五氯酚对生物膜活细胞含量及分布的影响研究

刘静，周小红，施汉昌*
（清华大学环境科学与工程系，北京 100084）

摘要：以废水处理生物膜为研究对象，建立了表征生物膜细胞活性的磷脂测定方法. 研究中采用冷冻切片技术，以 150 μm 为一层，考察生物膜不同深度的磷脂浓度. 结果表明，当五氯酚浓度为零时，生物膜磷脂含量随深度方向呈近似的正态分布，磷脂含量的绝对值在（1246.2 ± 217.4）～（527.2 ± 95.3）μg/L之间（$n = 4$），峰值出现在生物膜深度（0.60 ± 0.15）μm 位置，表明该处生物膜活细胞含量最高. 当五氯酚浓度分别为 5、10 和 20 μg/L时，控制暴露时间为 2 、6 和 24 h 后，结果表明，除 5 μg/L 五氯酚暴露 2 h 的情况之外，五氯酚作用下的生物膜各层磷脂分布值明显下降，尤其在 0.7 ～0.9 μm 附近，磷脂的降低程度最大可达 70%. 实验数据表明五氯酚对生物膜内细胞存活情况具有不利影响，且随着 PCP 浓度及暴露时间的增加，不利影响的程度增强.

关键词：磷脂测定；五氯酚；微切片；生物膜；活细胞含量
中图分类号：X703.1 **文献标识码**：A **文章编号**：0250-3301（2011）02-0483-05

Effect of PCP on the Living Cell Content and Distribution in Biofilms

LIU Jing, ZHOU Xiao-hong, SHI Han-chang
(Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: The phospholipids method for the determination of the living cell content in the biofilm was established to study the wastewater biofilm. With the micro-slicing technology, the biofilm was divided into 150μm-layer for the phospholipids analysis. Results showed the phospholipids were approximately normal distribution along the biofilm depth without no addition of pentachlorophenol (PCP). The absolute values were between (1 246.2 ± 217.4) μg/L and (527.2 ± 95.3) μg/L with the maximum occurring at the depth of (0.60 ± 0.15) μm, indicating the highest concentrations of the living cell in the biofilm. With the PCP concentrations of 5 μg/L, 10 μg/L and 20 μg/L and the exposure times of 2 h, 6 h and 24 h, respectively, the results of the orthogonal experiments showed the value of phospholipids decreased greatly along the biofilm depth only with the exception of 5 μg/L PCP concentration and 2 h exposure time, with a concentration decline by up to 70% especially close to the peak of phospholipids distribution. Results proved that PCP has an adversely influence on the living cells, and the influence can be enhanced with the increase of PCP amount and the exposure time.

Key words: phospholipids method; pentachlorophenol (PCP); micro-slicing; biofilm; living cell content

生物膜法是一种广泛使用的污水处理方法，对水质、水量变化有较强的适应性，恢复能力强；产生污泥比重大，沉降性能好；能够处理低浓度的废水，处理效果好，易于维护运行[1]等. 由于缺乏测试手段和工具，在生物膜研究的早期，通常将其简化成各项均匀同性的微生物群体，对生物膜的研究也只能应用黑箱模型，这种对生物膜结构粗浅的认识阻碍了废水生物膜处理工艺的优化和发展[2,3].

近年来，各种新技术、新手段的应用促进了对生物膜更深的了解，磷脂分析技术是其中一种. 生物膜中 80% ～90% 的磷脂位于微生物的细胞膜上，研究表明其在膜中处于动态平衡中，并且细胞一旦死亡，磷脂很快参与分解代谢被消耗[4]. 磷脂分析技术利用磷脂在活细胞内动态平衡的特点，通过测定细胞中的磷脂含量，间接表征微生物群体中活细胞的含量[5]，是目前应用较多的一种活细胞含量测定技术[6]. Zhang 等[7]曾用该技术成功测定出生物膜中的活细胞含量及分布. 此外，微切片技术也是研究生物膜分层结构的重要手段，它使用微型切片机沿生物膜底部平行或垂直的方向将其切成 10 ～100 μm 的薄片，为进一步的分层研究提供基础. Denise 等[8]利用微切片技术研究酚降解菌在生物膜内的分布情况. 微切片技术还是测定生物膜厚度的简便方法[9].

五氯酚（pentachlorophenol，PCP，分子式：C_6Cl_5OH）是具有致癌、致畸、致突变的持久性高氯代化合物，在我国曾被广泛用作木材防腐剂、除草剂、杀菌剂等[10]，因为其难降解性，当在环境中累

收稿日期：2010-02-26；修订日期：2010-06-09
基金项目：浙江省自然科学基金项目（Y5080009）
作者简介：刘静（1986 ～），女，硕士研究生，主要研究方向为生物膜特性，E-mail: liujing05@mails.thu.edu.cn
* 通讯联系人，E-mail: hanchang@mail.tsinghua.edu.cn

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

积到一定程度时,可能直接或间接地影响自然生态系统,危害人体健康[11]. 清华大学持久性有机物研究中心曾经就水中五氯酚钠对发光细菌毒性进行了测定,结果表明与水体中相同浓度的其他污染物相比,五氯酚钠表现出更强的毒性[12]. 也有研究者将五氯酚作用于好氧颗粒污泥[13,14],分析其对污泥中种群组成等影响,但是五氯酚对生物膜内活细胞含量及分布的影响,国内外还鲜有研究. 因此,本研究以废水处理生物膜为对象,通过建立分析生物膜活细胞含量的磷脂测定方法,结合微切片技术,考察生物膜沿深度方向的活细胞含量及分布情况,并进一步将生物膜暴露在五氯酚溶液中,考察不同五氯酚浓度和不同暴露时间对生物膜内部活细胞含量及分布的影响.

1 材料与方法

1.1 材料

5% 过硫酸钾消解液,2.5% 钼酸铵溶液;0.022% 孔雀绿溶液;0.22% 聚乙烯醇(PVA)溶液;标准磷酸盐溶液(0.5 mmol/L);显色剂(钼酸铵溶液:浓硫酸:孔雀绿溶液 = 20:15:18,混匀静置 30 min 后经 0.45 μm 微孔滤膜过滤). 以上试剂均采用分析纯.

5、10 和 20 μg/L 五氯酚溶液(采用二甲基亚砜为助溶剂).

1.2 设备

旋转蒸发仪(SENCO R 系列,上海申生科技有限公司),氮吹仪(HGC-24A,HA),COD 快速消解仪(型号:DRB200,美国 HACH 公司),紫外分光光度计(DR5000,美国 HACH 公司). 冷冻切片机(CM1900,LEICA),冷冻胶(Jung Tissue Freezing Medium,CE).

1.3 实验方法

1.3.1 生物膜培养方法

利用生物转盘反应器,以自配水培养生物膜,自配水成分如表 1,进水 COD 约为 450 mg/L,TN 约为 30 mg/L,TP 约为 8.7 mg/L,pH 值 6 ~ 8. 为方便获得生物膜样品,采用可拆卸的陶瓷片(面积:60 mm × 30 mm,厚度:10 mm)作为膜附着的基底. 反应器进水流量负荷约为 8.7 L/(d·m^2),运行温度为室温. 在反应器运行过程中,不定期测定反应器进出水 COD 浓度. 当 COD 去除率基本稳定后,反应器处于稳定运行状态,此后从反应器中取生物膜进行后续的微切片分析和磷脂含量测定.

表 1 反应器自配水组分(模拟生活污水)

Table 1 Influent composition of the reactor

组成	浓度/mg·L^{-1}
$C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$	300.0
玉米淀粉	100.0
蛋白胨	19
KH_2PO_4	38
NH_4Cl	57.3
$(NH_2)_2CO$	32.43
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	44
$MnSO_4 \cdot H_2O$	2.6
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.4
$CaCl_2$	4
$NaHCO_3$	74

1.3.2 微切片技术

准备面积为 0.5 cm × 0.5 cm 的若干生物膜样品,用冷冻胶将生物膜样品固定在样品平台上,切片厚度设置为 50 μm,切好后的薄片保存于载玻片上,放于 4℃ 冰箱储存. 以相邻 3 块切片为一组,进行后续的磷脂浓度分析. 微切片实验的具体步骤可参见文献[5].

1.3.3 绘制磷脂含量标准曲线

试剂以及去离子水水质的不同,会影响最大吸收峰的出现位置,为保证实验准确性,取少量标准磷酸盐配液,加入 1 mL 显色剂,0.2 mL PVA 溶液,显色 10 min. 在 500 ~ 700 nm 范围内扫描吸光度,确定磷酸盐特征吸收峰所在的位置. 之后,取磷酸盐标准液 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 加入 10 mL 比色管,用去离子水稀释至刻线,得到浓度为 0 ~ 0.1 μg/mL磷酸盐梯度稀释液,以零浓度溶液为参比,用同样方法在上述出现特征峰的波长下分别测定溶液的吸光度,绘制标准曲线.

1.3.4 生物膜内磷脂萃取条件确定

为优化提取脂质所需溶剂的体积数,根据 Findlay 等[5]的研究,氯仿的体积(mL)为生物膜湿重(g)的 7 倍或以上,就可以保证分析的准确度. 本研究中将生物膜划分为 150 μm 的若干层. 切片面积为 0.5 cm × 0.5 cm,总体积为0.003 75 mL/组,从本实验的经验来看,采取氯仿体积为 15 mL,甲醇 30 mL,去离子水 12 mL 作为萃取液效果最好.

1.3.5 生物膜内部磷脂含量的测定

在分液漏斗中加入一组生物膜薄片,依上述优化结果加入萃取液,振荡静置 2 h,等待生物膜内磷脂的充分溶解. 根据文献[5],继续向混合液中加入去离子水及氯仿,最终比例为氯仿:甲醇:水 = 1:1:0.9,静置 24 h,使混合液充分分层,此后将下层脂相

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

转移至茄形瓶中,40℃旋蒸至溶液剩余 3 ~ 4 mL. 将剩余溶液转移至 10 mL 消解管中,为使转移完全,用少量氯仿润洗茄形瓶 2 次,润洗后的液体也倒入消解管. 将消解管中溶剂用氮气吹脱至干后,加入 4 mL 过硫酸钾溶液后在 121℃消解 30 min. 静置冷却后,加入 1 mL 显色剂,0.2 mL PVA 溶液,显色 10 min. 用分光光度计测量吸光度.

2　结果与讨论

2.1　磷脂测定的标准曲线

由 500 ~ 700 nm 波段内标准磷酸盐配液的吸光度曲线可知,在 615 ~ 620 nm 之间吸光度值达到峰值,因此,将磷酸盐测定的波长定为 615 nm. 图 1 为梯度磷酸盐标准溶液的吸光度值,通过线性拟合,获得了在 0.1 ~ 1 μg/mL的范围内磷含量(x)与吸光度值(y)的拟合方程为 $y = 0.21x$,相关系数 $r = 0.999\ 8$.

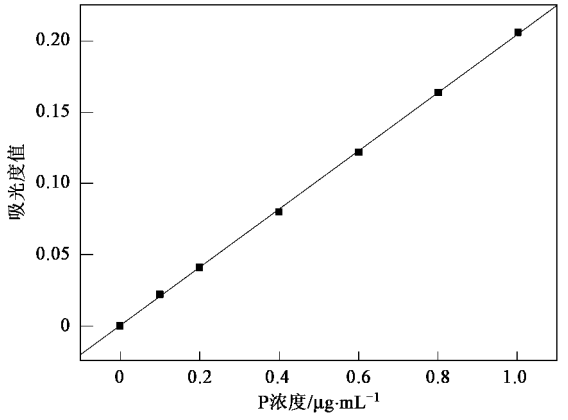

图 1　磷脂含量分析标准曲线

Fig. 1　Standard curve for phospholipids concentration measurement

2.2　生物膜磷脂的分层含量

使用 4 组生物膜样品测定其中的磷脂分层含量,其均值及变化范围如图 2,从中可见,生物膜厚度在 1.8 ~ 2.0 mm 之间,生物膜内磷脂分布随生物膜深度方向呈近似的正态分布,磷脂含量的绝对值在(1 246.2 ± 217.4) ~ (527.2 ± 95.3) μg/L之间,磷脂含量的峰值出现在生物膜深度(0.60 ± 0.15) mm 位置.

由结果可知,生物膜中磷脂的含量在表层靠近中部的地方存在最高峰. 生物膜表面的磷脂含量比较低,这可能是由 2 个原因造成的:首先生物膜表面的凹凸性会使切割时造成第一层的切割面积变小,出现部分切割的情况;其次生物膜表面的微生物着

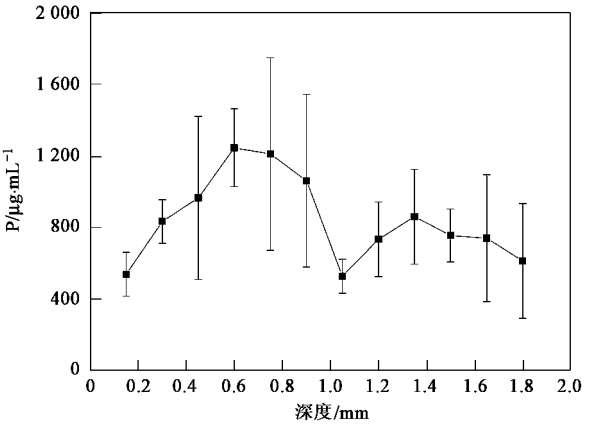

图 2　生物膜内活细胞的含量分布情况

Fig. 2　Distribution of living cell number inside the biofilm

生疏松,其密度小,可以解释磷脂含量少的原因. 表层靠近中部出现的最高峰是生物膜内营养物质的传质作用,以及生物膜抵抗外界冲击的共同结果. 此处溶解氧充足,可降解基质丰富,所以活细胞数量多,相应磷脂的含量也较高,这与 Masuda 等[15] 当年的实验结果一致. 在生物膜深层,由于传质限制,活细胞的量逐渐减少,磷脂含量较少;同时由于其受到外部微生物层的保护,其组成和结构都相对稳定,磷脂含量起伏不大,趋于稳定. 实验结果与以往对生物膜结构与性质的描述吻合[7,16,17].

2.3　不同浓度 PCP 对磷脂含量及分布的影响

在五氯酚浓度分别为 5、10、20 μg/L 的连续流培养液中培养生物膜,分别在暴露时间为 2 、6 及 24 h 对其中的磷脂含量及其分布进行测试,实验结果如图 3 ~ 5 所示.

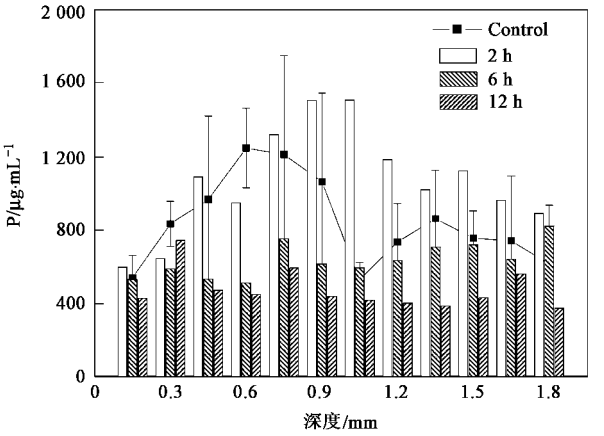

图 3　在浓度为 5 μg/L 的 PCP 中暴露 2 h、6 h 和 24 h 后生物膜内磷脂的分层含量及分布

Fig. 3　Layer-content and distribution of phospholipids in the biofilm after emerge in 5 μg/L PCP solution for 2 h, 6 h and 24 h

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

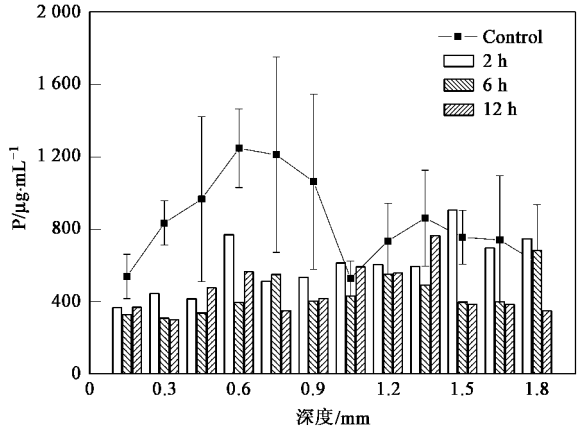

图 4 在浓度为 10 μg/L 的 PCP 中暴露 2 h、6 h 和 24 h 后生物膜内磷脂的分层含量及分布

Fig. 4 Layer-content and distribution of phospholipids in the biofilm after emerge in 10μg/L PCP solution for 2 h, 6h and 24 h

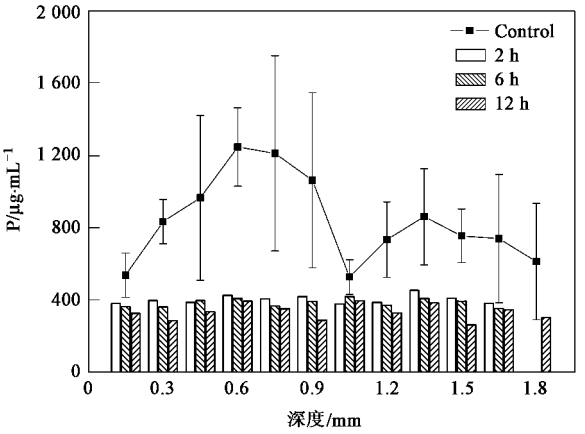

图 5 在浓度为 20 μg/L 的 PCP 中暴露 2 h、6 h 和 24 h 后生物膜内磷脂的分层含量及分布

Fig. 5 Layer-content and distribution of phospholipids in the biofilm after emerge in 20μg/L PCP solution for 2 h, 6 h and 24 h

五氯酚浓度为 5 μg/L暴露时间 2 、6 和 24 h 时,生物膜内磷脂的分层含量及分布如图 3 所示. 除在五氯酚浓度为 5 μg/L,暴露时间 2 h 没有观察到明显的磷脂分布异常外,其他情况下,生物膜深度(1.00 ± 0.10) mm 位置处的磷脂分布峰值明显下降,在生物深度方向上,磷脂含量下降值在 200 ~ 1 100 μg/L之间. 从暴露时间 2 h 至暴露时间 6 h,同一深度处的磷脂含量最大下降 65%;从暴露时间 6 h 至暴露时间 24 h,同一深度处的磷脂含量最大下降 50%.

五氯酚浓度为 10 μg/L暴露时间 2、6 和 24 h 时,生物膜内磷脂的分层含量及分布如图 4 所示. 在生物深度方向上,磷脂含量主体呈下降趋势. 从暴露时间 2 h 至暴露时间 6 h,磷脂含量主要呈现下降趋势,同一深度处的磷脂含量最大下降 50%;从暴露时间 6 h 至暴露时间 24 h,生物膜深层的磷脂含量下降,同一深度处的磷脂含量最大下降 50%.

五氯酚浓度为 20 μg/L暴露时间 2 、6 和 24 h 时,生物膜内磷脂的分层含量及分布如图 5 所示. 五氯酚浓度为 20 μg/L下,深度方向上磷脂含量基本为 400 μg/L左右,较原值最大下降 60% 左右. 暴露时间 2 、6 和 24 h 时在生物深度方向上,磷脂含量只是略有下降,下降值在 50 ~ 100 μg/L之间. 从暴露时间 2 h 至暴露时间 6 h,同一深度处的磷脂含量最大下降 7%;从暴露时间 6 h 至暴露时间 24 h,同一深度处的磷脂含量最大下降 30%.

由图 3 ~ 5 可知,各个浓度的五氯酚培养液都使生物膜中活细胞的含量有不同程度的下降. 综合以上结果,五氯酚浓度升高后,随着培养时间的增长,生物膜中磷脂在深度方向各层的含量基本都出现明显的下降趋势,在 2 ~ 6 h 暴露时间下最为突出,含量降低程度最大可达 70%,并且出现在分布最高峰附近,之后趋于平稳. 说明五氯酚对生物膜内细胞存活情况具有很大影响,这一影响在活细胞含量最多的表层尤其明显. 对表面和底层影响相对较弱,是由这两处特殊的位置关系决定的. 由于受外界环境的影响较大,剪切作用强烈,使表层活细胞的数目偏少,五氯酚的作用体现不明显;而底层细胞处于生物膜内部,在传质限制的情况下活细胞含量也很少,传质限制同时决定了其对五氯酚的接触量也会很小,加上受到多层微生物的保护,毒害作用被逐级降低,因此表面和底层的磷脂分析结果变化程度相对较弱.

其次,对于每一种五氯酚浓度培养下的生物膜,其内部磷脂除了含量下降之外,在深度方向上的分布也逐渐呈现趋于平稳的趋势,最终含量都基本与底层相同. 这一结果再次证明生物膜结构对底层细胞的保护作用,在降解有毒有害废水时,这种保护作用可以有效保存具有降解能力的微生物,非常有利于微生物代谢功能的充分发挥和特定有机物的降解[18],从而达到去除污染物的目的.

3 结论

(1)生物转盘反应器中生物膜磷脂含量随生物膜深度方向呈近似的正态分布,磷脂含量的绝对值在(1 246.2 ± 217.4) ~ (527.2 ± 95.3) μg/L之间,

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

峰值出现在生物膜深度(0.60 ±0.15)mm 位置,表明该处生物膜活细胞含量最高.

(2)当五氯酚浓度分别为 5、10 和 20 μg/L时,控制暴露时间为 2 、6 和 24 h 后,正交实验结果表明,除 5 μg/L五氯酚暴露 2 h 的情况外,与未添加 PCP 情况相比较,生物膜深度方向上磷脂分布的正态趋势随浓度和时间的升高趋于平缓,峰值明显下降,最高可达 70%,说明五氯酚对细胞存活具有不利影响,且随着 PCP 浓度及暴露时间的增加,不利影响的程度增强.

(3)基于上述研究,进一步证明了生物膜法在降解有毒有害废水时,膜表层对底层细胞具有一定的保护作用,从而使生物膜具有较好的抗冲击负荷能力.

参考文献:

[1] 许保玖,龙腾锐. 当代给水与废水处理原理 [M]. 北京:高等教育出版社,2000.476-477.

[2] Wasche S, Horn H. Influence of growth conditions on biofilm development and mass transfer at the bulk/biofil, interface [J]. Water Research, 2002, **36**(19): 4775-4784.

[3] Kerstin G, Harald H, Thomas R. Interaction between biofilm development, structure and detachment in rotating annular reactors [J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2008, **31**(6): 619-629.

[4] Arnaiz C, Gutierrez J C, Lebrato J. Support material selection for anaerobic fluidized bed reactors by phospholipid analysis [J]. Biochemical Engineering Journal, 2006, **27**(3): 240-245.

[5] Findlay R H, King G M, Watling L. Efficacy of phospholipid analysis in determining microbial biomass in sediments [J]. Applied & Environmental Microbiology, 1989, **55**(11): 2888-2893.

[6] Arnaiz C, Buffiere P, Elmaleh S, *et al*. Anaerobic digestion of dairy wastewater by inverse fluidization: the inverse fluidized bed and the inverse turbulent bed reactors [J]. Environmental Technology, 2003, **24**(11): 1431-1443.

[7] Zhang T C, Bishop P L. Density, porosity and pore structure of biofilms [J]. Water Resource, 1994, **28** (11): 2267-2277.

[8] Taylor D G, Breen A, Bishop P L. Determination of phenol-degrader distribution in biofilms using gene probes [J]. Water Resource, 1997, **31**(1): 119-129.

[9] Zhang T C, Fu Y C, Bishop P L. Competition for substrate and space in biofilms [J]. Water Environment Research, 1995, **67**(6): 992-1003.

[10] 王学东,李爱民,高创新. 环境中五氯酚残留检测方法的优化研究[J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 2006, **4**: 541-543.

[11] Kao C M, Chai C T, Liu J K, *et al*. Evaluation of natural and enhanced PCP biodegradation at a former pesticide manufacturing plant [J]. Water Research, 2004, **38**(3): 663-672.

[12] 施玮,牛军峰,余刚. 水中五氯酚钠绝对发光细菌毒性测定的影响因素[J],环境科学,2004, **25**(3):44-47.

[13] Wang F, Xia S Q, Liu Y, *et al*. Community analysis of ammonia and nitrite oxidizers in start-up of aerobic granular sludge reactor [J]. Journal of Environmental Sciences, 2007, **19**:996-1002.

[14] Liu H, Li G W, Li X F, *et al*. Molecular characterization of bacterial community in aerobic granular sludge stressed by pentachlorophenol [J]. Journal of Environmental Sciences, 2008, **20**(10):1243-1249.

[15] Masuda S, Watanabe Y, Ishiguro M. Biofilm properties and simultaneous nitrification and denitrification in aerobic rotating biological contactors [J]. Water Science and Technology, 1991, **23**(7-9): 1355-1363.

[16] Lee H, Choi E, Yun Z, *et al*. Microbial structure and community of RBC biofilm removing nitrate and phosphorus from domestic wastewater [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, **18**(8): 1459-1469.

[17] Taylor D G, Breen A, Bishop P L. Dertermination of phenol-degrader distribution in biofilms using gene probes [J]. Water Research, 1997, **31**(1):119-129

[18] 尹军,韩相奎,周春生,等. 流化式生物膜法处理含酚废水的效能[J]. 环境科学, 1996, **17**(1): 60-66,83.

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net