

水中亚硝化细菌和硝化细菌检测方法的探讨

陈捷音

(莆田市荔城区环境监测站,福建 莆田 351100)

摘要:介绍了亚硝化细菌和硝化细菌的培养方法,并用 MPN 法计数亚硝化细菌和硝化细菌。对判断培养物中亚硝酸盐和硝酸盐存在的显色反应进行了对比试验。结果表明,在 NO₃⁻ 的显色反应中,可用氨基磺酸铵溶液作为 NO₂⁻ 的抑制剂,并且要先加入二苯胺,再滴加浓硫酸,这样更便于结果观察。指出硝化细菌培养基对于显色反应没有影响,NO₂⁻ 显色的质量浓度为 0.15 mg/L。

关键词:硝酸盐;亚硝酸盐;细菌;氨氮;生物监测

中图分类号: X835 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-2009(2007)03-0049-03

Detecting Method for the Nitrosococcus Bacteria and Nitrifying Bacteria in the Water

CHEN Jie-yin

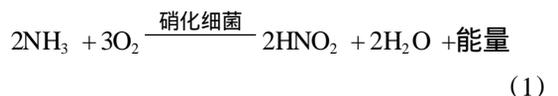
(Environmental Monitoring Station of Licheng District, Putian, Fujian 351100, China)

Abstract: The nitrosococcus bacteria and the nitrifying bacteria culture methods were introduced. The numbers of nitrosation bacteria and the nitrifying bacteria were counted with the MPN. Contrast experiment on the color reactions to judge nitrite and nitrate in the culture medium was performed. The result indicated that take the ammonium sulfamate solution as the inhibitor for NO₂⁻ in the NO₃⁻ color reaction, and adds the diphenylamine first, then the sulfuric acid drop by drop for easy observation. The nitrifying bacteria culture medium dose not affected the color reaction and the mass concentration of NO₂⁻ coloration is 0.15 mg/L.

Key words: Nitrate; Nitrite; Bacteria; Ammonia Nitrogen; Bio-monitoring

硝化细菌包括亚硝化细菌和硝化细菌,存在于土壤、水体等不同的环境中^[1]。水中的氮主要以氨氮、硝酸盐氮、亚硝酸盐氮和有机氮形式存在,在特定条件下,有机氮能被异养微生物转化为氨,在好氧情况下,氨可被硝化细菌氧化成亚硝酸盐氮和硝酸盐氮。自然界中的微生物(主要是亚硝化细菌、硝化细菌和反硝化细菌)使氮元素处于这几种物质的循环中,如果能将亚硝化细菌和硝化细菌同化氨氮的特性加以利用,研究它们对氨氮的去除情况,对于水厂的生产 and 工业废水治理有非常实际的意义。

有机氮化合物在氨化微生物脱氮作用下产生氨,在有氧条件下,经亚硝化细菌和硝化细菌作用转化为硝酸的过程如下:



以上反应式表示氨在亚硝化细菌和硝化细菌的硝化过程是放出能量过程,(1)式由亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)、亚硝酸盐球菌属(*Nitrosococcus*)和亚硝酸盐螺菌属(*Nitrospira*)等起作用,(2)式由硝化杆菌属(*Nitrobacter*)、硝化球菌属(*Nitrococcus*)起作用。

现根据文献[2-3]的培养技术,培养水中硝化细菌和亚硝化细菌,并通过特定的显色反应确定

收稿日期:2007-03-01;修订日期:2007-04-14

作者简介:陈捷音(1976—),女,福建莆田人,工程师,大学,从事环境监测工作。

亚硝化细菌和硝化细菌的存在,然后用 MPN 法^[4]计数。通过对水库原水和水厂沉淀水的检测,表明该方法简便、显色灵敏,适于污水、地表水、饮用水中硝化细菌和亚硝化细菌检测计数。

1 试验

1.1 主要仪器

振荡恒温培养箱、高压蒸汽灭菌器。

1.2 试验材料

1.2.1 亚硝化细菌

1.2.1.1 培养液配制

称取 2.0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.01 g MnSO_4 、0.03 g MgSO_4 、0.2 g CaCl_2 ,用蒸馏水溶解,并定容至 1 L。该培养液在灭菌前用 NaOH 调 pH 值为 7.8,再加入 0.25 g NaH_2PO_4 和 0.7 g K_2HPO_4 (磷酸盐单独灭菌,并且在培养液冷却至室温后加入)。

1.2.1.2 格利斯 (Griess) 试剂

溶液:称取磺胺酸(对氨基苯磺酸, Sulpanilic acid) 0.5 g 溶于 150 mL 的 30% 醋酸溶液中,存于棕色瓶内;

溶液:称取 α -萘胺 (α -naphthylamine) 0.5 g,放入 50 mL 蒸馏水中,煮沸后,缓缓加入 30% 醋酸溶液 150 mL,存于棕色瓶内。

1.2.2 硝化细菌

1.2.2.1 培养液

称取 1.0 g NaNO_2 、0.03 g MgSO_4 、1.0 g NaCO_3 和 0.01 g MnSO_4 ,用蒸馏水溶解,并定容至 1 L。该培养液在灭菌前用 NaOH 调 pH 值为 7.8,再加入 0.25 g NaH_2PO_4 和 0.75 g K_2HPO_4 (磷酸盐单独灭菌,并且在培养液冷却至室温后加入)。

1.2.2.2 二苯胺溶液

称取二苯胺 (Diphenylamine) 1.0 g,溶于 20 mL 蒸馏水中,然后缓缓加入浓硫酸 100 mL,存于棕色瓶中备用。

1.2.2.3 氨基磺酸铵溶液

称取 0.2 g 氨基磺酸铵溶解于 1 L 蒸馏水中,该溶液的质量浓度为 200 mg/L。

1.3 培养液检测

1.3.1 亚硝化细菌培养液和培养液中 NO_2^- 的检测方法

接种含有 3~5 个稀释度的水样各 1 mL,至 10 mL 亚硝化细菌培养液中,每个稀释度的样品接种 3 管或 5 管。将接种后的培养液置于振荡恒温

培养箱中,在温度为 29℃,转速 100 r/min 的情况下,培养 10 d,取出待检。

用无菌吸管吸取培养液 0.2 mL,放在白瓷板凹窝中。加入格利斯试剂、各 2 滴,如果不呈粉红色,表明培养液中不含 NO_2^- ,原接种水样中不含亚硝化细菌;如果呈现粉红色,表明培养液生成了 NO_2^- ,原接种水样中含有亚硝化细菌。可以根据呈现粉红色溶液试管的稀释度及其数量,查 MPN 表,确定亚硝化细菌的数量。

1.3.2 硝化细菌培养液

接种含有 3~5 个稀释度的水样各 1 mL,至 10 mL 的硝化细菌培养液中,每个稀释度的样品接种 3 管或 5 管。将接种后的培养液置于振荡恒温培养箱中培养,在温度为 29℃,转速 100 r/min 的实验条件下,培养 10 d,取出待检。

1.3.2.1 氨基磺酸铵溶液去除培养液中 NO_2^-

吸取 0.2 mL 培养液至试管中,滴加 200 mg/L 的氨基磺酸铵溶液 2 滴,反应 5 min (此时滴加格利斯试剂,若不呈现粉红色,表明亚硝酸盐已被完全去除)。

1.3.2.2 培养液中 NO_3^- 的检查方法

紧接以上试验,反应 5 min 后,再滴加二苯胺溶液 2 滴,接着滴加浓硫酸,反应 5 min~10 min,在试管溶液出现蓝色(不论多少)时,表明培养液中存在硝酸盐,也表明有硝化细菌存在。根据呈现蓝色溶液的试管稀释度及其数量,查 MPN 表,确定硝化细菌的数量。

2 讨论

2.1 培养液中 NO_2^- 干扰的消除

检测培养液中是否有 NO_3^- 存在时,首先要排除培养液中 NO_2^- 的干扰。 NO_2^- 对检测 NO_3^- 有很大干扰,按文献 [5],先加入过量的磺胺酸将 NO_2^- 转化成 N_2 逸去,再加入浓硫酸和二苯胺溶液各 2 滴,如有蓝色出现,表明培养液中有 NO_3^- 积累。在实际操作中,若加入磺胺酸也不能除去 NO_2^- ,应该做以下试验:

先用 10 mg/L 的 NO_2^- 标液试验磺胺酸去除 NO_2^- 的效果,若加入 1 g 磺胺酸,反应 24 h 仍无法去除 NO_2^- ,再用氨基磺酸铵溶液替代磺胺酸作为 NO_2^- 抑制剂:

(1)取 3 支试管,第 1 支加入 1 mL 纯水,第 2、

3 支各加入 10 mg/L 亚硝酸盐标液 1 mL;

(2) 在第 1、2 支试管中, 分别加入过量氨基磺酸铵溶液, 反应 5 min, 再加入磺胺酸和 - 萘胺各 5 滴, 第 3 支试管直接加入磺胺酸和 - 萘胺各 5 滴。结果表明, 第 1、2 支试管不显红色, 第 3 支试管明显呈红色, 表明纯水对实验无干扰, 氨基磺酸铵溶液能够去除 NO_2^- , 可选择氨基磺酸铵溶液作为 NO_2^- 的抑制剂。

2.2 NO_2^- 干扰抑制剂的浓度和加入量

称取 0.15 g NaNO_2 , 溶于 1 L 纯水中, 此溶液 NO_2^- 质量浓度约为 100 mg/L。

取 7 支试管, 首先在各试管中加入 0.1 mL NaNO_2 溶液, 接着从 2~7 支 (第 1 支不加入) 依次加入 200 mg/L 的氨基磺酸铵溶液^[6] 0.1 mL、0.2 mL、0.3 mL、0.4 mL、0.5 mL、0.6 mL, 反应 5 min 后, 再加入格利斯试剂、各 2 滴, 结果显示, 第 1 支为血红色, 其他各管均不显色。试验表明, 加入 200 mg/L 氨基磺酸铵溶液 0.1 mL, 即可完全去除培养液中浓度为 100 mg/L 的 NO_2^- 。

2.3 试剂加入顺序对显色反应的影响

分别取质量浓度约为 5 mg/L KNO_3 溶液 0.2 mL 于 3 支小试管内, 先在第 1 支试管里分别滴加 2 滴浓硫酸和二苯胺溶液, 再向第 2、3 支试管里各加入 0.2 mL 氨基磺酸铵溶液, 接着再向第 2 支试管里加入 5 滴浓硫酸和 2 滴二苯胺溶液, 第 3 支试管里加入二苯胺, 再滴加浓硫酸。

结果显示, 第 1 支试管立刻显蓝色; 第 2 支试管显色缓慢, 且不易观察; 第 3 支试管加入 5 滴浓硫酸时开始显色, 蓝色比第 1 支浅, 但比第 2 支深。试验表明:

(1) 氨基磺酸铵对检测 NO_3^- 的显色反应影响微弱;

(2) 先加二苯胺溶液, 再加浓硫酸便于结果观察。

2.4 硝化细菌培养基所含物质对显色反应的影响

取 0.1 mL 硝化细菌培养基, 加入 200 mg/L 的氨基磺酸铵溶液, 反应 5 min 后, 加入二苯胺 2 滴, 滴加浓硫酸约 5 mL 仍无蓝色出现, 说明硝化细菌培养基所含物质不会干扰显色反应, 或者对显色干扰很小可以忽略。

2.5 NO_2^- 显色的浓度

由于检测 NO_2^- 显色反应的 - 萘胺试剂为浅粉红色, 对观察结果会造成一定干扰, 故需确定培养液中应产生 NO_2^- 的最低浓度 (该浓度应满足易于观察的要求)。

分别取 5 mg/L、2.5 mg/L、1.5 mg/L、1 mg/L、0.5 mg/L、0.25 mg/L、0.15 mg/L、0.1 mg/L 的 NO_2^- 标液 0.2 mL 于白瓷板凹窝中, 另外再取 0.2 mL 纯水作对照。

分别向各凹窝中加入格利斯试剂、各 2 滴, 观察显色反应。结果表明, 在 5 mg/L ~ 0.15 mg/L 中加入了 NO_2^- 标液均显粉红色, 且易于观察, 而加入 0.1 mg/L NO_2^- 标液显色不明显, 说明培养液中产生 0.15 mg/L NO_2^- , 即可用显色反应观察。

3 结论

(1) 在 NO_3^- 的显色反应中, 可用 200 mg/L 氨基磺酸铵溶液作为 NO_2^- 的抑制剂, 加入 0.1 mL 氨基磺酸铵溶液可以完全去除培养液中质量浓度为 100 mg/L 的 NO_2^- ;

(2) 在 NO_3^- 的显色反应中, 先加入二苯胺, 再滴加浓硫酸, 便于结果观察;

(3) 硝化细菌培养基对于显色反应没有影响;

(4) NO_2^- 显色的质量浓度为 0.15 mg/L。

[参考文献]

- [1] 田志梅. BOD_5 测定中硝化和反硝化干扰的判断和消除 [J]. 环境监测管理与技术, 2004, 16(4): 35-37.
- [2] 胡家骏, 周群英. 环境工程微生物学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1994: 156-157.
- [3] KUA IL, VERSTRAETE W. Ammonium removal by the oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification system [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(11): 4500-4506.
- [4] 王家玲. 环境微生物学实验 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1986: 48-51.
- [5] 叶旭全. 原水生物预处理工艺的应用与研究 [M]. 北京: 中国水利水电出版社, 2003.
- [6] 国家环境保护总局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法 [M]. 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.