

管材对给水管附生生物膜微生物分布的影响^{*}

柳江华^{1,2}, 管运涛^{2,3,4}, 赵婉婉², 杨宏伟²

(1 西北农林科技大学 资源环境学院, 陕西 杨凌 712100;

2 清华大学 环境科学与工程系, 北京 100084;

3 清华大学 深圳研究生院, 广东 深圳 518055;

4 清华-京大环境技术研究和教育中心(清华大学 & 京都大学), 广东 深圳 518055)

[摘 要] 结合微生物学传统培养和分子生物学现代技术, 分析了无规聚丙烯(Polypropylene Random, PPR)管、镀锌钢管和铜管3种室内给水管附生生物膜微生物群落。结果表明, 在以上3种管道上发育1年的附生生物膜中, 分别有6种、5种和3种优势异养菌被分离出来; α 变形杆菌纲优势异养菌所占比例在PPR管、镀锌钢管和铜管附生生物膜中依次增加, 而 β 变形杆菌纲和放线菌纲优势异养菌所占比例则依次减小; 镀锌钢管和PPR管附生生物膜中均存在作为优势异养菌的机会病原体, 而铜管附生生物膜中则未分离出作为优势异养菌的机会病原体。

[关键词] 管材; 附生生物膜; 微生物分布; 机会病原体

[中图分类号] X172

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)01-0143-05

Influence of pipe materials on microbial distribution of biofilms attached to water supply pipes

LIU Jiang-hua^{1,2}, GUAN Yun-tao^{2,3,4}, ZHAO Wan-wan², YANG Hong-wei²

(1 College of Resources and Environment, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

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

3 Graduate School of Shenzhen, Tsinghua University, Shenzhen, Guangdong 518055, China;

4 Cooperative Research and Education Center for Environmental Technology, Tsinghua University and Kyoto University, Shenzhen, Guangdong 518055, China)

Abstract: Combining traditional methods of microbiology and modern techniques of molecular biology, this study analyzed the microbial communities of biofilms attached to PPR, galvanized steel and copper pipes for indoor water supply. The results indicated that biofilms having developed for about one year on three pipes above, 6, 5 and 3 species of dominant heterotrophic bacteria were isolated respectively; proportion of number of dominant heterotrophic bacteria of Class α -*P.roteobacteria* to number of heterotrophic bacteria increased in turn while the number of species of dominant heterotrophic bacteria and proportion of number of dominant heterotrophic bacteria of Class β -*P.roteobacteria*, *A.ctinobacteria* decreased in turn. What's more, there were opportunistic pathogens existing as dominant heterotrophic bacteria in biofilms of PPR and galvanized steel pipe, but no opportunistic pathogens or pathogens were isolated as dominant heterotrophic bacteria from biofilm attached to copper pipe.

Key words: pipe material; attached biofilm; microbial distribution; opportunistic pathogens

生物膜是一种由微生物细胞及其相关表面结构组成的有组织的微生物系统, 其是自然环境下微生物

* [收稿日期] 2005-12-14

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(50238020); 国家自然科学基金面上项目(50478011)

[作者简介] 柳江华(1980-), 男, 河南商丘人, 助研, 硕士, 主要从事环境微生物学研究。E-mail: liujh02@hotmail.com

物在微环境中的重要存在形式^[1]。给水管道内的附生生物膜已成为威胁公众饮水安全的重要因素之一,其危害主要体现在两方面,一是加剧管道金属材料的腐蚀或降低非金属材料稳定性^[2],二是为病原体或者机会病原体提供栖息场所^[3]。减少或消除附生生物膜的这些不利影响,是给水输送的一个重要任务。因此,对附生生物膜特性(微生物量、种群分布等)及影响因素的研究非常必要。影响给水管附生生物膜特性的因素多种多样,对其研究以往主要集中在给水消毒剂、营养物质(碳源、氮源、磷源等)浓度及给水预处理等方面,而对给水管材质的影响报道较少。

目前,在我国给水系统中,镀锌钢管在已有的管材中使用比例最大,但是由于其易腐蚀、易结垢等问题,新建给水系统禁止使用镀锌钢管,代之以无规聚丙烯(Polypropylene Random, PPR)给水管。另外,铜水管在我国给水系统中有一定程度的使用,如医院、高级宾馆等特殊场所。鉴于此,本研究分析镀锌钢管、PPR 管和铜管 3 种给水管附生生物膜微生物群落结构,以期得到水管材质对微生物分布的影响规律,为安全饮水提供参考依据。

1 试验模拟系统

管道附生生物膜发育采用 Percival 等^[4]的试验

表 1 试验模拟系统参数

Table 1 Parameters of simulation system

管长/cm Length of pipe	外径/mm Outer diameter	内径/mm Inner diameter	流速/(m · s ⁻¹) Fluid velocity	雷诺数 Reynolds number
100	20	17	0.035	595

表 2 试验用水水质参数

Table 2 Parameters of water for experiment

平均 pH Average pH	总有机碳/ (mg · L ⁻¹) Total organic carbon (TOC)	溶解氧/(mg · L ⁻¹) Dissolved oxygen (DO)	异养菌平板计数/ (mL ⁻¹) Heterotrophic plate counts (HPCs)	平均水温/°C Average temperature
7.2	0.85	1.52	2	19

2 试验方法

2.1 取 样

用于管壁附生生物膜的取膜方法主要有超声、振荡和擦取 3 种^[5]。根据实际情况,本研究采用小毛刷擦取的方法分别对镀锌钢管、PPR 管和铜管发育 1 年的附生生物膜取样。样品取后悬浮在 2 mL 体积分数 0.85% 的无菌生理盐水中制成悬液备用。

模拟系统,如图 1 所示。

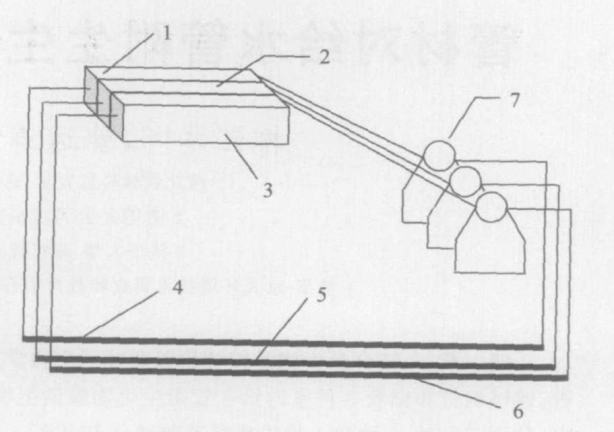


图 1 试验模拟系统流程图

1. 镀锌钢管水箱; 2. 铜管水箱; 3. PPR 管水箱; 4. 镀锌钢管; 5. 铜管; 6. PPR 管; 7. Masterflex 蠕动泵

Fig 1 Schematic diagram of simulation system

1. Tank of galvanized steel pipe; 2. Tank of copper pipe; 3. Tank of PPR pipe; 4. galvanized steel pipe; 5. copper pipe; 6. PPR pipe; 7. Masterflex peristaltic pump

为取样方便,本试验系统每种管材模拟管道由 20 个小节组成,各小节用胶皮箍相连。模拟系统运行参数如表 1 所示。本模拟系统用水为清华大学地下水,水质参数如表 2 所示。每 24 h 更换 1 次。

2.2 细菌培养及其计数

采用给水管营养环境微生物专用培养基 R₂A^[6]进行细菌培养。对 2.1 中所制样品悬液用无菌水以 10 倍稀释法稀释^[7],然后将稀释液在 R₂A 固体培养基上进行涂布平板接种(应在取样后 1 d 内完成,否则样品应制成含体积分数 15% 甘油的混合液保存于 -18 °C 冰箱)。接种后,将平板置于 28 °C 恒温培养箱中培养 5~7 d,进行平板计数。

2 3 分离纯化^[7]

对培养出的菌落, 结合菌落特征和个体特征, 根据“四分区划线法”进行分离纯化, 得到 3 种给水管的优势异养菌。

2 4 DNA 的提取^[8]

将 2 3 得到的优势异养菌纯培养物接种于 30 mL 的液体 R₂A 培养基中(不加琼脂, 其余成分同上固体 R₂A 培养基), 培养 10 h 后(摇床培养, 170 r/min, 28 ℃), 取 10~20 mL 液体纯培养物进行 DNA 提取。

2 5 聚合酶链式反应(PCR)

引物为转录细菌 16S rRNA 基因的通用引物 EUBf933 和 EUBr1387^[9], 其信息如表 3 所示。

PCR 反应体系(引物及试剂均购自华美生物工程公司)如表 4 所示, 具体操作步骤参见文献[9]。

表 3 引物序列信息	
Table 3 Information of primers	
引物 Primers	序列(5'→3') Sequences
EUBf933	GCA CAA GCG GTG GAG CAT GTG G
EUBr1387	GCC CGG GAA CGT ATT CAC CG

表 5 3 种给水管附生生物膜的优势异养菌	
Table 5 Dominant heterotrophic bacteria of biofilms on three pipes	
模拟管道 Simulated pipe	优势菌 Dominant bacteria
PPR 管 PPR pipe	PPR1
	PPR2
	PPR3
	PPR4
	PPR5
	PPR6
镀锌钢管 Galvanized steel pipe	GSP1
	GSP2
	GSP3
	GSP4
	GSP5
铜管 Copper pipe	CP1
	CP2
	CP3

由表 5 可以看出, PPR 附生生物膜优势异养菌种类最多(分属 6 个属), 但无占绝对优势的优势异养菌, 这说明 PPR 是一种比较惰性的管材, 不利于特异微生物发育; 而铜管附生生物膜微生物种群可能由于 Cu²⁺ 的选择作用而显得比较单一, *Sphingomonas* 属优势异养菌占 HPCs 的 86%, 占绝对优势; 镀锌钢管附生生物膜优势异养菌种类介于二者

表 4 PCR 反应体系	
Table 4 PCR reaction system	
成分 Component	体积/ μ L Volume
脱氧核苷三磷酸 dNTPs	4
引物 1 Primer 1 (EUBf933)	2.5
引物 2 Primer 2 (EUBr1387)	2.5
镁离子 Magnesium ion(Mg ²⁺)	3
10×缓冲液 10×buffer	5
双蒸蒸馏水 ddH ₂ O	32.5
Taq 酶 Taq enzyme	0.7

2 6 DNA 测序及序列比对

将 2 5 的 PCR 产物提交上海博亚生物技术公司北京分公司进行 DNA 测序, 将测得的序列与美国国家生物技术信息中心(NCBI)核酸数据库已知序列进行比对, 之后用 MEGA 3.1 软件(www.bion.com)绘制系统发育树。

3 结果与讨论

PPR 管、镀锌钢管和铜管附生生物膜异养菌平板计数(HPCs)分别为 2.30×10^5 , 2.40×10^6 , $5.21 \times 10^5/\text{cm}^2$; 并从中分别分离出 6 种(PPR1~PPR6)、5 种(GSP1~GSP5)和 3 种(CP1~CP3)优势异养菌(表 5)。

模拟管道 Simulated pipe	优势菌 Dominant bacteria	比对结果 Result of blasting	比例/% Proportion
PPR 管 PPR pipe	PPR1	<i>Glacialisce bacterium</i>	27
	PPR2	<i>B revund inas vesicularis</i>	4.6
	PPR3	<i>A quabacterium</i> sp. clone C-7	20
	PPR4	<i>Caulobacter henricii</i>	5
	PPR5	<i>Sphingobium am iense</i>	4.6
	PPR6	<i>A rthrobacter</i> sp.	23
镀锌钢管 Galvanized steel pipe	GSP1	<i>A f i p i a m assiliensis</i>	8.3
	GSP2	<i>Sphingamonas</i> sp. LCSAOTU 29	17
	GSP3	<i>Sphingamonas</i> sp. DB-1	13
	GSP4	<i>A cidovorax</i> sp. U FZ-B530	10
	GSP5	<i>Sphingamonas</i> sp. SRS2	18
铜管 Copper pipe	CP1	<i>Sphingobium</i> sp. 3A-13	4
	CP2	<i>Sphingamonas</i> sp. ATCC 31555	77
	CP3	<i>D rinking water bacterium</i> MB10	5

之间。
根据《常见细菌系统鉴定手册》^[10]可知, 泡囊短波单胞菌(*B revund inas vesicularis*)和节杆菌(*A rthrobacter* sp. KA 2-29)、阿菲波菌(*A f i p i a m as-siliensis*)均为机会病原体, 在一定条件下可以导致人畜患病。从表 5 可知, PPR 管和镀锌钢管附生生物膜中均含有作为优势异养菌而存在的机会病原

体,而铜管附生生物膜优势异养菌中却未见这 3 种机会病原体。因此,从饮水安全方面考虑,铜管为比较理想的管材。

将各优势异养菌序列与 NCBI 核酸数据库典型序列用 DNA Star 软件进行排队,然后用 MEGA

3.1 软件绘制优势异养菌系统发育树,如图 2 所示。根据文献[11],将图 2 中的优势异养菌分别归为 α 变形杆菌纲(α -Proteobacteria), β 变形杆菌纲(β -Proteobacteria), γ 变形杆菌纲(γ -Proteobacteria) 及放线菌纲(Actinobacteria)。

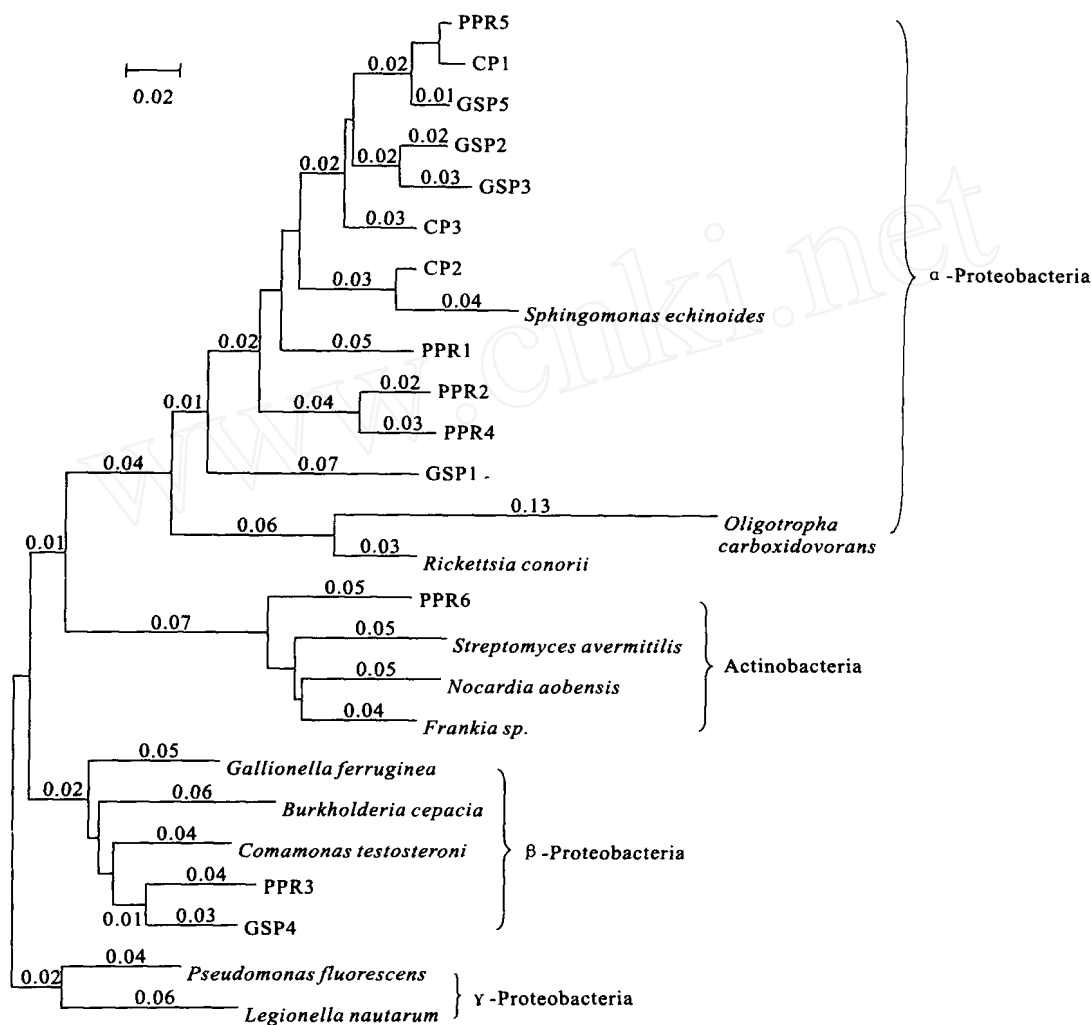


图 2 各管道附生生物膜优势菌群系统发育树

Fig 2 Phylogenetic tree of dominant heterotrophic bacteria of biofilms attached to specific pipes

从图 2 还可以看出, PPR 管附生生物膜优势异养菌分属 3 个纲, 镀锌钢管附生生物膜优势异养菌分属 2 个纲, 铜管附生生物膜仅含有 α 变形杆菌纲优势异养菌。

从图 2 还可看出, 各管道附生生物膜多数优势异养菌均属 α 变形杆菌纲, 可能是由于试验用水较适宜于这个纲的细菌生长。结合图 2, 将表 5 中各纲优势异养菌所占比例分别相加可以看出, 在 PPR

管、镀锌钢管和铜管 3 种管道附生生物膜中, α 变形杆菌纲优势异养菌所占比例分别为 41.2%, 56.3% 和 86%; β 变形杆菌纲优势异养菌的比例分别为 20%, 10% 和 0%; 放线菌纲优势异养菌的比例分别为 23%, 0% 和 0%。由此可知, α 变形杆菌纲优势异养菌的比例在 PPR 管、镀锌钢管和铜管附生生物膜中依次增大; 而 β 变形杆菌纲、放线菌纲优势异养菌的比例则依次减小。

综上所述可知, 管材对附生生物膜中微生物分布具有显著影响。

[参考文献]

- [1] Prescott L M, Harley J P, Klein D A. 微生物学[M]. 沈萍, 彭珍荣, 译 5 版. 北京: 高等教育出版社, 2003: 628
- [2] 梁成浩. 金属腐蚀学导论[M]. 北京: 机械工业出版社, 1999: 144
- [3] Percival S L. Review of potable water biofilms in engineered systems[J]. British Corrosion Journal, 1998, 33(2): 130-137.
- [4] Percival S L, Knapp J S, Edyvean R, et al Biofilm development on stainless steel in mains water[J]. Water research, 1998, 32(1): 243-253
- [5] Gagnon G A, Slawson R M. An efficient biofilm removal method for bacterial cells exposed to drinking water[J]. Journal of Microbiological Methods, 1999, 34: 203-214
- [6] Reasoner D J, Geldreich E E. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1985, 49(1): 1-7.
- [7] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物学实验教程[M]. 北京: 北京大学出版社, 1999: 68-72
- [8] 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: 111-119
- [9] Iwamoto T, Tani K, Nakamura K, et al Monitoring impact of in situ biostimulation treatment on groundwater bacterial community by DGGE[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2000, 32: 129-141
- [10] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 150-200
- [11] Madigan M T, Martinko J M, Parker J. Brock Biology of Microorganisms[M]. 9th ed. New Jersey: Prentice Hall, 2000: 997-1005

(上接第 142 页)

[参考文献]

- [1] 李秀彬. 全球环境变化研究核心——土地利用/土地覆被变化的国际研究动向[J]. 地理学报, 1996, 51(6): 553-557.
- [2] Turner B L II, Skole D, Sanderson S, et al Land-use and Land-cover Change Science/Research Plan[R]. Stockholm: IGBP, 1995: 24-31.
- [3] 倪绍祥, 刘彦随, 张贵祥, 等. 中国东南沿海地区耕地资源保护与可持续利用[J]. 长江流域资源与环境, 1999, 8(3): 276-281.
- [4] 吴次芳, 潘文灿. 国土规划的理论与方法[M]. 北京: 科学出版社, 2003
- [5] 易丹辉. Statistica 6.0 应用指南[M]. 北京: 中国统计出版社, 2002
- [6] Fishcher G, Emoliev Y, Keyze M A, et al Simulation the socio-economic and biogeophysical driving forces of land-use and land-cover change[R]. Luxembourg: IIA SA, 1996
- [7] 国家形式网. 中华人民共和国概况: 湖南省[EB/OL]. [2006-07-01] <http://www.xingshi.org/info/864-1.htm>.
- [8] 吴宇哲, 鲍海君, 吴次芳, 等. PRED 框架下的土地利用[J]. 农业经济问题, 2004(2): 13-17.