

文章编号:1000-4092(2019)03-456-03

细菌瓶法用于反硝化菌菌量的测定*

易绍金,邢燕青,余 灿

(长江大学化学与环境工程学院,湖北 荆州 434023)

摘要:在微生物采油(MEOR)研究、菌液产品质量检测、现场试验监控及环保领域,采用费时费事的最大概率数法(MPN法)测定反硝化菌(DNB)菌量。为了更简便准确的测定DNB的菌量,推荐使用含碳源、氮源、磷源及化学脱氧剂等培养液的DNB专用测试瓶。结果表明,将欲测水样注入测试瓶逐级稀释,并在30℃培养5 d后,培养液变浑浊并出现气泡表示有DNB菌生长。DNB的计数按常规细菌瓶法进行。用该细菌瓶法测定了某油田采出液、生物抑菌剂及微生物清防蜡菌剂中DNB菌数,所得结果与MPN法基本相同。与传统的MPN法相比,细菌瓶法具有生长指示明显、操作简单和工作效率高等优点。表4参17

关键词:反硝化菌(DNB);菌量;细菌瓶法;最大概率数法;微生物采油

中图分类号:TE357:Q93-332 **文献标识码:**A **DOI:** 10.19346/j.cnki.1000-4092.2019.03.014

反硝化菌(denitrifying bacteria,简称DNB)是一群能在厌氧条件下将硝酸盐还原成亚硝酸盐进而还原成氮气的一类细菌的总称^[1-4]。DNB是重要的微生物采油功能菌^[5],也是抑制硫酸盐还原菌的重要菌群^[6-9],还是污水生物脱氮的主要菌群^[10-11]。因此,在微生物采油、反硝化菌抑制硫酸盐还原菌科学研究、菌剂产品质量检验和油田现场监控及污水生物脱氮处理等工作过程中,常常需要测定DNB的数量(浓度)。

目前,测定DNB菌量的主要方法是最大概率数法(MPN法)。但是,这种方法存在比较明显的缺陷。首先,该法操作包括清洁玻璃器皿、培养基的配制与灭菌、分装等一系列过程极为繁琐、费时;其次,该法在测定DNB时要求在厌氧条件下操作,而实际过程中易混入氧气,对操作条件要求较严。因此,工作效率极低的DNB菌量测定方法已经远远不能满足现代高效工作的需要,研制更加简单准确的DNB菌量测定的新方法和新工具迫在眉睫。

孙炳德^[12]将细菌测试瓶法用于硫酸盐还原菌(SRB)菌量的测定,认为细菌瓶测试法在菌量测定中既简单准确,又方便快捷。易绍金等^[13-15]将细菌瓶测试法用于石油烃降解菌、产表面活性剂菌、黄原胶降解菌等相关细菌菌量测定中,进一步发展并完善了细菌瓶测试法在相关细菌菌量测定中的应用。细菌瓶内装有SRB等细菌的专用培养基,只能用于测定SRB等细菌,而不能用于测定DNB。为了更简便准确的测定DNB的菌量,根据细菌瓶法的基本原理,研制了用于培养DNB的专用测试瓶。在进行了样品的多次实际测试和不断改良后,现已形成成熟的反硝化菌测试瓶(DNB-JH型)产品。

1 实验部分

1.1 材料与仪器

油田产出液,江汉油田;生物抑制菌液、微生物清防蜡菌剂,湖北三雄科技发展有限公司。STARTER 3100 pH计,奥豪斯仪器设备有限公司;SPX-

* 收稿日期:2018-09-27;修回日期:2018-12-21。

基金项目:国家自然科学基金“油藏条件下微生物与原油的相互作用研究”(项目编号51474034)。

作者简介:易绍金(1963-),男,教授,1984年毕业于同济医科大学环境微生物专业,从事石油与环境微生物学和油气田环境保护教学与科研工作,通讯地址:434023 湖北荆州长江大学化学与环境工程学院,E-mail:759531738@qq.com。

300BS-Ⅱ生化培养箱,上海新苗医疗器械制造有限公司;AX2202ZH/E电子天平,奥豪斯仪器(常州)有限公司;YM型不锈钢立式电热蒸汽消毒器,上海三申医疗器械有限公司;1.0 mL一次性无菌注射器等。

1.2 DNB 测试瓶的制备

(1)DNB 培养液的配制

比较不同配方培养液培养 DNB 的速度优选培养液配方。反复筛选得到了以有机酸盐为碳源,含有硝酸盐、磷源和化学脱氧剂等组分的专门用于培养 DNB 的培养液配方及其合适的 pH 值。该配方按照 DNB 的生理生化特征所设计,培养出的细菌只是在厌氧条件下将硝酸盐还原成亚硝酸盐进而还原成氮气的 DNB,测试工作不受其他细菌的干扰。

(2)生长指示

为了及时准确地反映培养液中有无 DNB 的生长,必须确定易于观察的生长指示。要求生长指示特异性强,易于判断。根据 DNB 代谢特点和代谢产物确定其生长指示。DNB 的生命活动会使培养液产生浑浊,新陈代谢会产生 N₂,即培养液变浑变浊并出现肉眼可见的气泡为 DNB 的生长指示。

(3)测试瓶制备与灭菌

将配制好的培养液厌氧分装入标准玻璃瓶(15 mL)中,每瓶装 9.0 mL 培养液,然后用橡胶盖和铝盖封口,再按常规灭菌,即为 DNB 测试瓶。

1.3 测试方法

具体测定方法按细菌瓶常规测定方法进行^[13-15]。把接种后的测试瓶放在 30℃培养箱内培养,无菌生长的测试瓶内培养液无明显变化,而有菌生长的测试瓶内培养液逐渐变浑变浊并出现肉眼可见的气泡(N₂),一般此过程为 3~5 d,因此确定 5 d 读数(即样品注入测试瓶后培养 5 d 后的读数)。

1.4 计数

DNB 的测定一般采用二次平行管测定方法^[16-17],可根据表 1 进行计数。实际样品测定时需乘以稀释倍数。

2 结果与讨论

为了验证细菌瓶法测定的准确性和可靠性,采用工业化生产的 DNB-JH 型测试瓶对多个油田产出液、生物抑制菌液、微生物清防蜡菌剂等样品中的 DNB 数量进行了测定,并与 MPN 法测定结果进行

对比,选择具有代表性的 3 个测定结果分别列于表 2、表 3 和表 4。

表 1 二次平行管的细菌最大可能值

生长指数	菌数/ (个·mL ⁻¹)	生长指数	菌数/ (个·mL ⁻¹)	生长指数	菌数/ (个·mL ⁻¹)
001	0.5	110	1.3	210	6.0
010	0.5	111	2.0	211	13.0
011	0.9	120	2.0	212	20.0
020	0.9	121	3.0	220	25.0
100	0.6	200	2.5	221	70.0
101	1.2	201	5.0	222	110.0

表 2 某油田采出液中 DNB 测定结果(二次平行)

测定方法	不同稀释程度下有无细菌生长*						生长指数	菌数/ (个·mL ⁻¹)
	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		
细菌瓶法	+	+	+	+	—	—	210	6.0×10 ²
	+	+	+	—	—	—		
MPN 法	+	+	+	—	—	—	210	6.0×10 ²
	+	+	+	+	—	—		

*“+”表示有细菌生长;“—”表示无细菌生长,下同。

表 3 某生物抑菌剂中 DNB 测定结果(二次平行)

测定方法	不同稀释程度下有无细菌生长										生长指数	菌数/ (个·mL ⁻¹)
	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹		
细菌瓶法	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	210	6.0×10 ⁷
	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—		
MPN 法	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	201	5.0×10 ⁷
	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+		

表 4 某微生物清防蜡剂中 DNB 测定结果(二次平行)

测定方法	不同稀释程度下有无细菌生长										生长指数	菌数/ (个·mL ⁻¹)
	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸			
细菌瓶法	+	+	+	+	+	+	—	—	—		211	1.3×10 ⁴
	+	+	+	+	—	—	—	—	—			
MPN 法	+	+	+	+	+	+	—	—	—		211	1.3×10 ⁴
	+	+	+	+	—	—	—	—	—			

由表 2~4 可见,细菌瓶法的测定结果与 MPN 法基本相同,表明其测试结果准确可靠。而在表 3 中,可能是由于氧气的混入导致 MPN 法所测得的 DNB 菌数较细菌瓶法的低,因此,细菌瓶法的测定结果更为准确。常见的平板菌落计数法不适用于

厌氧细菌菌量的测定。在测定厌氧细菌的菌量时,MPN法在实际操作过程中容易混入氧气,导致测定结果不准确。而DNB细菌瓶法由于在培养液中加入了化学脱氧剂并采取了隔氧保护措施,因此在用于DNB菌量的测定过程中,所培养出的细菌只是在厌氧条件下将硝酸盐还原成亚硝酸盐进而还原成 N_2 的DNB,测试工作中不会受氧气和其他细菌的干扰。在判断测试瓶内有无DNB生长时,有DNB存在的测试瓶内的培养液逐渐变浑变浊并出现肉眼可见的气泡(N_2),生长指示易于观察,测定结果更为准确可靠。

3 结论

细菌瓶法可准确测定样品中的反硝化菌的菌量,可用于微生物采油研究、采油菌液产品质量检验(菌量测定)和微生物采油现场监控等。与传统的MPN法相比,细菌瓶法具有生长指示明显、操作简便和工作效率高等优点,应用前景良好。

参考文献:

- [1] 王薇,蔡祖聪,钟文辉,等.好氧反硝化菌的研究进展[J].应用生态学报,2007,18(11):2618-2625.
- [2] 黄孝肖,陈重军,张蕊,等.厌氧氨氧化与反硝化耦合反应研究进展[J].应用生态学报,2012,23(3):849-856.
- [3] 苏婉昀,高俊发,赵红梅.异养硝化-好氧反硝化菌的研究进展[J].工业水处理,2013,33(12):1-5.
- [4] 郭焱,张召基,陈少华.好氧反硝化微生物学机理与应用研究进展[J].微生物学通报,2016,43(11):2480-2487.
- [5] 刘芝芳,易绍金.DNB-SRB-MEOR技术的研究与应用进展[J].长江大学学报(自然科学版),2011,8(3):67-69.
- [6] 董慧明,张颖,王沈海,等.反硝化细菌对硫酸盐还原菌的竞争抑制研究[J].环境工程学报,2008,2(1):130-134.
- [7] 魏利,王艳君,马放,等.反硝化抑制硫酸盐还原菌活性机理及应用[J].哈尔滨工业大学学报,2009,41(4):85-88.
- [8] 谭燕,程杰成,屈睿,等.油田采出液中硝酸盐还原菌的分离培养及对硫酸盐还原的抑制[J].应用与环境生物学报,2007,13(3):390-394.
- [9] 庄文,段继周,邵宏波,等.油田采出液中硝酸盐还原菌的分离培养及对硫酸盐还原菌的抑制研究[J].科学技术与工程,2010,10(17):4125-4130.
- [10] MORRASM, DOSTA J, GARCIAHERASJ L. Aerobic/anoxic post-treatment of anaerobically digested sewage sludge as an alternative to biological nitrogen removal from reject water[J]. Bioprocess Biosyst Eng, 2015, 38(5): 823-831.
- [11] GAO Yongqing, PENG Yongzhen, ZHANG Jinyu, et al. Biological sludge reduction and enhanced nutrient removal in a pilot-scale system with 2-steps ludge alkaline fermentation and A_2O process[J]. Bioresour Technol, 2011, 102(5): 4091-4097.
- [12] 孙炳德.油田注入水细菌分析与杀菌剂评价[J].石油钻采工艺,1989(5):79-87.
- [13] 易绍金.细菌瓶法用于石油烃降解菌菌数测定[J].油田化学,2001,18(4):372-374.
- [14] 易绍金,邓勇.细菌瓶法用于产表面活性剂菌数测定[J].油田化学,2005,22(3):262-264.
- [15] 易绍金,熊汉辉.细菌瓶法用于黄原胶降解菌菌数测定[J].油田化学,2005,22(2):192-194.
- [16] 易绍金,余跃惠.石油与环境工程微生物技术[M].武汉:中国地质大学出版社,2002:168-169.
- [17] 国家能源局.碎屑岩油藏注水水质推荐指标及分析方法:SY/T 5329—2012[S].北京:石油工业出版社,2012:7-9.

Determination of Denitrifying Bacteria Using Bacterial Bottle Method

YI Shaojin, XING Yanqing, YU Can

(College of Chemistry and Environmental Engineering, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434023, P R of China)

Abstract: In the field of microbial enhanced oil recovery (MEOR) research, bacterial liquid product quality testing, field test monitoring and environmental protection, the amount of denitrifying bacteria (DNB) was determined by the time-consuming most probable number method (MPN method). In order to measure the amount of DNB bacteria more easily and accurately, it was recommended to use a DNB-specific test bottle containing carbon source, nitrogen source, phosphorus source and chemical deoxidizer. The results showed that the water sample was infused into the test bottle and was diluted step by step, the culture solution became cloudy and bubbles appeared after culturing for 5 days at 30°C , indicating the growth of DNB bacteria. The DNB count was performed according to the conventional bacterial bottle method. The amounts of DNB bacteria in an oilfield production fluid, biological bacteriostatic agent and microbial anti-wax agent were determined by the bacterial bottle method, and the results were basically the same as those of the MPN method. Compared with the traditional MPN method, the bacterial bottle method had the advantages of obvious growth indication, simple operation and high work efficiency.

Keywords: denitrifying bacteria (DNB); bacterial amount; bacterial bottle method; probable number method; microbial enhanced oil recovery