

供水管网不同管材内壁微生物分布的显微观察

白晓慧^{1,3}, 蔡云龙², 支兴华¹, 尤佳寅¹

(1. 上海交通大学生命科学技术学院, 水质科学与工程实验室, 上海 200240; 2. 上海市自来水市南有限公司, 上海 200002; 3. 同济大学污染控制与资源化研究国家重点实验室, 上海 200092)

摘要: 采用扫描电镜、原子力显微镜以及激光共聚焦显微镜对不锈钢插片表面和供水管网末端 PPR 管内壁微生物的分布和生物膜结构进行了观察和分析. 结果表明, 在供水管网中, 不锈钢材质表面不利于微生物附着生长, 在短时间内(3 个月) 只有很少的微生物附着. 在管网末端 PPR 管表面有明显的微生物附着生长, 细菌容易附着在基底表面的凹穴中, 细菌与基底是紧密黏附在一起的. 扫描电镜和原子力显微镜结合是观察管壁非连续生长生物膜表面结构的有效手段. 采用激光扫描共聚焦显微镜可同时实现管壁生物膜内部和三维结构观察.

关键词: 供水管网; 生物膜结构; 原子力显微镜; 扫描电镜; 激光共聚焦显微镜

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)09-2555-05

Microscope Observation of the Microbial Distribution on the Wall of Different Pipe Material in Water Supply System

BAI Xiao-hui^{1,3}, CAI Yun-long², ZHI Xing-hua¹, YOU Jia-yin¹

(1. Laboratory of Water Science and Technology, School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China; 2. Shanghai Municipal Waterworks South Co. Ltd., Shanghai 200002, China; 3. State Key Laboratory of Pollution Control and Resources Reuse, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract: Scanning electron microscope, atomic force microscope and confocal laser scanning microscope were used to observe the microbial distribution and biofilm structure on the surface of stainless steel plugs and the wall of PPR pipe in the water distribution system. The results show that, it is not easy for microbial to attach on the surface of stainless steel plugs. Little bacteria was observed in a short period of time (less than 3 months). Bacteria can be easily observed in the sediment of the PPR pipe wall at the end of water supply system. Bacteria was tightly adhered to the surface of the PPR pipe wall. Combination of scanning electron microscope and atomic force microscope is a practical way to observe the surface structure of discontinuous biofilm in the pipeline. The inner and three-dimensional structure of the pipe biofilm can be simultaneously observed by confocal laser scanning microscope.

Key words: water distribution system; biofilm structure; atomic force microscope (AFM); scanning electron microscope (SEM); confocal laser scanning microscope (CLSM)

供水管网中的细菌主要是在管壁上生长形成生物膜而得以繁殖的. 生物膜是管壁结垢和腐蚀的诱因之一. 管壁结垢和腐蚀会降低管网的过水能力, 增加二级泵站的动力消耗, 引起管道的跑冒滴漏, 严重时还会造成爆管、断管事故, 直接影响供水安全. 另外, 生物膜脱落还会恶化水质, 使用户水的色度、浊度和细菌数上升, 直接威胁人体健康. 研究供水管网生物膜的结构, 可以为研究管网生物膜的功能、内部传质和不同微生物的分布提供重要依据^[1].

目前对微生物进行显微观察通常采用扫描电镜 (SEM). 扫描电镜能镜检较大的组织表面结构, 它的景深长, 1 mm 左右的凹凸不平面能清晰成像, 样品图像富有立体感. 但扫描电镜观察要预先对生物膜进行脱水, 使得整个生物膜的框架收缩, 因而很难得到生物膜原有的三维结构信息^[2,3].

原子力显微镜 (AFM) 是一种利用原子、分子间

的相互作用力来镜检物体表面微观形貌的新型实验技术. 原子力显微镜 (AFM) 能以高分辨率镜检生物膜. 除了图像, 原子力显微镜还能提供生物膜中细胞间的力的作用. AFM 测量对样品无特殊要求, 但只能观察到生物膜的外在轮廓, 而对其内部结构无法进行观察^[4~7].

激光扫描共聚焦显微镜 (CLSM) 是采用激光作为光源, 在传统光学显微镜基础上采用共轭聚焦原理和装置, 并利用计算机对所镜检的对象进行数字图像处理的一套镜检、分析和输出系统. CLSM 研究生物膜具有如下优点^[8~12]: 可以对几百 μm 厚的、无水分损失的、活的微生物群落进行镜检; 可以对镜检

收稿日期: 2008-10-13; 修订日期: 2008-12-27

基金项目: 水体污染控制与治理科技重大专项 (2009ZX07421-005); 污染控制与资源化研究国家重点实验室开放基金项目 (PCRRF07004)

作者简介: 白晓慧 (1969~), 男, 博士, 副教授, 主要研究方向为水污染控制理论与技术. E-mail: xhbai@sjtu.edu.cn

样品进行断层扫描和成像,可以无损伤地镜检和分析细胞的三维空间结构,形成彩色立体图像及计算机动画演示.它在研究和分析活细胞结构的实时动态变化过程、细胞的光学连续切片和三维结构重建等方面,大大优于传统的光学显微镜.

本研究采用扫描电镜、原子力显微镜和激光共聚焦显微镜对 2 种不同管材供水管网内壁表面附着微生物分布特征进行了观察与分析.

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验以不锈钢插片和供水管网末端直径为 40 mm 的聚丙烯随机共聚物 (polypropylene random copolymer, PPR) 管表面附着物为研究对象.其中插片采用 302 型不锈钢片,将其加工成长约 2 cm、宽 1 cm 的楔型插片,先用 10% HNO₃ 浸泡 1 d,然后在 550 ℃ 下加热 5 h,再将其插入实验室龙头前自来水管内,保持龙头长流水以供水中微生物在插片表面附着生长,在实验室内共插入 10 片插片.

1.2 样品处理及检测仪器

扫描电镜镜检:将不锈钢插片取出,处理成边长约 0.5 cm 的正方形,用无菌水冲洗 3 次,放在紫外灭菌过的超净台内自然风干.然后将插片放入在 4 ℃ 预冷的 2.5% 戊二醛中浸泡 4 h,取出后分别在 50%、70%、80%、90% 的乙醇中浸泡 30 min,在 100% 的乙醇中浸泡 1 h,取出后放在紫外灭菌过的超净台内自然风干,将样品喷金后扫描电镜镜检. PPR 管表面观察做同样处理.扫描电镜为美国 FEI 公司生产的 FEI SIRION 200.

原子力显微镜镜检:将不锈钢插片取出,用无菌水冲洗 3 次,再将插片放在紫外灭菌过的超净台内自然风干,然后进行原子力显微镜镜检.原子力显微镜为美国 Digital Instrument 公司生产的 Multimode Nanoscope IIIa,最大扫描范围 16 μm.

激光共聚焦显微镜镜检:将 PPR 管样品处理成边长约 0.5 cm 的正方形,用无菌水冲洗 3 次,放在紫外灭菌过的超净台内自然风干.然后用 0.1% 荧光素避光孵育 20 min,用无菌水冲洗 3 次后放在紫外灭菌过的超净台内自然风干,然后用激光共聚焦显微镜分别进行 X、Y、Z 3 个方向的断层扫描.图片尺寸: X: 651.5 μm; Y: 651.5 μm; Z: 111.3 μm.扫描尺寸: X: 1.27 μm; Y: 1.27 μm; Z: 2.32 μm.激光共聚焦显微镜为德国蔡斯公司生产的 META 510.

2 结果与分析

2.1 不锈钢插片表面附着微生物的显微观察

图 1 为放置不锈钢插片第 8 周后插片表面原子力显微镜平面观察图.原子力显微镜是一种对表面无需处理的原位显微观察方法,但每次观察扫描范围很小(16 μm),欲对插片上微生物分布进行观察,需不断改变扫描区域.经过近 1 h 观察,插片表面有明显的沉积物附着,但只观察到很少的细菌形态,没有发现连续的菌落生长.

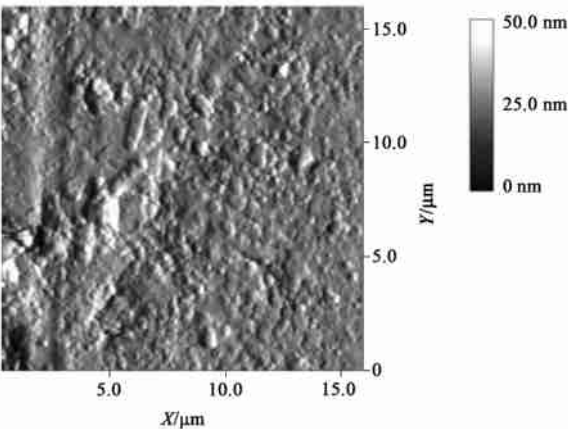


图 1 不锈钢插片表面原子力显微镜观察结果
Fig. 1 Surface observation of the stainless steel plug by AFM

为了验证原子力显微镜观察结果,在插片插入后的第 9 周,取出 1 片插片,用无菌水冲洗 3 次,然后用灭过菌的脱脂棉擦拭插片表面.将脱脂棉放入灭过菌的具塞三角瓶中,将灭菌水倒入三角瓶,用漩涡振荡仪振荡 10 min,同时将灭菌脱脂棉直接放入灭过菌的具塞三角瓶中,加入灭菌水作为阴性对照.将灭菌脱脂棉放入灭过菌的具塞三角瓶中,加入自来水作为阳性对照.分别取 1 mL 上述 3 种样品,每个样品平行取 3 次,采用 R₂A 培养基 27 ℃ 培养 7 d 计数,结果如表 1.由计数结果可知,经过冲洗后插片上几乎没有剩余细菌生长,说明此时不锈钢插片上没有紧密地附着细菌.

由于原子力显微镜观察每次扫描范围很小,为

表 1 不锈钢插片表面异养菌培养计数结果/CFU·mL⁻¹
Table 1 HPC on the stainless steel plug surface/CFU·mL⁻¹

次数	无菌水	插片	自来水
1	3	3	126
2	3	2	147
3	1	4	158
平均值	2	3	144

了便于观察,对于放置 12 周后插片表面又进行了扫描电镜观察,如图 2. 可以看出,在第 12 周时,不锈

钢插片表面仍然很难观察到紧密附着的,形成微菌落的生物膜存在.

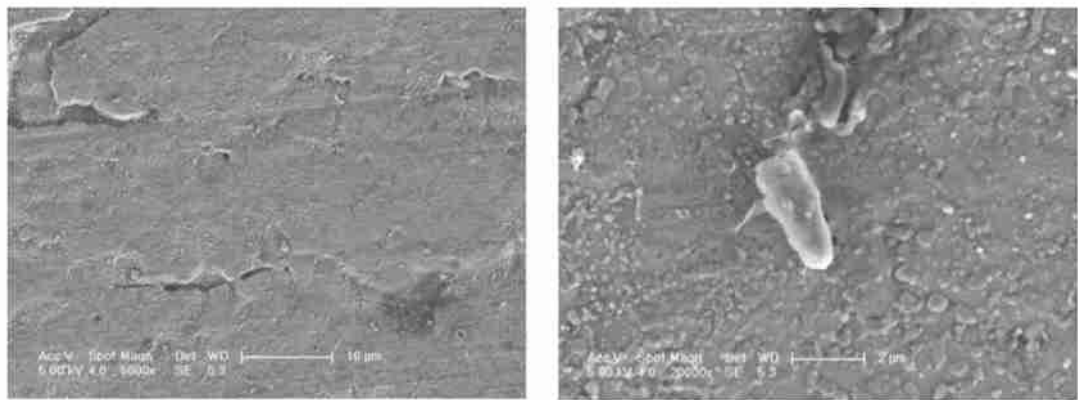


图2 第 12 周不锈钢插片扫描电镜观察结果
Fig. 2 Surface observation of stainless steel plug by SEM in 12th week

从插片的原子力显微镜观察,培养检测以及扫描电镜观察都得出相似的结论,即在贫营养条件下,不锈钢表面不利于微生物的附着生长,在短时间内(3 个月)难以形成微菌群,只有少量的单个细菌附着.

2.2 PPR 管表面生物膜结构观察

图3 是管网末端 PPR 管表面附着物扫描电镜

观察结果. 可以清晰地观察到 PPR 管管壁附着物的表面形貌和细菌的生长分布. 长期使用的管网末端 PPR 管内壁细菌附着较多,且多分布在基底表面的凹穴中,很少有细菌附着在突起的表面. 细菌之间靠胞外多聚物连接形成微菌落^[13~17],细菌与基底是紧密黏附在一起的.

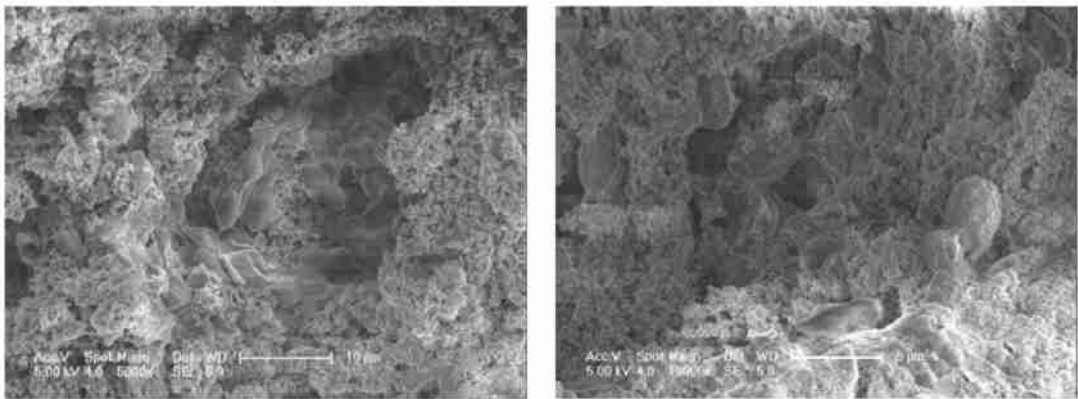


图3 PPR 管表面附着物扫描电镜观察结果
Fig. 3 Surface observation of sediment in PPR pipe by SEM

为了观察 PPR 管表面附着物的内部结构,采用激光共聚焦显微镜对 PPR 管样品进行了观察,其断层扫描及三维重组结构和厚度如图 4、图 5 所示.

由图 4、图 5 可以看出,PPR 管表面附着物结构较复杂,主要由分布不均的细胞、基质和孔隙组成. 在水平和 Z 轴方向微生物均呈非均匀分布,表面和基底呈现高低或凹凸变化,其密度也不均匀,在基底和附着物顶端微生物分布较少. 附着物中有着丰富

的空隙,有的贯穿整个生物膜,使其中细菌生长所需的营养成分可能通过这些空隙到达,同时通过这些孔隙也可以将微生物代谢产物带出孔隙进入悬浮水中或到达附着物与管壁界面,对管壁材料产生破坏作用^[18~20]. 所有这些也反映供水末端管网水质较差,微生物生长较普遍,而当末端采用一般钢管、镀锌管等金属管材时,由微生物诱导的腐蚀也更严重,导致龙头黄水或红水的发生.

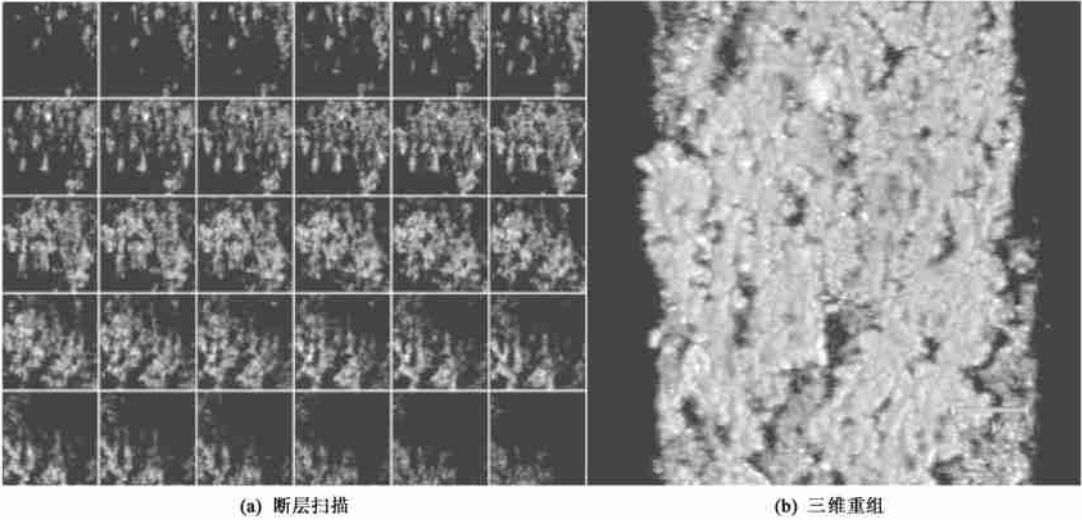


图 4 PPR 管表面附着物激光共聚焦显微镜断层扫描及三维重组图

Fig. 4 Fault scanning and three dimensional recombination of the PPR pipe sediment by CLSM



图 5 PPR 管表面沉积物激光共聚焦显微镜 Z 向扫描图

Fig. 5 Vertical section scanning of the PPR pipe sediment by CLSM

3 结论

(1) 在供水管网中, 不锈钢材质表面不利于生物膜的附着生长, 在短时间内(3 个月以内) 不能形成成片生物膜, 只有少量单个的微生物附着。

(2) 在管网末端 PPR 管表面有明显的微生物附着生长, 细菌容易附着在基底表面的凹穴中, 细菌与基底是紧密黏附在一起的。

(3) 扫描电镜和原子力显微镜结合是观察管壁非连续生长生物膜表面结构的有效手段。扫描电镜可较快观察到表面生长的微生物分布, 但样品预处理复杂, 很难得到原有结构信息。原子力显微镜不适于直接观察管壁非连续生长微生物, 与扫描电镜结合可较快实现管壁生物膜表面轮廓观察。

(4) 结合扫描电镜和原子力显微镜观察, 采用激光扫描共聚焦显微镜可同时实现管壁生物膜内部和三维结构观察。

参考文献:

[1] 白晓慧, 周斌辉, 朱斌, 等. 上海市供水管网内生生物膜的微生物特征分析[J]. 中国给水排水, 2007, 23(11): 105-108.

[2] Garrett T R, Bhakoo M, Zhang Z B. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces[J]. Progress in Natural Science, 2008, 18: 1049-1056.

[3] Kaminskyj S G W, Dahms T E S. High spatial resolution surface imaging and analysis of fungal cells using SEM and AFM [J]. Micron, 2008, 39: 349-361.

[4] 石万良, 谢志雄, 沈萍. 原子力显微镜在微生物学领域的应用[J]. 微生物学通报, 2004, 31(1): 109-113.

[5] 葛小鹏, 汤鸿霄, 王东升, 等. 原子力显微镜在环境样品研究与表征中的应用与展望[J]. 环境科学学报, 2005, 25(1): 5-16.

[6] 鲁哲学, 张志凌, 庞代文. 原子力显微镜技术及其在细胞生物学中的应用[J]. 科学通报, 2005, 50(12): 1161-1166.

[7] Fang H P, Xu L, Zhang T. Study of Marine biocorrosion using AFM and molecular techniques[J]. 电化学, 2003, 9(2): 165-169.

[8] 王荣昌, 文湘华, 钱易. 激光扫描共聚焦显微镜用于生物膜研究[J]. 中国给水排水, 2003, 19(12): 23-25.

[9] 霍霞, 吕建勋, 杨仁东, 等. 激光共聚焦显微镜与光学显微镜之比较[J]. 激光生物学报, 2001, 10(1): 76-79.

[10] 姬亚昆. 激光共聚焦扫描显微镜及其在牙菌斑生物膜研究中的应用[J]. 国际口腔医学杂志, 2006, 33(4): 281-283.

[11] 周泽渊, 倪龙兴, 吴补领, 等. 用激光共聚焦显微镜研究菌斑生物膜的结构[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2001, 11(3): 152-153.

[12] 叶联华, 黄云超, 杨达宽, 等. 聚氯乙烯材料表面细菌生物膜

- 结构观察[J]. 生物医学工程与临床, 2007, **11**(4): 251-254.
- [13] 胡涛, 葛剑平, 徐蓉蓉, 等. 粘液放线菌生物膜结构中细菌和胞外多糖关系的初步研究[J]. 四川大学学报(医学版), 2006, **37**(2): 180-182.
- [14] Ren T T, Liu L, Sheng G P, *et al.* Calcium spatial distribution in aerobic granules and its effects on granule structure, strength and bioactivity[J]. Water Research, 2008, **42**: 3343-3352.
- [15] Sheng X X, Ting Y P, Pehkonen S O. The influence of ionic strength, nutrients and pH on bacterial adhesion to metals[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2008, **321**: 256-264.
- [16] Adav S S, Lee D J, Tay J H. Extracellular polymeric substances and structural stability of aerobic granule[J]. Water Research, 2008, **42**: 1644-1650.
- [17] Ivnitsky H, Katz I, Minz D. Bacterial community composition and structure of biofilms developing on nanofiltration membranes applied to wastewater treatment[J]. Water Research, 2007, **41**: 3924-3935.
- [18] McLean J S, Majors P D, Reardon C L. Investigations of structure and metabolism within *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms[J]. Journal of Microbiological Methods, 2008, **74**: 47-56.
- [19] Tian J Y, Liang H, Li X. Membrane coagulation bioreactor (MCCR) for drinking water treatment[J]. Water Research, 2008, **42**: 3910-3920.
- [20] Doumche B, Galas L, Vaudry H. Membrane foulants characterization in a drinking water production unit[J]. Food and Bioproducts Processing, 2007, **85**(C1): 42-48.