了复杂的生化过程。

## 2.3 关系曲线的确定

本研究建立了超低浓度关系曲线, 该曲线可针对  $BOD < 25$  mg/L 的溶液进行测量。关系曲线的建立采用移动平均法对 COND 值与 DO 值进行处理, 对移动平均法处理后的值进行时间累加, 最后建立二者关系曲线, 如图 6 所示。使用该曲线检测 BOD 值在 25 mg/L 以下的 BOD 标准溶液, 并重复多次试验。然后, 检测超低

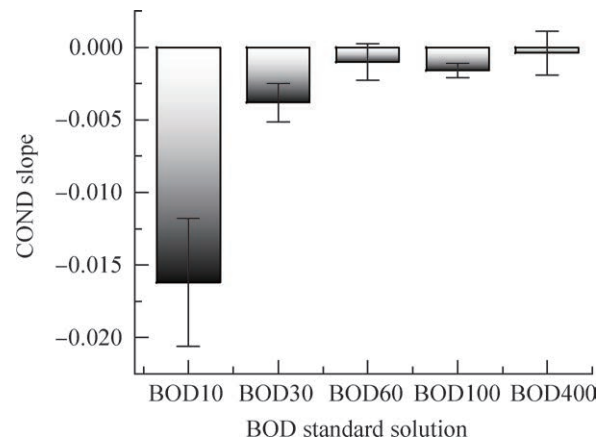


图5 不同BOD标准溶液的COND处理值斜率

Figure 5 Slope of COND treatment values for different BOD standard solutions.

浓度关系曲线的偏差程度, 并校准曲线系数, 所建立曲线相关性系数高达 0.977 83。

如图 5 所示, 在 BOD 浓度偏低时, 电导率下降值很大, 随着 BOD 浓度的上升, 电导率值的变化逐渐减小, 甚至有时会出现上升趋势, 由此可以判断出 BOD 浓度是在 25 mg/L 以上还是 25 mg/L 以下, 再经由超低浓度曲线的读数, 就可对水质进行的判断。

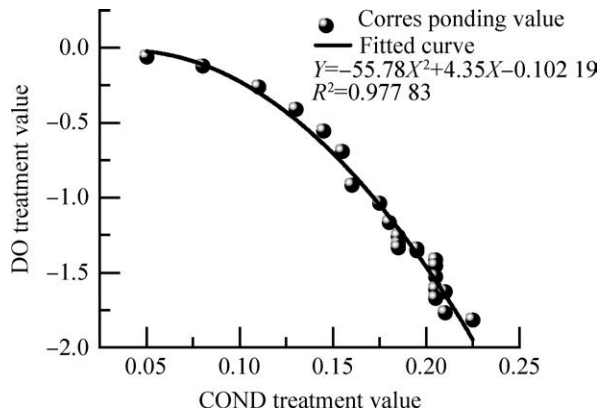


图6 超低浓度关系曲线的确定

Figure 6 Determination of ultra-low concentration relationship curve.

## 2.4 重复性和偏差

重复性是一个重要的参数，可以用来指示原型的精度。在相同的条件下对相同的样品进行了测试，以分析原型的精度。本研究中，在每个适用范围内选择 5 个不同质量浓度的标准样品进行检测，并对每个浓度样品进行 3 次重复测试，测量值如表 1 所示。BOD 在 60 mg/L

表1 BOD标准溶液的重复性检验

Table 1 Repeatability test of BOD standard solution

BOD concentration (mg/L)	Measurement value 1	Measurement value 2	Measurement value 3	Standard deviation
10	16	19	19	1.41
30	41	42	41	0.47
60	43	>50	39	-
80	>50	>50	>50	-
200	>50	>50	>50	-

BOD $\geq$ 50 mg/L的溶液只能实现测定范围的界定，所以没有标准差的计算值。

The solution with BOD $\geq$ 50 mg/L can only achieve the definition of the measurement range, therefore, there is no calculated value for the standard deviation.

表2 第三方检测机构与快速检测仪测量值的比较

Table 2 Comparison of third-party testing organizations and detector measurements

Sample ID	Dilution inoculation (mg/L)	BOD rapid detector (mg/L)	Relative error
National standard sample 1	16	15	0.062 5
National standard sample 2	22	18	0.182 0
National standard sample 3	60	56	0.066 7

的溶液处于分界线左右，存在误判的可能，其他浓度的 BOD 都显示出测量结果的准确性，对实验数据的分析表明，该检测方法具有较高的检测精度。

## 2.5 岸基实验与船试结果

实际应用前，将开发出的 BOD 速测仪与第三方检测机构的测定结果进行比较，第三方检测机构为秦皇岛清宸环境检测技术有限公司，采用稀释接种法进行 BOD 的测定。如表 2 所示，快速检测仪测量的国标样品 BOD 测量值与稀释接种法得到的结果较为一致，准确度达到实际样品测定要求。

测试原型的各种性能的最终目的是探索原型用于检测实际废水样本的可行性。本仪器于 2022 年 7 月和 2023 年 10 月，在河北秦皇岛与当地海事局进行联合测试，共检测 9 只船。检测结果如表 3 所示。

此次船舶测试专用款仪器，因考虑到所取水样为船舶生活污水处理后出水，因此没有加

表3 BOD速测仪与第三方检测结果对比

Table 3 Comparison of BOD rapid measuring instrument and third party test results

Project name	Dilution inoculation (mg/L)	BOD rapid detector (mg/L)
Ship1 in Qinhuangdao Port	52.0	>50
Ship2 in Qinhuangdao Port	Extremely large	>50 (1 462)
Hang Tong	9.1	<25
Hesheng Xinshun	17.1	>50
East Sea	23.6	<25
Baoxing Mountain	30.8	>25
Dongyao Haitai	46.8	>25
Zhong Hui76	9.1	<25
Xin Rong79	9.1	<25

载专门针对类似清水的判断程序, 从而导致仪器程序对于极低有机物水样出现一定几率的误判, 导致表 3 中对青岛合盛鑫顺再生资源有限公司的检测出现错误, 未来添加此类工况到程序中可以帮助判断水样接近于清水的状况。由第三方检测单位实验室人员提供的国标 BOD 低浓度盲样(BOD=18 mg/L), 仪器可准确测量出结果(测量结果 BOD<25 mg/L)。仪器在第三方的应用测量结果见表 4。

### 3 讨论

我国于 2002 年发布的《水质 生化需氧量(BOD)的测定 微生物传感器快速测定法》<sup>[49]</sup>采用丝孢酵母菌制成菌膜。菌膜内菌种应均匀, 膜与膜之间应尽可能一致, 以保证测定结果的一致。此外生物菌膜的连续使用寿命应大于 30 d。(1) 本研究使用混合菌种制成的包埋剂为敏感元件, 包埋剂实现定量化固定微生物并保证较好的传质能力, 减少反应过程中微生物的流失的同时可以保证待检测水样与微生物的充分混合和反应, 无须解决菌膜之间不一致的问题。(2) 每份包埋剂为次抛, 也不用考虑其菌膜

表4 BOD速测仪测量结果

Table 4 BOD rapid measuring instrument measurement results

Project name	BOD rapid detector (mg/L)	Project name	BOD rapid detector (mg/L)
Sample 1	9	Sample 14	30
Sample 2	54	Sample 15	2
Sample 3	35	Sample 16	37
Sample 4	44	Sample 17	26
Sample 5	53	Sample 18	21
Sample 6	48	Sample 19	72
Sample 7	13	Sample 20	77
Sample 8	25	Sample 21	23
Sample 9	14	Sample 22	28
Sample 10	36	Sample 23	29
Sample 11	14	Sample 24	10
Sample 12	19	Sample 25	13
Sample 13	14		

替换的问题。(3) 基于微生物的 BOD 检测仪器一般面临着实际应用时微生物将受到环境温度变化的显著影响<sup>[50]</sup>, 一种基于生物电化学系统(bioelectrochemical system, BES)的 BOD 生物传感器在养猪废水中得到应用, 生物传感器在测试槽中精确测量了 BOD, 但在不断变化的水温条件下无法做到<sup>[10]</sup>, 可通过恒温器解决这一问题。(4) 包埋剂对高盐度海水的耐受增强, 提高了对船舶生活污水检测的适用性与针对性, 海水存在下不影响其检测性能。

BOD 快速检测仪 30 min 内输出检测结果, 投入使用多台检测仪能快速测定进港的船只, 减少国际航船的停泊时长, 但该 BOD 快速检测仪仍有需要改进的地方, 作为船试机, 要想做到便捷上船测量, 有两点硬件是需改进的。一是装置的一体化, 各部分功能器件要集合为一体。二是装置需自带独立电源, 实际船舶测试需要寻找有电源插座的位置检测, 因为有的船是买的日本船, 船上插座是日标(110 V)。

## 4 结论

本研究与中华人民共和国海事局合作开发了一种船舶生活污水的快速 BOD 检测仪, 此检测仪能在 30 min 以内准确区分 BOD 在 25 mg/L 以上及 25 mg/L 以下的船舶生活污水。使用的新型包埋剂在混有海水的检测中也能维持稳定的检测性能。实验室重复性检测结果表明, 除了分界线左右的 BOD 值存在误判的可能, 其他浓度的 BOD 都显示出了测量结果的准确性, 且重复性较好, 表明该检测方法具有较高的检测精度。在中国河北秦皇岛的实际应用中, 该仪器检测准确度大于 85%, 能够满足船舶生活污水中 BOD 快速测定的要求。

## 致谢

秦皇岛海事局周付明等同志在船舶测试时为本研究提供了重要的帮助, 在此谨致谢忱。

## 作者贡献声明

周娟: 论文撰写与修改; 李捷: 研究构思和设计; 于雪婷: 可视化分析; 俄保巴毛: 参与论文讨论; 扎西求忠: 参与论文讨论; 李松枝: 协助实验操作; 明志军: 数据收集与处理。

## 作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

## 参考文献

- [1] 李亚军, 周书言. 船舶生活污水管理存在的问题及对策[J]. 世界海运, 2024, 47(2): 27-30.  
LI YJ, ZHOU SY. Issues and countermeasures in the management of vessel domestic wastewater[J]. *World Shipping*, 2024, 47(2): 27-30 (in Chinese).
- [2] 陈日冲, 王娜. 内河船舶生活污水污染现状及对策[J]. 船舶物资与市场, 2021, 29(5): 76-78.  
CHEN RC, WANG N. Status and countermeasures of domestic sewage pollution from inland waterway vessels[J]. *Marine Equipment/Materials & Marketing*, 2021, 29(5): 76-78 (in Chinese).
- [3] LIN HF, XU N, XING GW, SHANG YT, WANG XR, LIN L. Microfluidic chip-based microbial metabolism-indexed BOD sensor for rapid determination of biochemical oxygen demand[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2024, 400: 134868.
- [4] 王辉, 王洪涛, 薛飞, 李海滨, 郑琳琳. 采测分离工作中五日生化需氧量检测方法的选择及注意事项[J]. 皮革制作与环保科技, 2021, 2(15): 52-53.  
WANG H, WANG HT, XUE F, LI HB, ZHENG LL. Selection of BOD<sub>5</sub> detection method and matters needing attention in mining, measurement and separation[J]. *Leather Manufacture and Environmental Technology*, 2021, 2(15): 52-53 (in Chinese).
- [5] 王焕卿, 冯巍巍, 蔡宗岐, 侯耀斌, 刘增东. 山东近海海水 COD 与 BOD 相关性研究[J]. 广西科学, 2021, 28(2): 125-129.  
WANG HQ, FENG WW, CAI ZQ, HOU YB, LIU ZD. Study on correlation between COD and BOD in the coastal sea-water of Shandong Province[J]. *Guangxi Sciences*, 2021, 28(2): 125-129 (in Chinese).
- [6] 廖志博, 江天甲, 马丽娟. 海水生化需氧量快速检测技术研究进展[J]. 化学与生物工程, 2023, 40(3): 17-24.  
LIAO ZB, JIANG TJ, MA LJ. Research progress in rapid detection technology of BOD in seawater[J]. *Chemistry & Bioengineering*, 2023, 40(3): 17-24 (in Chinese).
- [7] KARUBE I, MATSUNAGA T, MITSUDA S, SUZUKI S. Microbial electrode BOD sensors[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1977, 19(10): 1535-1547.
- [8] KHAMIS K, BRADLEY C, GUNTER HJ, BASEVI G, STEVENS R, HANNAH DM. Calibration of an *in situ* fluorescence-based sensor platform for reliable BOD<sub>5</sub> measurement in wastewater[J]. *Water Science and Technology*, 2021, 83(12): 3075-3091.
- [9] WANG ZY, LIAO CM, ZHONG ZH, LIU SY, LI M, WANG X. Design, optimization and application of a highly sensitive microbial electrolytic cell-based BOD biosensor[J]. *Environmental Research*, 2023, 216: 114533.
- [10] YAMASHITA T, HASEGAWA T, HAYASHIDA Y, NINOMIYA K, SHIBATA S, ITO K, MIZUGUCHI H, YOKOYAMA H. Energy savings with a biochemical oxygen demand (BOD)- and pH-based intermittent aeration control system using a BOD biosensor for swine wastewater treatment[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2022, 177: 108266.
- [11] YI Y, ZHAO T, XIE BZ, ZANG YX, LIU H. Dual detection of biochemical oxygen demand and nitrate in water based on bidirectional *Shewanella lothica* electron transfer[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 309: 123402.
- [12] ARLYAPOV VA, KHARKOVA AS, KURBANALIYEVA SK, KUZNETSOVA LS, MACHULIN AV, TARASOV SE, MELNIKOV PV, PONAMOREVA ON, ALFEROV VA, RESHETILOV AN. Use of biocompatible redox-active polymers based on carbon nanotubes and modified organic matrices for development of a highly sensitive BOD biosensor[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2021, 143: 109706.
- [13] ZHAO CY, WANG GS, SUN MT, CAI ZW, YIN ZC,

- CAI YR. Bacterial cellulose immobilized *S. cerevisiae* as microbial sensor for rapid BOD detection[J]. *Fibers and Polymers*, 2021, 22(5): 1208-1217.
- [14] HU JF, LI YQ, GAO GW, XIA SH. A mediated BOD biosensor based on immobilized *B. subtilis* on three-dimensional porous graphene-polypyrrole composite[J]. *Sensors*, 2017, 17(11): 2594.
- [15] SERGEEVNA KA, VLADIMIROVNA PD, VALERIEVICH MA, ALEKSEEVICH AV. Acceptor properties of “carbon nanotubes-redox-active polymer based on bovine serum albumin modified with ferrocenecarboxaldehyde” composite for creating a BOD biosensor with *Blastobotrys adenivorans* BKM Y-2677 yeast[J]. *3 Biotech*, 2023, 13(4): 112.
- [16] KHARKOVA AS, ARLYAPOV VA, TUROVSKAYA AD, AVTUKH AN, STARODUMOVA IP, RESHETILOV AN. Mediator BOD biosensor based on cells of microorganisms isolated from activated sludge[J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2019, 55(2): 189-197.
- [17] 张卫宏, 武宇芳, 曹轶男, 于哲, 董建民. BOD<sub>5</sub>荧光测定法与标准方法在地表水监测中的对比性研究[J]. *分析测试技术与仪器*, 2024, 30(2): 110-117.
- ZHANG WH, WU YF, CAO YN, YU Z, DONG JM. Comparative study of BOD<sub>5</sub> fluorescence method and standard method in natural water monitoring[J]. *Analysis and Testing Technology and Instruments*, 2024, 30(2): 110-117 (in Chinese).
- [18] SHARMA A, CHHABRA M. The versatility of microbial fuel cells as tools for organic matter monitoring[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 377: 128949.
- [19] GUO F, LIU Y, LIU H. Hibernations of electroactive bacteria provide insights into the flexible and robust BOD detection using microbial fuel cell-based biosensors [J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 753: 142244.
- [20] LIU CY, LI ZH, JIANG DM, JIA JB, ZHANG Y, CHAI Y, CHENG XD, DONG SJ. Demonstration study of biofilm reactor based rapid biochemical oxygen demand determination of surface water[J]. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 2016, 8: 8-13.
- [21] LIU CY, ZHAO HJ, ZHONG LJ, LIU C, JIA JB, XU XL, LIU L, DONG SJ. A biofilm reactor-based approach for rapid on-line determination of biodegradable organic pollutants[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2012, 34(1): 77-82.
- [22] NAKAMURA H, SUZUKI K, ISHIKURO H, KINOSHITA S, KOIZUMI R, OKUMA S, GOTOH M, KARUBE I. A new BOD estimation method employing a double-mediator system by ferricyanide and menadione using the eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Talanta*, 2007, 72(1): 210-216.
- [23] CHENG L, QUEK SB, CORD-RUWISCH R. Hexacyanoferrate-adapted biofilm enables the development of a microbial fuel cell biosensor to detect trace levels of assimilable organic carbon (AOC) in oxygenated seawater[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2014, 111(12): 2412-2420.
- [24] 李洛娜, 钮玉龙, 李捷, 梁彦娟, 张乐. BOD微生物传感检测仪中高效微生物膜的研究[J]. *环境工程学报*, 2009, 3(3): 437-441.
- LI LN, NIU YL, LI J, LIANG YJ, ZHANG Y. Study on efficient microbial membrane applied in BOD microbial biosensors[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2009, 3(3): 437-441 (in Chinese).
- [25] LIU YM, LI J, WAN NX, FU TY, WANG LL, LI C, QIE ZH, ZHU A. A current sensing biosensor for BOD rapid measurement[J]. *Archaea*, 2020, 2020: 8894925.
- [26] WANG JL, ZHANG YX, WANG YY, XU RH, SUN ZH, JIE Z. An innovative reactor-type biosensor for BOD rapid measurement[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, 25(7): 1705-1709.
- [27] SERGIO AMD, BUSTOS TY. Biodegradation of wastewater pollutants by activated sludge encapsulated inside calcium-alginate beads in a tubular packed bed reactor[J]. *Biodegradation*, 2009, 20(5): 709-715.
- [28] 王济港, 王庆国. 微生物固定化技术在水环境和能源领域的应用[J]. *广东化工*, 2018, 45(3): 83-84.
- WANG JG, WANG QG. Application of microbial immobilization in wastewater treatment and energy[J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2018, 45(3): 83-84 (in Chinese).
- [29] ELKAHLOUT K, ALIPOUR S, EROGLU I, GUNDUZ U, YUCEL M. Long-term biological hydrogen production by agar immobilized *Rhodobacter capsulatus* in a sequential batch photobioreactor[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2017, 40(4): 589-599.
- [30] YANG LY, YANG XY, GUO JT, YANG ZY, DU YH, LU QQ, ZHONG GH. Invasive plant-derived biochar for sustainable bioremediation of pesticide contaminated soil [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2024, 481: 148689.
- [31] 黄双, 顾恒, 邓冬梅, 左华江. 微生物固定化技术及在废水处理中的应用[J]. *现代化工*, 2024, 44(6): 65-69.
- HUANG S, GU H, DENG DM, ZUO HJ. Microbial immobilization technology and its application in wastewater treatment[J]. *Modern Chemical Industry*, 2024, 44(6): 65-69 (in Chinese).
- [32] LIU CY, MA C, YU DB, JIA JB, LIU L, ZHANG BL, DONG SJ. Immobilized multi-species based biosensor for rapid biochemical oxygen demand measurement[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011, 26(5): 2074-2079.
- [33] COMMAULT AS, LEAR G, BOUVIER S, FEILER L, KARACS J, WELD RJ. Geobacter-dominated biofilms used as amperometric BOD sensors[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2016, 109: 88-95.
- [34] LV H, YANG Q, CHEN YL, XU XL, LIU CY, JIA JB. Determination of seawater biochemical oxygen demand based on *in situ* cultured biofilm reactor[J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2021, 903: 115872.
- [35] JIANG YQ, XIAO LL, ZHAO L, CHEN X, WANG XR, WONG KY. Optical biosensor for the determination of BOD in seawater[J]. *Talanta*, 2006, 70(1): 97-103.
- [36] 廖承美, 仲子涵, 刘思炎, 李田, 王鑫. 基于微生物电化学技术的BOD传感器的研究进展[J]. *工业水处理*, 2022, 42(6): 10-21.
- LIAO CM, ZHONG ZH, LIU SY, LI T, WANG X. Research advances on BOD sensor based on microbial electrochemical technology[J]. *Industrial Water Treatment*, 2022, 42(6): 10-21 (in Chinese).
- [37] SONAWANE JM, EZUGWU CI, GHOSH PC. Microbial

- fuel cell-based biological oxygen demand sensors for monitoring wastewater: state-of-the-art and practical applications[J]. *ACS Sensors*, 2020, 5(8): 2297-2316.
- [38] 杨睿彬, 孔旭, 鲍国泰, 孙义新, 王媛媛, 李捷. BOD微生物传感检测仪的研究进展[J]. *青岛理工大学学报*, 2015, 36(6): 75-80.
- YANG RB, KONG X, BAO GT, SUN YX, WANG YY, LI J. Research advances in biosensor of biochemical oxygen demand (BOD)[J]. *Journal of Qingdao University of Technology*, 2015, 36(6): 75-80 (in Chinese).
- [39] 廖秀冬. 丁酸梭菌在改善肉鸡肠道健康、抗氧化能力和肉品质等方面的应用[J]. *北方牧业*, 2020(19): 21.
- [40] 陈丽娇, 聂红云, 王磊, 聂麦茜, 第五振军, 张建, 陈婧. 微生物胞外活性氧的产生及其促进有机污染物降解的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2022, 49(1): 323-335.
- CHEN LJ, NIE HY, WANG L, NIE MQ, DIWU ZJ, ZHANG J, CHEN J. Advances in the production of extracellular reactive oxygen species and its promotion on the biodegradation of organic pollutants[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(1): 323-335 (in Chinese).
- [41] 易至, 丁洁琼, 王鸿超, 陆文伟, 赵建新, 陈卫, 张灏. 基于比较基因组学的丁酸梭菌遗传多样性及生物学特性[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(10): 1-7.
- YI Z, DING JQ, WANG HC, LU WW, ZHAO JX, CHEN W, ZHANG H. Genetic diversity and biological characteristics of *Clostridium butyricum* based on comparative genomics[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(10): 1-7 (in Chinese).
- [42] BORREANI G, FERRERO F, NUCERA D, CASALE M, PIANO S, TABACCO E. Dairy farm management practices and the risk of contamination of tank milk from *Clostridium* spp. and *Paenibacillus* spp. spores in silage, total mixed ration, dairy cow feces, and raw milk[J]. *Journal of Dairy Science*, 2019, 102(9): 8273-8289.
- [43] WEI XO, REDDY VS, GAO SP, ZHAI XD, LI ZH, SHI JY, NIU LD, ZHANG D, RAMAKRISHNA S, ZOU XB. Recent advances in electrochemical cell-based biosensors for food analysis: strategies for sensor construction[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2024, 248: 115947.
- [44] HAN YL, LIAO CM, MENG XY, ZHAO Q, YAN XJ, TIAN LL, LIU Y, LI N, WANG X. Switchover of electro-trophic and heterotrophic respirations enables the biomonitoring of low concentration of BOD in oxygen-rich environment[J]. *Water Research*, 2023, 235: 119897.
- [45] SUN YQ, ZHENG YF, WANG XL, ZHOU JJ, XIU ZL. Fermentation performance and mechanism of a novel microbial consortium DUT08 for 1,3-propanediol production from biodiesel-derived crude glycerol under non-strictly anaerobic conditions[J]. *Process Biochemistry*, 2019, 83: 27-34.
- [46] WU PF, WANG GY, WANG GH, BØRRESEN BT, LIU HJ, ZHANG JN. Butanol production under microaerobic conditions with a symbiotic system of *Clostridium acetobutylicum* and *Bacillus cereus*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15: 8.
- [47] ZHAO X, ZHUANG JR, ZHANG FL, LI HT, YU J, WANG CL, LV TJ, LI QZ, ZHANG JM. Effects of compatibility of *Clostridium butyricum* and *Bacillus subtilis* on growth performance, lipid metabolism, antioxidant status and cecal microflora of broilers during the starter phase[J]. *Animal Bioscience*, 2024, 37(11): 1933-1944.
- [48] ZOU QQ, FAN XY, XU YH, WANG TL, LI DS. Effects of dietary supplementation probiotic complex on growth performance, blood parameters, fecal harmful gas, and fecal microbiota in AA+ male broilers[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 1088179.
- [49] 中华人民共和国环境保护部. 水质生化需氧量(BOD)的测定微生物传感器快速测定法: HJ/T86-2002[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- Ministry of environmental protection of the People's Republic of China. Water quality-determination of biochemical oxygen demand (BOD) speedy testing method of microorganism sensor: HJ/T86-2002[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2002 (in Chinese).
- [50] MA YM, DENG DD, ZHAN Y, CAO LB, LIU Y. A systematic study on self-powered microbial fuel cell based BOD biosensors running under different temperatures[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2022, 180: 108372.