Cell-Based Biosensor for Organic Matter

Ampai Kumlanghan

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Doctor of Philosophy in Chemistry

Prince of Songkla University

2008

Copyright of Prince of Songkla University

เลขหมู่ R857.B5A A46 2008 C.1
Bib Key 301807
19 ส.ค. 2552

Thesis Title	Cell-Based Biosensor for Organic Matter
Author	Miss Ampai Kumlanghan
Major Program	Chemistry

Major Advisor

.....
(Assoc. Prof. Dr. Panote Thavarungkul)

Co-advisor

.....
(Assoc. Prof. Dr. Proespichaya Kanatharana)

Examining Committee

.....Chairperson
(Assoc. Prof. Dr. Pakawadee Sutthivaiyakit)

.....Committee
(Assoc. Prof. Dr. Panote Thavarungkul)

.....Committee
(Assoc. Prof. Dr. Proespichaya Kanatharana)

.....Committee
(Asst. Prof. Dr. Lupong Kaewsichan)

The Graduate School, Prince of Songkla University, has approved this thesis as partial fulfillment of the requirements for the Doctor of Philosophy Degree in Chemistry

.....
(Assoc. Prof. Dr. Krerkchai Thongnoo)
Dean of Graduate School

ชื่อวิทยานิพนธ์ เซลล์เบสไบโอเซนเซอร์สำหรับสารอินทรีย์

ผู้เขียน นางสาวอำไพ กำลังหาญ

สาขาวิชา เคมี

ปีการศึกษา 2551

บทคัดย่อ

วิทยานิพนธ์นี้พัฒนาและทดสอบประสิทธิภาพของระบบเซลล์เบสไบโอเซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์สารอินทรีย์ในรูปของค่าบีโอดี ระบบแรกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้วัดค่าบีโอดีของน้ำเสียจากโรงงานน้ำยางข้นที่มีค่าบีโอดีสูง โดยใช้แอมเพอโรเมตริกไบโอเซนเซอร์ที่ใช้จุลินทรีย์หลายสายพันธุ์จากบ่อบำบัดน้ำเสียของโรงงานน้ำยางข้นเป็นวัสดุชีวภาพ และใช้ออกซิเจนอิเล็กโทรดเป็นทรานดิวเซอร์ในระบบไหลผ่าน ระบบเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีประสิทธิภาพดี โดยมีช่วงความเป็นเส้นตรงระหว่าง 2.0 – 25 และ 5.0 – 60 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีขีดจำกัดการตรวจวัดอยู่ที่ 0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์ประมาณ 10 – 15 นาที สามารถทำซ้ำได้โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ที่ 3.9% และสามารถใช้ได้เป็นเวลา 15 วัน (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ที่ 0 - 6.7%) พบว่าเมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน เทคนิคไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีความแตกต่างเพียงร้อยละ 10

ทดสอบกระบวนการบำบัดน้ำเสียด้วยรีแอคเตอร์ไร้อากาศ โดยผ่านตัวอย่างน้ำเสียอย่างต่อเนื่องจากส่วนล่างถึงส่วนบนของรีแอคเตอร์ที่อัตราไหล 10, 20, 40 และ 80 มิลลิลิตรต่อวัน (30 วันต่อแต่ละอัตราการไหล รวมทั้งหมด 120 วัน) ที่อัตราไหล 10 มิลลิลิตรต่อวัน ให้ประสิทธิภาพสูงสุด สามารถลดปริมาณซีโอดีและบีโอดีของน้ำเสียได้ถึง 97% กระบวนการบำบัดน้ำเสียนี้มีประสิทธิภาพดีสำหรับน้ำเสียที่มีค่าบีโอดีสูง เทคนิคบีโอดีไบโอเซนเซอร์นี้สามารถใช้ได้ทั้งกับการตรวจวัดในกระบวนการบำบัดน้ำเสียด้วยรีแอคเตอร์ไร้อากาศแบบออนไลน์ และออฟไลน์

การศึกษาส่วนที่สองเป็นการพัฒนาเทคนิคไบโอเซนเซอร์โดยใช้หลักการของเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์แบบแชมเบอร์เดียว (single-chamber) โดยบรรจุจุลินทรีย์ในส่วนแอโนดซึ่งแยกจากส่วนแคโทดด้วยเมมเบรนแลกเปลี่ยนโปรตรอน (proton exchange membrane-PEM) เซนเซอร์นี้ใช้จุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการอากาศในการหายใจหลายสายพันธุ์ในการวิเคราะห์การย่อยสลายสารอินทรีย์เมื่อจุลินทรีย์เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันทางชีวภาพของสารอินทรีย์จะเกิดการส่งผ่านอิเล็กตรอนไปยังขั้วแอโนดในการวิเคราะห์ แต่ละครั้งจะเปลี่ยนจุลินทรีย์ชุดใหม่ในปริมาณเท่าเดิม

ทุกครั้ง โดยการทดลองนี้ใช้สารละลายมาตรฐานกลูโคสเป็นตัวแทนของสารอินทรีย์ ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของระบบเซนเซอร์เซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์ประกอบด้วย การใช้ตัวต้านทาน 800 โอห์ม เป็นโหลดของวงจรภายนอกและใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ และสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เป็นสารละลายในส่วนแคโทด อุณหภูมิที่เหมาะสมของส่วนแอโนดอยู่ที่ 37 องศาเซลเซียส ช่วงความเป็นเส้นตรงของสัญญาณการตอบสนองของสารละลายกลูโคสมาตรฐานให้ช่วงเส้นตรงจนถึง 25 กรัมต่อลิตร ขีดจำกัดการตรวจวัดอยู่ที่ 0.025 กรัมต่อลิตร มีความเป็นไปได้ที่จะนำเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์ที่พัฒนาขึ้นนี้ไปใช้ในการตรวจวัดสารอินทรีย์แบบออนไลน์

การศึกษาส่วนที่สามเป็นการพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ค่าบีโอดีในน้ำเสียโดยใช้เซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์แบบง่ายซึ่งใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ โดยใช้สะพานเกลือแบบง่ายแทน PEM ที่มีราคาแพง และกราไฟต์ไส้ดินสอเป็นอิเล็กโทรด ใช้สารละลายมาตรฐานกลูโคสเป็นสารอินทรีย์ในการทดสอบระบบ ได้ช่วงความเป็นเส้นตรงระหว่าง 8.0-100 มิลลิกรัมต่อลิตรและขีดจำกัดของการตรวจวัดที่ 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดสอบความสามารถในการทำซ้ำของเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์ โดยใช้สารละลายกลูโคสมาตรฐานพบว่าหลังการวิเคราะห์ 5 ชั่วโมงและทำการวิเคราะห์ 30 ตัวอย่างมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ 14.7% เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์อยู่ที่ 3.0 – 10 นาที ระบบไบโอเซนเซอร์เซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์นี้สามารถใช้วิเคราะห์ค่าบีโอดีของน้ำเสียหลายประเภท สะพานเกลือที่ใช้มีขั้นตอนในการเตรียมง่ายและราคาถูกกว่า PEM มาก อย่างไรก็ตามควรเตรียมสะพานเกลือใหม่ทุกครั้งหรือทุกวัน

Thesis Title	Cell-Based Biosensor for Organic Matter
Author	Miss Ampai Kumlanghan
Major Program	Chemistry
Academic Year	2007

Abstract

This thesis focuses on the development and evaluation of the performance of cell-based biosensor systems for organic matter through the detection of biochemical oxygen demand (BOD). The first development was a sensor system for monitoring an anaerobic process for the treatment of high BOD levels in wastewater samples from a factory processing concentrated rubber latex. The amperometric cell-based biosensor based on flow injection analysis was investigated using mix cultures from activated sludge of a concentrated rubber latex factory as biological sensing element and oxygen electrode as a transducer. The sensor showed wide linear ranges, between 2.0–25 and 5.0–60 mg l^{-1}, and the limit of detection was found to be 0.20 mg l^{-1}. The sensor analysis time was around 10-15 min. The repeatability was observed with relative standard deviation of 3.9% and stability was over a period of 15 days (RSD of 0-6.7%). Good agreement between the results from biosensor method and standard method was obtained with a percentage difference of less than 10%. An anaerobic reactor treatment process was investigated by continuous feeding wastewater sample at flow rates 10, 20, 40 and 80 ml day^{-1} (30 days for each flow rate 120 days in total). At 10 ml day^{-1} the highest efficiency was obtained with percentage of COD and BOD reduction up to 97%. This treatment process showed good efficiency for high strength wastewater. The BOD biosensor was successfully applied to off-line and on-line monitoring of the anaerobic reactor treatment process.

The second study was to develop a biosensor based on a single-chamber microbial fuel cell in which anaerobes were retained in the anode compartment separated from the cathode compartment by a proton exchange membrane. In the sensor a replaceable anaerobic consortium was used for analyzing biodegradable organic matter. The anaerobes acted as biocatalysts in oxidizing

organic matter and transferring electrons to the anode. The biocatalysts were renewed for each sample analysis by replacing the old anaerobic consortium with an equal amount of fresh one. Glucose standard solution was used as the target substrate. To obtain the maximum sensor output, the MFC-based sensor system was optimized using an 800 Ohm resistor as the load to the external electric circuit and 25 mM phosphate buffer with 50 mM NaCl as catholyte in the aerobic compartment. The temperature of anaerobic compartment was maintained at optimal 37 °C. The cell potential across the electrodes increased with increasing loading of glucose. The sensor response was linear against concentration of glucose up to 25 g l^{-1}. The detection limit was found as 0.025 g l^{-1}. The microbial fuel cell with replaceable anaerobic consortium could be used as a biosensor for on-line monitoring of organic matter.

The third project was a simple microbial fuel cell for BOD analysis of wastewater using *Saccharomyces cerevisiae* to degrade the substrates. The MFC used a simple salt bridge to replace a more expensive proton exchange membrane (PEM) and pencil graphite carbon as the electrodes. Glucose standard solution was used as the substrate. The proposed system showed linear range between 8.0-100 mg l^{-1} and the detection limit was at 0.50 mg l^{-1}. The repeatability of the MFC was tested with the standard glucose solution producing a relative standard deviation of 14.7% for 30 samples tested over a period of 5 hours. The sensor response time was around 3.0 – 10 min. This MFC biosensor system can satisfactorily determine the BOD of several types of wastewater. The salt bridge was very simple to prepare and much cheaper than a PEM. However the salt bridge has to be freshly prepared.