

给水系统附生生物膜发育的生物量和种群结构

管运涛^{1,2}, 赵婉婉², 蒋展鹏², 常爱敏³

(1 清华大学 深圳研究生院, 深圳 518055; 2 清华大学 环境科学与工程系, 北京 100084; 3 深圳市水质检测中心, 深圳 518001)

摘要: 为了满足给水管网管水质的要求, 考察了不同的给水管道水力条件下聚乙烯管材上生物膜(生物量和种群结构)的发育情况。采用分子生物学与传统分离培养相结合的方法, 以清华地下水为原水, 在剪切力分别为 0.95、0.18 Pa 2 种条件下, 生物膜生物量和种群结构的发育呈现了同一规律, 即生物膜生物量在 7 d 内即可发育成熟, 在以后的发育中, 生物膜生物量一直稳定在 10^5 CFU/cm² (CFU 为菌落形成单位), 但生物膜的种群结构却随着时间发生显著变化。实验中所设置 2 种水力条件对生物膜发育的影响差别不大; 生物膜生物量的发育和种群结构的发育是 2 个相对独立的过程; 易于分泌胞外粘液和菌体表面具有疏水性等性质可以帮助细菌更好地在生物膜中生存发展。

关键词: 给水管网; 生物膜; 水力条件; 种群结构; 异养菌平板计数

中图分类号: TU 991.36

文献标识码: A

文章编号: 1000-0054(2007)06-0818-04

Biomass and community structure of biofilm development in drinking water distribution systems

GUAN Yuntao^{1,2}, ZHAO Wanwan², JIANG Zhanpeng²,
CHANG Aimin³

(1 Graduate School at Shenzhen, Tsinghua University,
Shenzhen 518055, China;

2 Department of Environmental Science and Engineering,
Tsinghua University, Beijing 100084, China;

3 Shenzhen Water Quality Monitoring Center,
Shenzhen 518001, China)

Abstract: The effect of hydraulic conditions on biofilm accumulation (biomass and community structure) in polyethylene pipes was investigated to improve drinking water quality. The biofilm biomass and community structures for two hydraulic conditions (the shear stresses of 0.95 Pa and 0.18 Pa) have similar results with the biofilm biomass (heterotrophic plate counts, HPCS) maturing within 7 days and remaining at 10^5 CFU/cm² (CFU: colony-forming unit) for same time, but with the biofilm community structure continuing to change. The two hydraulic conditions did not affect effect on the biofilm development, and the biofilm community structure development was independent of that of biofilm biomass.

The characteristics of the extracellular materials and the hydrophobic surfaces could help the bacteria develop in the biofilm.

Key words: drinking water distribution system; biofilm; hydraulic conditions; community structure; heterotrophic plate counts

人们健康意识的增强, 对给水水质的要求越来越高, 而给水管网管壁附生生物膜的形成会造成管道腐蚀, 也为致病细菌和机会致病菌的生长提供场所, 生物膜脱落会导致水质下降(嗅觉、味觉问题)等^[1]; 因此, 对给水管网管壁附生生物膜发育的研究受到越来越广泛的关注。

生物膜在管壁上的附着、发育、稳定是一个渐进的过程, 这一过程包括生物膜的生物量发育和种群结构发展 2 个方面。目前国内外对于生物膜的研究侧重于从生物膜生物量(异养菌平板计数 HPCS)的角度来考察生物膜随时间的变化特征^[1-2], 而对种群结构这一方面研究较少。

本文选用我国管材的主要发展方向之一的聚乙烯(PE)管材, 采用分子生物学与传统分离培养相结合的方法^[3], 考察不同的给水管道水力条件下生物膜中生物量和种群结构 2 个方面随着时间的变化情况。这样, 不仅可以了解生物总量的变化情况, 而且通过对种群结构的考察, 可以了解微生物多样性的变化, 有助于从微生物特性方面探究生物膜的发育机制。

1 实验模拟系统

1.1 模拟系统介绍

本实验采用现在国际上通用的反应器(annular

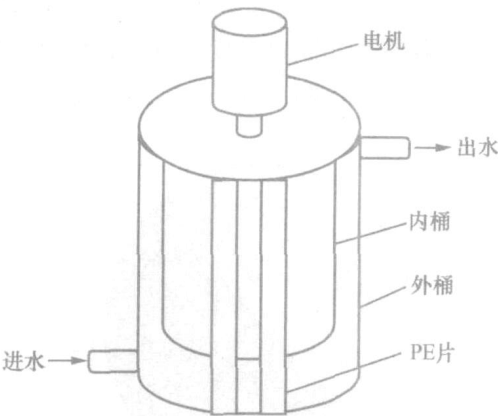
收稿日期: 2006-04-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(50478011, 50238020)

作者简介: 管运涛(1971—), 男(汉), 辽宁, 副教授。

E-mail: guanyt@mail.tsinghua.edu.cn

reactor, AR)用于模拟实际饮用水管道系统。AR 主要由一个旋转的封闭内桶和静止的外桶构成, 当内桶旋转时, 水相会对对管壁产生剪切力。本实验AR 主体构件材料为有机玻璃和不锈钢, 总容积为 670 mL。管材片为 PE, 插于外桶内壁。反应器外表面覆盖遮光纸, 以模拟实际管道系统的黑暗环境。如图 1 所示。



图中只画出 2 条 PE 片作为示意, 实际共有 16 条
图 1 AR 反应器示意图

1.2 模拟系统运行

反应器水力停留时间为 2 h^[2], 进水流速控制为 5~6 mL/min, 水温为 (20 ± 1) °C。实验中同时运行 2 个反应器 AR-A 和 AR-B, 分别用以模拟实际管网管径为 150 mm 的实际管道中水流速度为 0.65 m/s 和 0.25 m/s 的水力条件, 其相对应剪切力分别为 0.95 Pa 和 0.18 Pa。

本系统实验原水为清华大学自来水, 来源为清华大学地下水, 没有投加任何消毒剂, 水质参数如表 1 所示。CFU 为菌落单位 (colony-forming unit)。

表 1 实验原水水质参数

总有机碳(TOC)质量浓度	0.85 mg/L
溶解氧(DO)质量浓度	1.52 mg/L
异养菌平板计数(HPCs)	30 CFU/mL
平均水温	20
平均 pH	7.2

2 实验方法

2.1 取样

在反应器运行 7、14、30、90 d 取样。取样时, 分别从 AR-A、AR-B 中各取 2 片 PE 片进行检测。用小毛刷擦取 PE 片上的生物膜^[3], 并将其悬浮于 2 mL 的 0.85% 无菌生理盐水中, 进行梯度稀释培养。同时, 每月对原水微生物种群结构进行检测。

2.2 分析方法

2.2.1 细菌培养和分离纯化

实验采用饮用水异养菌平板计数普遍使用的 R₂A 培养基。取 100 μL 生物膜样品涂布于平板上, 对原水而言即将滤膜截滤微生物的一面向上贴于平板上。放于 20 °C 倒置恒温培养 7 d, 即可获得异养菌平板计数 (heterotrophic plate counts, HPCs)。对上述培养出的菌落, 根据“四分区划线法”进行分离纯化^[3]。

2.2.2 DNA 提取和聚合酶链式反应 (PCR)

将纯培养菌种接种在 30 mL 的液体 R₂A 培养基中, 培养 12 h (37 °C 摇床培养) 后, 取 10~20 mL 菌液进行 DNA 提取^[4]。

本实验 PCR 采用 16S rDNA 基因的通用引物 8F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') 和 1492r (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')^[5]。PCR 反应 50 μL 体系包括 1.5 mmol/L MgCl₂, 25 pmol 引物, 2 U Taq 酶。反应条件为: 95 °C 预变性 5 min; 然后 95 °C 变性 1 min, 50 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 3 min, 此过程循环 28 次; 最后 72 °C 延伸 10 min。将此 PCR 原液送北京三博远志生物公司进行测序, 可获得各菌种基因序列。

3 实验结果和讨论

3.1 生物膜总 HPCs 检测结果和讨论

图 2 表示生物膜在不同时间的生物量。可以看出, 在不同的发育时间, 2 种水力条件下 PE 片上的生物膜 HPCs 差别很小, 说明在本实验情况下, 即没有消毒剂存在时, 实验所设置的 2 种水力条件对生物膜 HPCs 的影响差别不大。此种现象与 Ollos 等^[2]的发现一致。

此现象说明, 在本实验条件下, 有机物的传质过程不是生物膜发育的控制步骤, 因此通过增大水力条件而提高传质并不会促进生物膜的发育; 同时由于壁面粘滞底层的存在, 使得增大的剪切力并未突破粘滞底层而破坏生物膜的发育。

由图 2 还可以发现, 2 种条件下 PE 片上生物膜 HPCs 在 4 个发育时间基本稳定在 10⁵ CFU/cm², 说明生物膜 HPCs 在 7 d 之内即发育稳定, 并且在以后的时间里维持在 10⁵ CFU/cm² 水平。此现象可以用生态学原理上的种群在有限环境中的增长原理来解释^[6], 即种群在增长的最后阶段会达到饱和期, 此时种群密度达到环境最大容纳量, 并维持在

一个固定数值附近。

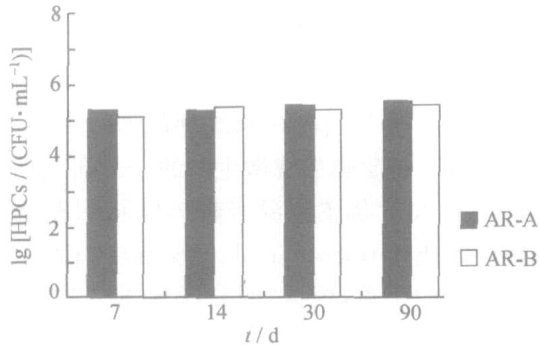


图2 AR-A 和 AR-B 中生物膜在不同发育时间的 HPCs 结果

3.2 生物膜种群结构检测结果和讨论

图 3a、图 3b 分别表示 2 种水力条件下生物膜在 7、14、30、90 d 的种群结构的变化。可以看出: AR-A 和 AR-B 2 反应器生物膜中, 初始时以 B2 所占比例最高, 但随着发育时间的增长, B2 所占比例大幅下降; B3 情况与此相反, 初始时所占比例较低, 后期成为主要优势菌种; B4 所占比例随着发育时间的增长平稳增加, 后期也成为主要优势菌种; 随着发育时间的增加, 生物膜中的优势菌种数不断增加。

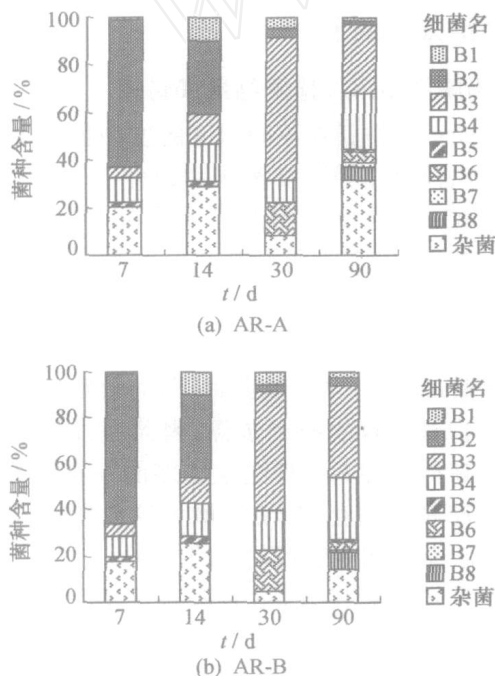


图3 4 个发育时间生物膜的种群结构变化

由图 3 可知, 在 2 种水力条件下, 生物膜种群结构的发展变化呈现了极其相似的现象。这说明这 2 种水力条件对生物膜种群结构发育的影响差别不

大, 所以, 将 2 种水力条件下的情况综合一起, 来探讨生物膜种群结构的发展规律。

生物膜在初始发育期, 附着于载体上的主要菌种受原水种群结构的影响较大。如图 4 所示, 在实验原水中以 B2 所占比例最高, 故在第 7 天发育的生物膜中以 B2 居多; 但随着发育时间的增长, 更适于在生物膜中生存的 B3 成为更有力的竞争者, 逐渐取代 B2 的位置而成为生物膜中占绝对优势的菌种。同时, 随着生物膜逐渐发育成熟, 微生物多样性逐渐增加。这一规律, 与 Martiny 等^[7]的发现相似。

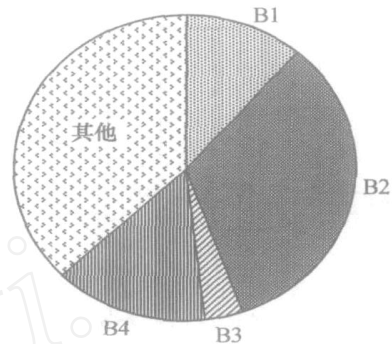
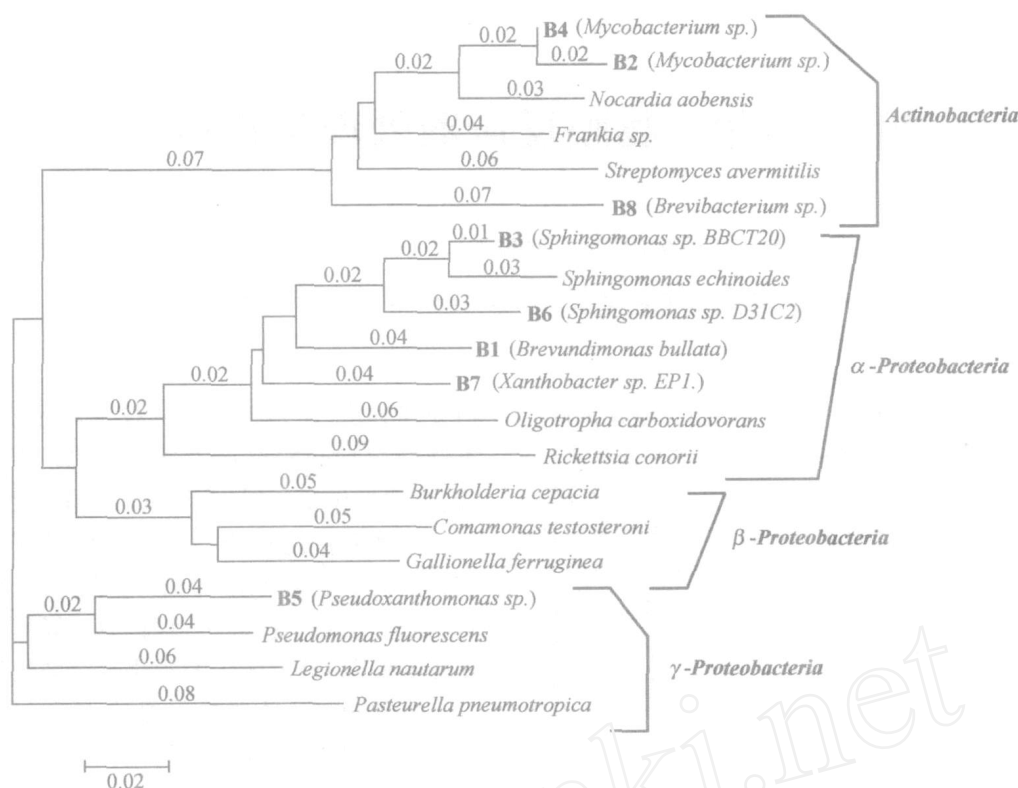


图4 实验原水中微生物种群结构

从上述 4 个取样时间的样品中共分离出 8 种异养菌优势菌株, 通过 DNA 提取、PCR 扩增和基因测序, 将所获得序列与美国国家生物技术信息中心 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 的核酸数据库已知序列进行比对, 并同时利用系统树绘制软件 DNA Star、Clustal X 以及编辑软件 Treeview, 绘制生物膜中异养菌优势菌种系统发育树, 如图 5 所示。

从以上分析可以得出: 在实验原水为清华地下水的条件下, 生物膜中异养菌优势菌种分别属于 α 变形杆菌纲 (B1、B3、B6、B7)、放线菌纲 (B2、B4、B8) 和 γ 变形杆菌 (只有 B5), 以 α 变形杆菌纲和放线菌纲为主。同时, 在这 4 个发育时间里, B2、B3、B4 都曾在生物膜中占有较高比例, 其中 B2 和 B4 属于分枝杆菌 (*Mycobacterium*), B3 属于鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas*)。分枝杆菌具有疏水性表面, 有助于生物膜的发育形成^[8]; 鞘氨醇单胞菌可以分泌胞外粘液, 有助于细胞粘附于管壁上^[8]。可见, 管壁对生物膜中菌种具有选择性, 某些具有疏水性表面或者易于分泌粘液等特殊性质的细菌, 才可以成为其中的主要优势菌种; 但并非具有这些特殊性质的所有细菌都可以一直占据主要优势菌种的地位, 比如 B2 的逐渐消亡, 说明各菌种的发育还受到其他因素的限制, 比如营养结构、代谢模式等。



图中数值为进化距离的基准长度

图5 生物膜中异养菌优势菌种系统发育树

4 结 论

1) 2 种水力条件(剪切力分别为 0.95、0.18 Pa)对生物膜生物量的发育和种群结构的发育这两方面的影响差别不大。

2) 以清华大学自来水为原水, PE 片上生物膜 HPCs 在 7 d 内即可发育成熟, 并在以后的发育中一直稳定在 10^5 CFU/cm² 水平, 但生物膜的种群结构却随着时间发生显著变化。

3) 生物膜中以 α 变形杆菌纲细菌和放线菌纲细菌为主。某些具有疏水性表面或者易于分泌粘液等特殊性质的细菌, 更易于成为主要优势菌种。

参考文献 (References)

- [1] Percival S L. Review of potable water biofilm in engineered systems [J]. *British Corrosion J*, 1998, 33(2): 130 - 137.
- [2] Peter J O, Peter M H, Robin M S. Factors affecting biofilm accumulation in model distribution systems [J]. *American Water Works Association J*, 2003, 95(1): 87 - 97.
- [3] 柳江华. 给水管网附生物膜研究 - 微生物群落及其影响 [D]. 北京: 清华大学, 2005.

L U Jianghua. Study on Biofilms Attached to Water Supply Pipes-Microbial Community and Its Influence [D]. Beijing: Tsinghua University, 2005. (in Chinese)

- [4] Araya R, Tani K, Takagi T, et al. Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent in situ hybridization and DGGE analysis [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 43(1): 111 - 119.
- [5] Liu W T, Marsh T L, Cheng H, et al. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA [J]. *Oceanographic Literature Review*, 1998, 45(3): 498.
- [6] 孙儒泳. 动物生态学原理 [M]. 2 版. 北京: 北京师范大学出版社, 1992.
- [7] SUN Ruyong. Principles of Animal Ecology [M]. 2nd ed. Beijing: Beijing Normal University Press, 1992. (in Chinese)
- [8] Martiny A C, Jørgensen T M, Albrechtsen H J, et al. Long-term succession of structure and diversity of a biofilm formed in a model drinking water distribution system [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(11): 6899 - 6907.
- [9] Gomila M, Gascó J, Busquets A, et al. Identification of culturable bacterial present in haemodialysis water and fluid [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, 52(1): 101 - 114.