

微生物杀灭效果试验中的游离氯转化研究

刘静, 陈超*, 张晓健, 张车琼

(清华大学环境科学与工程系, 北京 100084)

摘要: 在实验室研究游离氯灭活微生物的试验中发现, 由于试验体系中有有机氮的存在, 投加游离氯消毒后, 游离氯会迅速与之反应转化为无消毒作用的有机氯胺. 在对大肠杆菌、铁细菌、铜绿假单胞菌的研究中均发现同样的问题, 投加 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的游离氯消毒剂对初始菌浓度为 $10^8 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的大肠杆菌进行灭活试验, 反应 5 min 后游离氯就已经为 0, 而一氯胺和二氯胺的量分别为 $0.92 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. 为了降低有机氮的干扰, 采用多次离心纯化菌液、膜过滤纯化菌液和增加受试菌液的稀释倍数的方法进行测试, 发现当菌液浓度降至 $10^5 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以下时, 游离氯转氯胺的比例可以明显降低; 而 2 种纯化过程并不能分离菌液中的有机氮, 进而改善试验中出现的游离氯转氯胺的现象. 该结论也说明参加反应的有机氮应来源于细菌自身的细胞物质, 有机氮的干扰在消毒的相关研究中需要引起关注.

关键词: 消毒; 游离氯; 大肠杆菌; 有机氯胺

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)11-3054-05

Reaction of Free Chlorine Transforms into Chloramines in Microorganism Inactivation Experiment

LIU Jing, CHEN Chao, ZHANG Xiao-jian, ZHANG Che-qiong

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

Abstract: Due to organic N existing in the pure bacterial cultures, when using free chlorine to inactivate microorganisms, free chlorine transforms into organic N-chloramines which are no use in disinfection process. This reaction happens in *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* inactivation experiments. Added $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ free chlorine to inactivate *E. coli* of $10^8 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$, free chlorine exhausts in 5 min while chloramines and dichloramines become $0.92 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. *E. coli* is used as test microorganism in following inactivation experiments. *E. coli* suspension is purified by centrifugal and membrane filtration, but the purification can't help to separate the organic N from *E. coli* suspension, which indicating that the source of organic N may be from bacterium cells. Dilution is worked when *E. coli* concentrations are diluted under 10^5 CFU/mL . This result should be regarded in related researches in future.

Key words: disinfection; free Chlorine; *E. coli*; organic N-chloramines

消毒是饮用水处理最为重要的一个环节, 灭活水中的病原微生物, 防止疫病流传. 一般认为饮用水的微生物风险对人体的危害更大, 因为微生物风险是急性的, 其中一些微生物如病毒、贾第虫、隐孢子虫等即使在水中含量很少, 只要有单个个体进入人体就会使人感染患病.

因此有很多研究是评价某种消毒剂对各种微生物灭活效果的, 这种评价有 2 方面的意义: 一是比较不同消毒剂的消毒效果; 二是比较不同微生物的耐消毒剂能力. 研究使用最多的是消毒剂杀灭微生物试验, 该试验可以用于消毒剂鉴定和日常监测, 用来评价各种用途的消毒剂对微生物的杀灭效果, 是对消毒剂的杀菌能力进行的重要验证.

游离氯是使用最为广泛、最为传统的消毒方式, 采用游离氯做消毒剂进行微生物杀灭试验在研究中也最为常见. 在通常的研究中, 重点在于灭活效果的研究, 而忽略了余氯的监测, 一般仅以投加的初始有效氯浓度计. 本研究在游离氯灭活微生物的试验中

发现, 由于有机氮的存在, 投加游离氯消毒后, 游离氯会迅速转为一氯胺和二氯胺. 在对大肠杆菌、铁细菌、铜绿假单胞菌的研究中均发现同样的问题.

本研究分析了在游离氯灭活微生物过程中的游离氯转化现象, 并对产生该现象的原因以及可能的解决办法进行了试验.

1 材料与方法

1.1 消毒剂和菌液制备

游离氯消毒剂采用次氯酸钠溶液 ($> 5\%$) 配制, 采用 *N, N*-二乙基对苯二胺-硫酸亚铁铵滴定法 (DPD-FAS) 测定其浓度.

试验主要使用的指示微生物是大肠埃希氏杆菌 (CGMCC1.3373), 铜绿假单胞菌 (ATCC15442) 和枯草

收稿日期: 2007-12-12; 修订日期: 2008-05-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (50708050); 国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (2006AA06Z301)

作者简介: 刘静 (1981 ~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为饮用水消毒处理理论与技术, E-mail: liujing99@mails.tsinghua.edu.cn
* 通讯联系人, E-mail: chen_water@tsinghua.edu.cn

芽孢(ATCC6633).菌液污染水样的制备根据《消毒技术规范》(2002 年版)^[1].大肠杆菌和铜绿假单胞菌试验时从营养琼脂斜面上挑取培养物接种于营养肉汤中,在 37℃ 恒温振荡培养箱中培养 24 h,制成细菌悬液,悬液经3 000 r/min 离心 10 min,取沉淀于灭菌过的 pH=7.2 的磷酸盐缓冲液中,制成污染水样,然后稀释至所需使用的菌液浓度.枯草芽孢杆菌在营养琼脂斜面培养基上 37℃ 恒温培养 5~7 d 得到芽孢,芽孢悬液的制备方法参考文献[1].

大肠杆菌的检测采用滤膜法,铜绿假单胞菌和枯草芽孢采用活菌平板计数法检测.

1.2 试验方法

在制备好的含一定浓度指示微生物的污染水样中加入不同浓度的消毒剂,作用不同时间后,取 100 mL 水样用 DPD-FAS 法滴定余氯浓度,另取 10 mL 样品,加入 100 μL 无菌中和剂(0.01 mol·L⁻¹ 的

Na₂S₂O₃)终止,用于存活微生物浓度的检测.

2 结果与分析

2.1 微生物杀灭试验中的游离氯转氨

本研究对大肠杆菌和铜绿假单胞菌进行了游离氯消毒灭活试验,余氯变化的规律如图 1 和图 2 所示.由图 1 可以看出投加游离氯消毒剂后,游离氯就迅速衰减,转化成了一氯胺和二氯胺,5~20 min 后游离氯衰减为 0,一氯胺、二氯胺和总氯的生成逐渐稳定,因此以初始有效氯计的消毒剂浓度已经不能反应消毒剂的真实情况了.反应消耗的时间与大肠杆菌的初始浓度有关,初始菌浓度越高余氯消耗越快.

图 2 对铜绿假单胞菌的试验也反映出类似的问题,说明在微生物杀灭试验中,余氯转化问题有一定的普遍性.

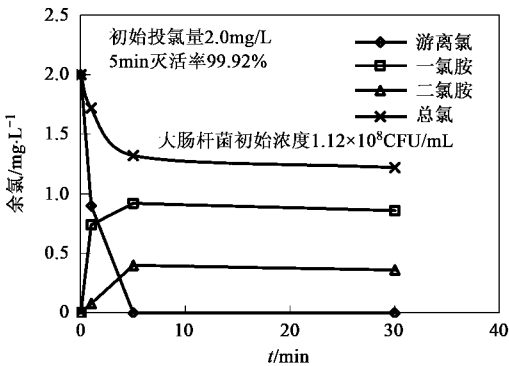


图 1 大肠杆菌杀灭试验中余氯随时间变化曲线
Fig.1 Residual chlorine in *E. coli* inactivation experiment

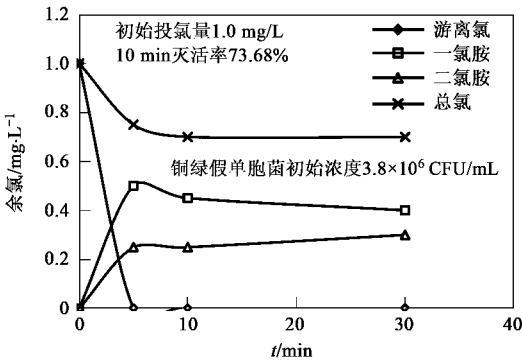
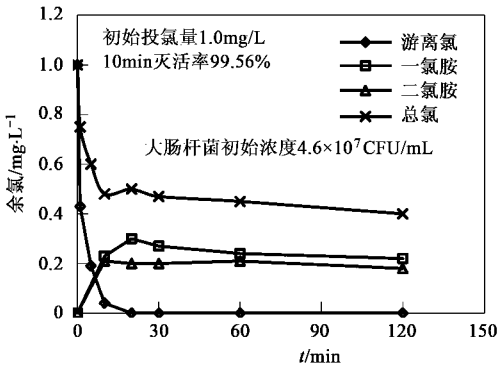


图 2 铜绿假单胞菌杀灭试验中余氯随时间变化曲线
Fig.2 Residual chlorine in *Pseudomonas aeruginosa* inactivation experiment

2.2 微生物杀灭试验中的游离氯转化

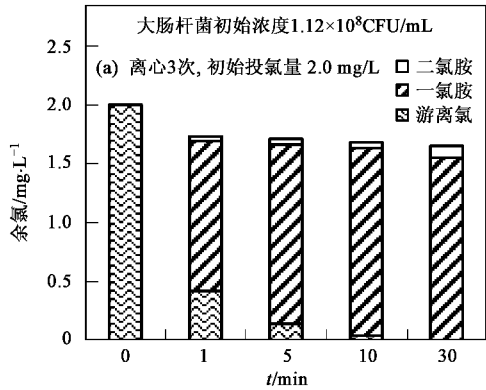
污染水样制备方法参考文献[1],消毒液采用次氯酸钠溶液,预先标定好消毒剂浓度,并且里面不含

一氯胺和二氯胺.从试验方法分析可知,试验过程中并没有无机氮引入系统.因此可以判断是有机氮氮的存在导致了游离氯的转化和消耗.

在水处理过程中有机氯胺是不需要的,因为有机氯胺是无效的消毒剂^[3].因此微生物杀灭效果试验中要尽量纯化菌液,减少菌液中有机物的含量,从而减少游离氯转氯胺的比例.

2.2.1 对菌液进行纯化

(1)增加菌液的离心次数



离心是微生物实验室最常用的菌液纯化方法,试验用菌液经由斜面培养基洗脱得到,菌液离心条件为3 000 r/min,每次离心 10 min,离心后弃去上清液,之后再加入无菌水继续离心.离心结束后将菌液稀释到 500 mL 无菌水中,先取样稀释测菌浓度,再用 DPD 法滴定余氯.测试结果如图 3 所示.

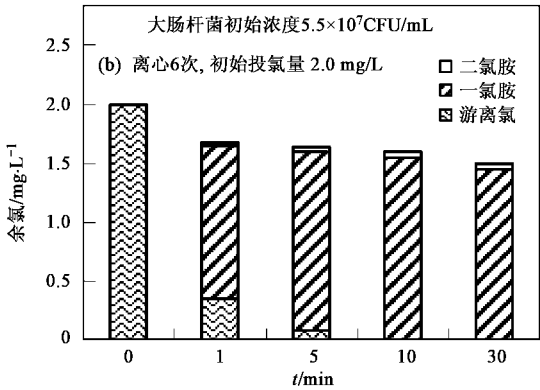


图 3 不同的离心次数对氯灭活大肠杆菌试验中余氯的影响
Fig.3 Residual chlorine in *E. coli* inactivation experiment with different centrifugal times

经过不同次数的离心处理后,离心次数较多的菌液中菌浓度有所降低,这是由于离心过程中多次倾倒入上清液带来的操作损失.试验结果表明,经过不同的离心次数纯化的菌液,加氯消毒后的游离氯转氯胺情况类似,说明菌液中所含有机物并未随上清液而被分离,而是依然保留在纯化后的菌体上.

(2)用滤膜过滤菌液

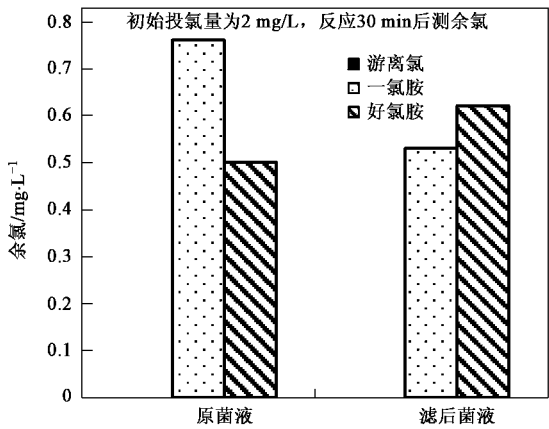
采用 0.45 μm 的滤膜过滤大肠杆菌菌悬液,将截留在滤膜上的大肠杆菌用无菌无有机物的生理盐水洗脱,配成新的菌悬液,体积保持不变,然后再进行余氯测量和活菌计数,对比结果如图 4 所示.

活菌计数的结果表明,全部的大肠杆菌都被截留在了滤膜上(重新稀释后浓度有所升高是由于测试误差),而余氯的结果显示滤后菌液中也发生了游离氯的转化反应,并且二氯胺的生成量还高于滤前菌液,因此可以认为来自培养基的氮源附着在菌体表面,或者有机氮是来源于微生物细胞物质本身,所以很难通过增加离心倍数或用膜过滤的方法而去除.

在研究过程中,还测试了菌液的氨氮,结果如表 1 所示.

对氨氮的研究表明,经过 0.45 μm 膜过滤后,滤液中只有少量的 TN、没有 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$,洗脱滤膜上的菌得到的菌液中包含了原菌液中大部分的 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 和全部的 TN.这也进一步验证了原菌液中的氨氮和总氮

并非溶解在水中的游离氮,而是来自微生物体内或者紧密附着在体表的氨氮和有机氮,不能通过膜滤过程去除.



大肠杆菌原菌液初始浓度 3.3×10^7 CFU/mL,
0.45 μm 过滤并重新稀释后菌浓度 4.2×10^7 CFU/mL
图 4 膜过滤对氯灭活大肠杆菌试验中余氯的影响

Fig.4 Residual chlorine in *E. coli* inactivation experiment with membrane filtration

表 1 膜滤前后菌液中 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 含量比较
Table 1 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ concentration in bacterium suspension

菌液种类	菌液浓度 /CFU·mL ⁻¹	NH ₄ ⁺ -N /mg·L ⁻¹	TN /mg·L ⁻¹
原菌液	33 × 10 ⁶	1.00	3.01
0.45 μm 膜滤后菌液	42 × 10 ⁶	0.88	2.99
0.45 μm 膜滤后滤液	—	未检出	0.41

2.2.2 对菌液进行稀释

培养过程中的有机氮很难通过离心或膜过滤去除,因此为了降低加氯消毒试验中游离氯转氯胺的问题,只能降低微生物杀灭试验中的菌悬液浓度.研究表明通过降低菌悬液浓度的方法可以部分降低

游离氯转化的问题.由图 5 可见,随着大肠杆菌初始浓度从 10^7 CFU·mL⁻¹ 量级降低至 10^5 CFU·mL⁻¹ 量级,在 30 min 的接触时间里,游离氯转氯胺的比例逐渐降低.

对菌浓度为 10^4 CFU·mL⁻¹ 量级的枯草芽孢进行

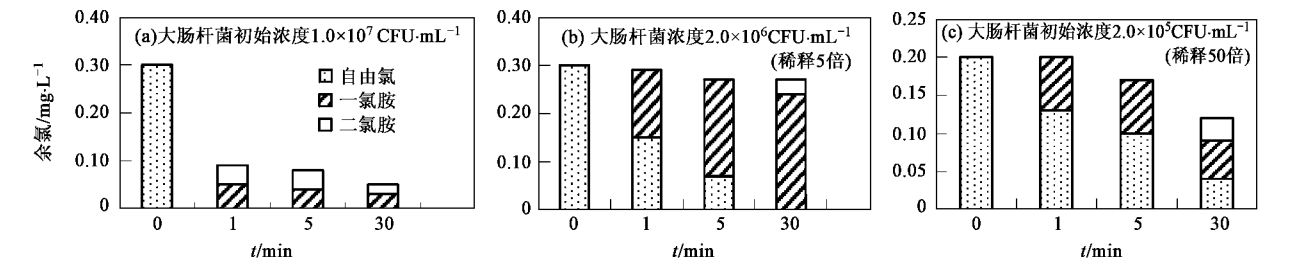


图 5 不同的大肠杆菌初始浓度对氯灭活大肠杆菌试验中余氯的影响
Fig.5 Residual chlorine in *E. coli* inactivation experiment with different *E. coli* concentrations

杀灭试验时,消毒过程中不发生游离氯的转化(图 6),该枯草芽孢菌液的初始浓度为 10^8 CFU·mL⁻¹ 量级,稀释 10 000 倍后得到试验菌液.由此可见,当菌液稀释到较低浓度后,游离氯转氯胺的现象可以逐渐被抑制,从而实现真正的游离氯消毒.

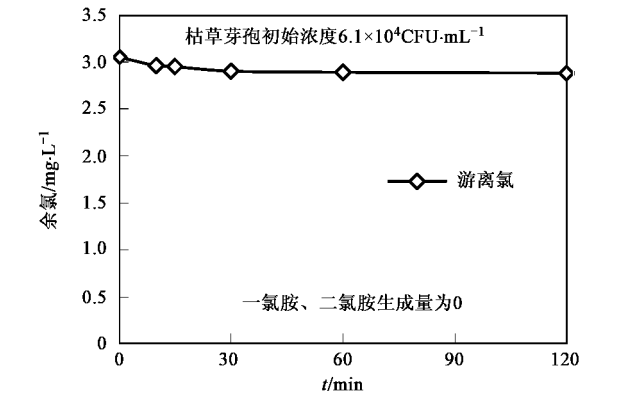


图 6 游离氯灭活枯草芽孢(ATCC6633)试验中余氯衰减情况
Fig.6 Residual chlorine in *Bacillus subtilis* spores inactivation experiment

3 讨论

3.1 试验中氮氮来源分析

有机氮来源可能包括两部分:一是微生物,微生物细胞物质中含有许多含氮化合物,如蛋白质、核酸、氨基酸等,含氮量常由于菌种及培养基条件不同而异,但一般细菌含氮量平均约为干重的 14% 左右^[4].二是培养基,培养基中含有微生物生长所必须的水、氮源、碳源、无机盐类、微量元素和生长因子等,其中氮的供应主要来自培养基中的蛋白胨、氨基酸以及动植物组织的浸出液.蛋白胨是含胨、肽和氨基酸等的有机混合物;浸出物中的含氮物质包括肌

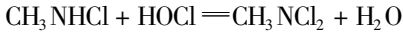
酸、黄嘌呤、次黄嘌呤、腺嘌呤、尿酸、骨腺胺、肌肽和肉毒碱等^[5].因此,来自微生物细胞和培养基中的氨基酸等物质都可以提供与游离氯反应的有机氮,造成游离氯的消耗.

有研究认为参加反应的有机氮应该来自细菌细胞内部的物质而不是来自培养基物质^[6],本研究通过增加离心次数和 0.45 μm 膜过滤受试菌液,均未有效解决游离氯反应的问题,该结论也说明参加反应的有机氮来源于细菌自身的细胞物质的比例更大.

3.2 试验中生成有机氯胺的反应机制

在微生物杀灭试验中,氮氮的浓度和有机氮的浓度需要最先被监测^[4],因为这 2 个值会影响余氯的监测分析.

自然存在的有机胺和氨基酸可以迅速与次氯酸钠水溶液反应生成有机氮氮化合物.无机氮氮或有机氮氮也可以生成二氯胺,但是反应速率要比生成余氯胺慢.由一氯甲胺生成二氯甲胺是一个二级反应,在 25℃ 的反应速率是 1.1×10^3 L·(mol·s)⁻¹,这与研究中的发现较为吻合.在这个反应中有机氯胺反应速度比无机氯胺快^[7, 8].



另外,有机氯胺和无机氯胺都会在废水氯化消毒过程中生成,生成量与氨和有机氮氮的比例、温度、pH 和相关反应系数有关^[9].

4 结论

(1)在游离氯作为消毒剂的微生物杀灭效果试验中,当试验菌污染水样浓度较高($\geq 10^6$

CFU·mL⁻¹)时,游离氯消毒剂会和菌液中的有机氮反应生成没有消毒效果的有机氯胺,影响消毒效果的评价.采用增加离心次数和滤膜过滤的方法纯化菌液,不能分离菌液中的有机物,因此也不能改善试验中出现的游离氯转氯胺的现象.

(2)在生活饮用水消毒效果鉴定试验里,为检测生活饮用水消毒剂的杀菌效果,要求试验菌(大肠杆菌1.3373)污染水样的含菌量为 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$ CFU·(100 mL)⁻¹[1],即 $10^2 \sim 10^3$ CFU·mL⁻¹量级,结果评价要求加消毒剂后无菌生长.根据本研究的结果,对这个量级的低浓度大肠杆菌进行加氯消毒试验,不会发生游离氯转氯胺的问题.但在细菌定量杀灭试验中,实验用菌悬液的浓度要求为 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ CFU·mL⁻¹,这个量级的菌液在加氯消毒过程中就肯定会发生游离氯转氯胺的问题.

(3)对消毒的深入研究一般需要考察消毒剂灭活微生物的动力学规律等问题,在对游离氯、氯胺和短时游离氯后转氯胺的顺序氯化消毒工艺研究中也需对微生物灭活效果作定量比较.因此如采用大肠杆菌作为试验菌,需要较高的初始菌浓度并降低加氯量,这种情况下就需要在研究中高度注意游离氯转氯胺的问题.为了解决该问题,研究者应该改为选

择 C_t 值较大、耐氯较强的其他指示微生物作为试验菌.

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部.《消毒技术规范》[M].(2002年版) 2002. 15-61.
- [2] White G C. Handbook of chlorination and alternative disinfectants [M]. (4th Edition). A Wiley-Interscience Publication, USA, 1999. 367-370.
- [3] Donnemair M M, Blatchley E R. Disinfection efficacy of organic chloramines [J]. Water Research, 2003, **37**: 1557-1570.
- [4] 俞毓馨,吴国庆,孟宪庭. 环境工程微生物检验手册[M]. 北京:中国环境科学出版社, 1990.
- [5] 陈天寿.微生物培养基的制造与应用[M]. 北京:中国农业出版社, 1995.
- [6] Shang C, Blatchley E R. Chlorination of pure bacterial cultures in aqueous solution[J]. Water Research, 2001, **35**: 244-254.
- [7] Abia L, Armesto X L, Garcia M V, *et al.* Oxidation of aliphatic amines by aqueous chlorine[J]. Tetrahedron, 1998, **54**: 521-530.
- [8] Armesto X L, Canle M, Garcia M V, *et al.* N reactivity vs. O reactivity in aqueous chlorination[J]. Int J Chem Kinet, 1994, **26**: 1135-1141.
- [9] Isaac R A, Morris J C. Transfer of active chlorine from chloramine to nitrogenous organic compounds[J]. Environ Sci Technol, 1983, **17**: 738-742.