

饮用水中微生物可利用磷(MAP)的测定方法研究

姜登岭 鲁巍 张晓健

(清华大学环境科学与工程系, 北京 100084)

摘要 研究细化了微生物可利用磷(MAP)的测定方法, 采用配水试验得出不同磷浓度与对应浓度下生长的 P17 菌最大菌落数 $N_{\max}$ 有较好的线性关系。试验测定的 MAP 产率系数为 1.10×10^9 CFU/ $\mu\text{g PO}_4^{3-} - \text{P}$, MAP 测定适用范围为 $0.5 \sim 10 \mu\text{g/L}$ (以 $\text{PO}_4^{3-} - \text{P}$ 计)。经过分析提出 MAP 测定可以用第 3, 4 天的 P17 菌落数最大值代替最大菌落数 $N_{\max}$, 减少了 MAP 测定工作量。对某市给水处理工艺和配水管网中 MAP 占总磷的百分比分析表明, 微生物可利用磷与总磷并没有固定的比例关系。

关键词 微生物可利用磷(MAP) 总磷 生物稳定性 MAP 产率系数 生物检测 P17 菌

Research on examination of microbially available phosphorus in drinking water

Jiang Deng-ling, Lu Wei, Zhang Xiao-jian

(Department of Environmental Science and Engineering,
Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: The determination methods of microbially available phosphorus (MAP) in drinking water are studied and a linear relationship between maximum cell count ($N_{\max}$) of P17 strain and phosphorus concentration are observed in the samples. The yield factor of MAP obtained by experiment is 1.10×10^9 CFU/ $\mu\text{g PO}_4^{3-} - \text{P}$, and it can be used in the range of $0.5 \sim 10.0 \mu\text{g PO}_4^{3-} - \text{P/L}$. By analysis, the $N_{\max}$ can be replaced by the maximum colony of the third and fourth day to save the working time. By investigation on the practical data of MAP percentage to total phosphorus in a city's drinking water treatment process and distribution system, it can be concluded that there is no proper proportion of MAP to the total phosphorus in water.

Keywords: Microbially available phosphorus (MAP); Total phosphorus; Bio-stability; Yield factor of MAP; Bioassay; *Pseudomonads fluorescent* P17 strain

饮用水中有机物, 特别是可同化有机碳(AOC)含量的高低, 被普遍认为是评价饮用水生物稳定性的主要指标。这是因为一般认为碳元素, 即有机物是管网水中微生物生长的最主要限制因子。然而最近几年有研究表明, 如果水中含有较高的有机物(例如在北半球的欧洲中部、北美地区等), 微生物生长

可能受到无机元素磷的限制^[1]。

Miettinen 等对芬兰富含腐殖质天然水源水研究指出, 由于含有较高的有机碳, 饮用水中微生物的生长受到无机元素磷的限制^[2,3]。Sathasivan 等采用 BRP(Bacterial Regrowth Potential)方法分析了东京配水管网采集的 28 个水样, 发现磷对其中一半以上水样具有明显的限制作用^[4]。因此磷有可能成为微生物生长的限制因子, 低浓度的磷可以保证饮用

国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2002AA601140)。

水的生物稳定。目前磷保证饮用水生物稳定性的具体数值还未见报道。但 Miettinen 等对芬兰饮用水研究后指出, 尽管总磷低于 $2 \mu\text{g/L}$, 但已经足够维持微生物大量繁殖^[5]。因此, 低浓度磷的检测对磷的测定方法提出了更高的要求。

目前饮用水较多采用的磷的测定方法普遍存在以下两个问题: 一是测定精度达不到研究饮用水生物稳定性的要求, 例如常用的钼锑抗分光光度法, 最低检出限为 $10 \mu\text{g/L}$ 。本实验室采用 752 型分光光度计 50 mm 光程的比色皿, 最低检出限也只能降低到 $3 \mu\text{g/L}$ 。另外这些测定方法测得的总磷的浓度, 难以区分出哪一部分是可以被微生物利用的磷。在天然水中, 磷几乎以各种磷酸盐的形式存在, 它们分为正磷酸盐、缩和磷酸盐(焦磷酸盐、偏磷酸盐和多磷酸盐)和有机结合的磷酸盐, 它们存在于溶液、腐殖质粒子和水生生物中^[6]。可溶性的磷酸盐能被微生物直接吸收, 而有机结合的磷酸盐和不溶性的磷酸盐不能够被微生物直接利用^[7,8]。因此, 为了考查饮用水中可以被微生物利用的磷, 芬兰学者 Lehtola 提出了水中微生物可利用磷的测定方法^[9]。

微生物可利用磷 (Microbially Available Phosphorus, MAP) 定义为可以被微生物利用的磷。MAP 测定方法是一种生物检测技术, 是在消除其他元素对微生物生长限制的情况下, 以 P17 菌为测试菌, 以磷酸氢盐(Na_2HPO_4)为磷源, 对生长至稳定期的细菌进行平皿计数, 根据不同浓度的磷与该浓度下 P17 菌达到生长稳定期的数量 $N_{\max}$ 做标准曲线, 得到一条有较好线性相关性的直线, 求出 MAP 产率系数。测试水样时, 同样要消除其他元素对微生物生长的限制, 水样接种 P17 菌, 培养至生长稳定期, 得到最大菌落数 $N_{\max}$, 根据 MAP 的产率系数可以计算出水样中微生物可利用磷的浓度。本文目的在于细化 MAP 测定方法; 采用配水试验确定磷与最大菌落数 $N_{\max}$ 的剂量反应关系; 确定 MAP 产率系数和适用范围; 同时简化 MAP 测定过程; 分析微生物可利用磷与总磷的相关关系。为国内开展磷与饮用水生物稳定性的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 器皿处理方法

由于配水试验和实际水样中 MAP 非常低, 试

验所用的器皿(包括水样采集过程)必须经过处理, 以避免试验器皿引入的误差。

所有玻璃器皿(除培养皿)按照如下方法处理: ①在无磷洗涤剂溶液中浸泡 12 h; ②先后用自来水、蒸馏水分别冲洗干净; ③在稀盐酸水溶液(2%)中浸泡 2 h; ④先后用自来水、蒸馏水、超纯水分别洗涤三遍; ⑤在马弗炉中 250°C 烘干 8 h。

试验中使用的塑料制品(如塑料吸头)采用如下方法处理: ①在无磷洗涤剂溶液中浸泡 12 h; ②先后用自来水、蒸馏水分别冲洗干净; ③在稀盐酸水溶液(2%)中浸泡 2 h; ④先后用自来水、蒸馏水、超纯水分别洗涤三遍; ⑤在高压锅中 121°C 灭菌 15 min。

1.2 菌种培养液及无机盐营养液的配制

1.2.1 MAP 菌种培养液

为了减少接种液引入的误差, MAP 菌种培养液采用无磷培养液, MAP 菌种培养液组成见表 1。

表 1 MAP 菌种培养液组成成分

组分	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	KCl	CH_3COONa
浓度/ mg/L	141.9	41.0	3.4	3.4

1.2.2 MAP 无机盐营养液的配制

MAP 测定中, 为了消除其他无机元素对 P17 菌生长的限制, 需要向水样中投加足够量的除磷外的其他无机营养, MAP 无机营养液的组成见表 2。

表 2 MAP 无机营养液的组成成分

组分	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	KCl	NaCl
浓度/ mg/L	1 178	102.5	98	101.9	101.7

1.2.3 乙酸钠溶液

为了消除水样中碳对 P17 菌生长的限制, 需向水样中投加足够的碳营养, MAP 测定中采用乙酸钠作为碳源。配制乙酸钠溶液的浓度为 2 g/L (以乙酸根计, 下同)。

配制以上溶液都需要采用超纯水, 药品用分析纯, 溶液需要在高压锅中 121°C 灭菌 15 min。

1.3 接种液

1.3.1 接种液的准备

试验采用荧光假单胞菌 P17 作为测试菌种。从保存 P17 菌种的斜面上挑取 P17 菌落一环接种至经 $0.2 \mu\text{m}$ 玻璃纤维滤膜过滤、高压蒸汽灭菌的水样中培养 7 d, 以适应低营养条件生长, 并恢复其天然代谢状态。取适量初培养的菌液至 MAP 菌种培养

液中,在 22 ± 2 °C 培养至稳定期,即为试验用菌种。菌种在 $0 \sim 4$ °C 保存,一个月内可以使用。每次使用前使用平板计数法进行活菌计数以确定菌液浓度,并根据菌液浓度计算所需接种的接种液体积^[10]。

1.3.2 接种液体积

MAP 测定中,水样接种浓度为 1 000 CFU/mL,接种液体积按式(1)计算。

$$\text{接种液体积} = \frac{1\,000 \text{ CFU/mL} \times 50 \text{ mL}}{\text{接种液浓度(CFU/mL)}} \quad (1)$$

1.4 标准磷系列溶液的配制

MAP 测定中绘制标准曲线采用的标准磷溶液,由无机盐营养液、乙酸钠溶液和超纯水,然后加入不同量的磷酸氢盐(Na_2HPO_4)得到。用 50 mL 经过处理的具塞磨口三角瓶,取 3 mL 无机盐营养液,50 μL 2 g/L 的乙酸钠溶液和 47 mL 超纯水混合,再加入不同量的磷酸氢盐就得到了标准磷系列溶液。此时混合溶液中含有 15 mg/L 的 N, 0.6 mg/L 的 Mg, 1.6 mg/L 的 Ca, 3.2 mg/L 的 K, 2.4 mg/L 的 Na, 9.4 mg/L 的 Cl, 2 000 $\mu\text{g/L}$ 的乙酸碳。本试验中试验配水的磷浓度为 0, 0.05, 0.08, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 3, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g/L}$ (以 $\text{PO}_4^{3-} - \text{P}$ 计,下同)。

1.5 培养与菌落计数

1.5.1 培养

将配制好的标准磷系列溶液放入 60 °C 的水浴 35 min 进行巴氏灭菌,以杀死芽孢细菌和原生动物。冷却后,按照式(1)计算的接种液体积接种,然后在 15 °C 生化培养箱中黑暗培养^[9]。

1.5.2 菌落计数

自培养的第 2 天至第 8 天,每天从 50 mL 培养瓶中取 100 μL 混匀的培养液,用缓冲溶液稀释 10^3 或 10^4 倍,取 100 μL 进行平板涂布,置于 22 ± 2 °C 生化培养箱中培养,培养 2 天后进行计数。采用 R2A 培养基^[11]菌落计数。

1.6 水样的 MAP 测定

1.6.1 水样的采集

水样收集于预先处理好的 250 mL 磨口玻璃瓶中,如果水样中含有余氯,加入适量硫代硫酸钠(按照摩尔比,硫代硫酸钠:余氯 = 1.2:1)以中和水中的余氯。水样应该在 24 h 内进行 MAP 测定。

1.6.2 水样的处理

水样 MAP 测定时,同样需要在待测水样中加入足够的碳和其他无机营养以消除碳和其他无机元素对微生物生长的限制。在 50 mL 水样中加入 50 μL 无机营养液和 50 μL 2 g/L 的乙酸钠溶液,使得加入的营养为 250 $\mu\text{g/L}$ 的 N, 53 $\mu\text{g/L}$ 的 K, 10 $\mu\text{g/L}$ 的 Mg, 27 $\mu\text{g/L}$ 的 Ca, 40 $\mu\text{g/L}$ 的 Na, 157 $\mu\text{g/L}$ 的 Cl, 2 000 $\mu\text{g/L}$ 的乙酸碳。

1.6.3 水样的培养和菌落计数

待测水样的培养和菌落计数与标准磷系列溶液的培养及菌落计数采用相同的方法。

2 结果与讨论

2.1 生长曲线

不同浓度标准磷溶液 P17 菌的生长曲线见图 1 和图 2。一般培养 3~5 d P17 菌就可以达到生长稳定期。同时,对于不同浓度标准磷溶液,磷浓度越高, P17 菌达到生长稳定期的时间相对要比低浓度磷要长。对于磷浓度为 $0 \sim 1$ $\mu\text{g/L}$, 一般 2~4 d 就可以达到生长稳定期,而对于磷浓度为 $3 \sim 40$ $\mu\text{g/L}$, 一般 3~6 d 才可以达到生长稳定期。

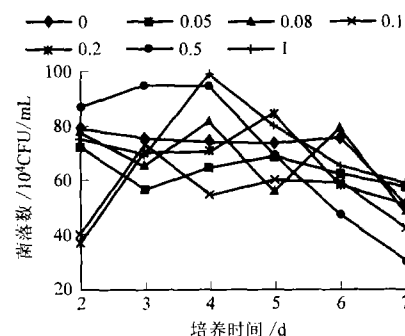


图 1 $0 \sim 1$ $\mu\text{g/L}$ 标准磷溶液 P17 菌的生长曲线

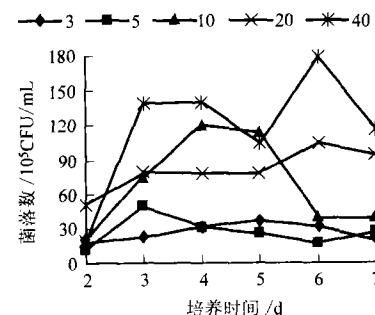


图 2 $3 \sim 40$ $\mu\text{g/L}$ 标准磷溶液 P17 菌的生长曲线

另外,从 P17 菌的生长曲线还可以看出,生长曲线不是十分规则,有波动,尤其对于低浓度磷溶液,

更容易产生波动。这可能与磷的浓度过低有关。

2.2 MAP 产率系数

磷浓度与对应浓度下最大菌落数 $N_{\max}$ 的剂量反映关系(见图 3)为线性关系较好的直线, 相关系数 $R^2=0.983$ 。随着磷的浓度的增加, 对应浓度下最大菌落数 $N_{\max}$ 成比例增加。

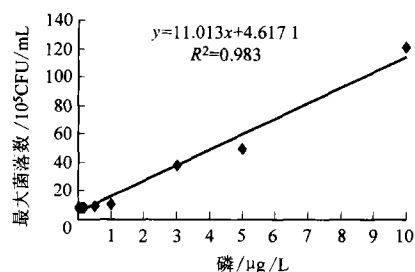


图 3 磷浓度与对应浓度下最大菌落数 $N_{\max}$ 的剂量反映关系

试验中空白水样的最大菌落数为 7.9×10^5 CFU/mL, 比拟合直线得出来的空白值 4.6×10^5 CFU/mL 高, 这是因为试验条件导致的误差。Lehtola 提供的空白水样的最大菌落数为 4.7×10^4 CFU/mL^[9]。本试验得到的试验空白值比 Lehtola 提供的空白值, 高出一个数量级, 这是实验室之间的差异。

根据拟合的直线可以计算出 MAP 的产率系数为 1.1×10^9 CFU/ $\mu\text{g PO}_4^{3-} - \text{P}$ 。这同样比 Lehtola 提供的产率系数 3.73×10^8 CFU/ $\mu\text{g PO}_4^{3-} - \text{P}$ 要高^[9]。产率系数之间的差异, 要求不同的实验室, 测定相同的项目, 应该测定各自实验室的产率系数。本实验室进行 AOC 测定的 P17 菌产率系数为 1.7×10^7 CFU/ μg 乙酸碳。MAP 的产率系数是 AOC 产率系数的 65 倍, 所以 MAP 是更加灵敏的生物检测技术。

从试验数据可以看出, 当磷的浓度 $< 0.5 \mu\text{g/L}$ 时, 实测最大菌落数与拟合数据误差较大, 这是因为在非常低磷浓度下, 任何操作都有可能引入较大误差, 例如试验器皿的洗涤。由于试验条件所致, 本实验室 MAP 最低检出限为 $0.5 \mu\text{g/L}$, 与 Lehtola 提供的最低检出限 $0.08 \mu\text{g/L}$ 差距较大^[9]。当磷的浓度 $> 10 \mu\text{g/L}$ 时, 磷的浓度与最大菌落数的线性关系较差, 因此本实验室的 MAP 最高检出限定为 $10 \mu\text{g/L}$, 和 Lehtola 得出的结论相同。

为了考查经过 7 天培养磷的消耗情况, 试验中

采用钼锑抗分光光度法^[6]测定培养后标准磷溶液中的磷浓度, 试验结果为 $0 \sim 10 \mu\text{g/L}$ 的标准磷液培养后磷浓度低于检出限 $3 \mu\text{g/L}$, 而 $20 \mu\text{g/L}$ 和 $40 \mu\text{g/L}$ 的标准磷液培养后磷有少量剩余。这也说明了为什么当磷浓度 $> 10 \mu\text{g/L}$ 时, 磷的浓度与最大菌落数的线性关系较差。

2.3 MAP 测定的改进

按照 Lehtola 的 MAP 测定方法, 在第 3 至 8 天连续对水样进行平皿菌落计数, 工作量相当大。从上述不同浓度的标准磷溶液的 P17 菌生长曲线可以看出, 一般培养 $3 \sim 5 \text{ d}$ 就可以达到最大菌落数 $N_{\max}$ 。如果以标准磷溶液培养第 3, 4, 5 天的 P17 菌落数作为最大菌落数 $N_{\max}$, 造成的误差见图 4。可以看出, 采用任何一天的数据代替最大菌落数 $N_{\max}$, 都会造成相当大的误差, 不能够满足测定要求。

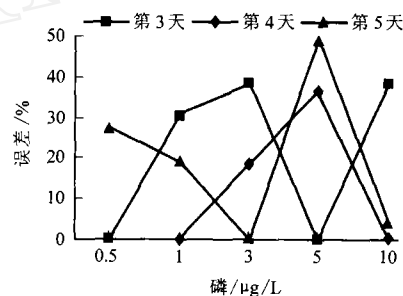


图 4 以标准磷溶液培养第 3, 4, 5 天的 P17 菌落数代替最大菌落数 $N_{\max}$ 造成的误差

$$\left(\text{误差}_i = \left| \frac{N_i - N_{\max}}{N_{\max}} \right|, i = 3, 4, 5 \text{ d} \right)$$

如果采用以标准磷溶液培养第 3, 4 天的 P17 菌落数的最大值来代替最大菌落数, 造成的误差见图 5。从图中可以看出, 仅当磷的浓度为 $3 \mu\text{g/L}$ 时, 造成的误差为 19%, 其他磷浓度下没有误差。在生物检测技术里 19% 的误差是可以接受的。因此, 为了减少水样 MAP 测定的工作量, 可以只对水样培养第 3, 4 天进行菌落计数, 取 2 天的 P17 菌落数的最大值作为最大菌落数 $N_{\max}$ 。

2.4 水样的 MAP 与总磷(TP)

表 3 为某市给水厂水处理工艺和配水管网中 MAP 和总磷(TP)的数据。该厂采用传统水处理工艺, 混凝工艺前加氯除藻。从表 3 可以看出, MAP 占 TP 比例变化很大。原水 MAP 占总磷比例较高,

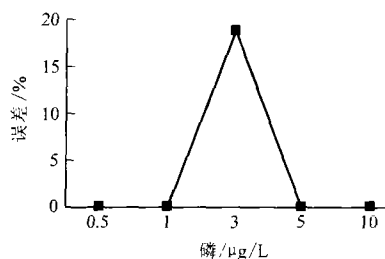


图5 以标准磷溶液培养第3,4天的P17菌落数最大值代替最大菌落数 N_{max} 造成的误差

$$\left(\text{误差} = \left| \frac{N'_{max} - N_{max}}{N_{max}} \right|, N'_{max} = \max(N_3, N_4) \right)$$

为76%；管网水中MAP占总磷比例较低，低于30%。从数据可以看出，微生物可利用磷与总磷并没有固定的比例关系，水样中总磷含量高并不能够代表微生物可利用磷含量就高。因此，研究磷与饮用水生物稳定性的关系问题，建立微生物可利用磷的测定方法是非常必要的。

表3 MAP占总磷的比例

取样点	TP*/μg/L	MAP/μg/L	MAP/TP/%
原水	28.1	21.2 [◇]	76
预氯混凝水	28.6	7.6	27
沉淀水	27.5	6.5	23
管网点1# [△]	13.9	3.4	24
管网点2# [△]	18.5	3.3	18
管网点3# [△]	16.5	1.7	10

注：*采用钼锑抗分光光度法测定；[◇]超出MAP测定范围，采用产率系数计算；[△]管网点1#，2#，3#位于同一条配水干管，分别距给水厂5 km，7 km，10 km。

3 结论

经过试验研究可以得出以下结论：

(1)磷浓度与对应浓度下最大菌落数 N_{max} 有较好的线性关系。

(2)MAP测定的产率系数为 1.10×10^9 CFU/ $\mu\text{g PO}_4^{3-} - \text{P}$ ，MAP测定适用范围为0.5~10 $\mu\text{g/L}$ 。

(3)MAP测定过程中，采用培养第3,4天的P17菌落数最大值作为最大菌落数 N_{max} ，能够满足MAP测定要求。

(4)微生物可利用磷与总磷并没有固定的比例关系。

参考文献

- 1 Markku J Lehtola, Miettinen I T, Vartiainen T, et al. Changes in content of microbially available phosphorus, assimilable organic

carbon and microbial growth potential during drinking water treatment processes. Wat Res, 2002, 36: 3681~3690

- 2 Markku J Lehtola, Miettinen Ilkka T, Terttu Vartiainen, et al. Microbially available organic carbon, phosphorus, and microbial growth in ozonated drinking water. Wat Res, 2001, 35(7): 1635~1640
- 3 Ilkka T Miettinen, Terttu Vartiainen, Pertti J Martikainen. Detementation of assimilable organic carbon in humus-rich drinking water. Wat Res, 1999, 33(10): 2277~2282
- 4 Sathasivan A, Ohgaki S, Yamamoto K, et al. Role of inorganic phosphorus in controlling regrowth in water distribution system. Wat Sci Tech, 1997, 35(8): 37~44
- 5 Miettinen I T, Vartiainen T, P J Martikainen. Phosphorus and bacterial growth in drinking water. Appl Environ Microbiol, 1997, 63(8): 3242~3245
- 6 国家环保局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法. 北京:中国环境科学出版社,1990
- 7 顾夏声,李献文,竺建荣. 水处理微生物学. 第三版. 北京:中国建筑工业出版社,1998
- 8 周群英,高廷耀. 环境工程微生物学. 第二版. 北京:高等教育出版社,2000
- 9 Markku J Lehtola, Miettinen I T, Vartiainen T, et al. A new sensitive bioassay for determination of microbially available phosphorus in water. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(5): 2032~2034
- 10 王占生,刘文君. 微污染水源饮用水处理. 北京:中国建筑工业出版社,1999
- 11 Reasoner D J, Geldreich E E. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. Appl Environ Microbiol, 1985, 49(1): 1~7

○电话:(010)62782196

E-mail: jdl01@mails.tsinghua.edu.cn

修回日期:2004-2-18

低成本高效率的臭氧净水试验

日本横滨市小雀净水厂采用臭氧进行深度净水试验,试验结果证明,中规模以下的净水厂,普及高效臭氧处理系统是适宜的。试验所得结果如下:

- (1)验证了臭氧单独处理与臭氧-生物法联合处理的水质改善效果;
- (2)确认了臭氧处理副产物(醛和溴酸钠)的抑制与去除技术;
- (3)确立了臭氧处理法的水质适用范围;
- (4)验证了深度氧化法(AOP)的效果;
- (5)掌握了处理过程中的水力特性并进行了混合反应分析。

(王国生摘译自2004年1月26日《水道产业新闻》)