

Research on the Formation Law of Microbial Membrane and Biological Blockage in Bioremediation System

Xiaoqing Zhong¹ Bailiang Ye² Meizi Quan² Xiaomin Fang³

1. Guangzhou Nansha Modern Agricultural Industry Group Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong, 511466, Chian

2. Guangzhou Institute of Advanced Technology, Guangzhou, Guangdong, 511466, Chian

3. Guangzhou Nansha Mingzhu Agricultural Development Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong, 511466, Chian

Abstract

In the process of bioremediation, microbial clogging often occurs, which reduces the flow rate and affects the remediation efficiency. In nature, large amount of microorganisms live in pores. Biofilm formation in limited pore spaces were investigated in this research. In inoculated sand columns, in 1250~2000um and 9um pores, velocity keeps constant. In 30~500um pores, velocity decreases to 0%~17%. In 500~1000um and 19~38um pores, velocity decreases to 15%~64%. SEM images show more biofilms bridging in comparably bigger pores (70~200um) than in smaller pores (20~65um). Dominant bacteria have a larger proportion (55%) in mesh-120 than that in mesh-400 (42%). The abundance in *Enterobacter* (mesh-120) is twice as much in mesh-400. Extracellular polysaccharide is an important component of extracellular polymeric substances (EPSs) and provide structure of the biofilms. On the first day after inoculation, extracellular polysaccharide in mesh-120 (0.138 mg) was 1.81 times that of mesh-400 (0.076 mg).

Keywords

biofilm formation; porous media; biological remediation; bioclogging; extracellular polysaccharide

生物修复系统中生物淤堵与的微生物膜形成规律研究

仲晓晴¹ 叶柏良² 全梅仔² 方晓敏³

1. 广州南沙现代农业产业集团有限公司, 中国·广东 广州 511466

2. 广州先进技术研究所, 中国·广东 广州 511466

3. 广州南沙明珠农业发展有限公司, 中国·广东 广州 511466

摘要

在生物修复过程中, 微生物淤堵问题时有发生, 使渗流速度降低从而影响修复效率。本课题对有限孔隙空间中的微生物生长规律进行了研究。在孔隙为1250~2000um和9um的接种多孔介质中, 水流速度不变; 在孔隙为30~500um的接种多孔介质中, 微生物膜使流速降低83%~100%; 孔隙为500~1000um和19~38um, 水流速度降低到初始的15%~64%。SEM图像显示, 在相对较大的孔(70~200um)中架桥的生物膜比小孔(20~65um)中多。多孔介质孔隙度大小影响微生物的群落结构。在120目介质上, 优势细菌的比例(55%)高于400目介质(42%)。肠杆菌属(120目)的丰度是400目介质上的两倍。接种后第一天, 120目介质(0.138mg)上附着的胞外多糖含量是400目介质(0.076mg)的1.81倍。

关键词

生物膜形成; 多孔介质; 生物修复; 微生物堵塞; 胞外多聚物

1 引言

生物修复技术具有处理效果好、投资和运行成本低等

【基金项目】中国博士后科学基金《多孔介质中微生物的生长特性及其在人工湿地系统中的应用》(项目编号: 206890号); 深圳市科学技术创新委员会《多孔介质微生物淤堵机理与稳定性研究》(项目编号: 第SY59403号)。

【作者简介】仲晓晴(1983-), 女, 中国吉林四平人, 博士, 从事农业环境修复、生物修复、设施雾培种植、植物提取、植物修复等研究。

优点。但在修复过程中, 由于微生物在多孔介质孔隙中的生长繁殖和代谢活动, 使得孔隙率变小, 渗流受阻, 修复效率降低甚至失效的过程被称为微生物淤堵。这种现象广泛存在于地下水污染原位修复、人工湿地、中水微灌和滴灌、反渗透和垃圾填埋场排水等系统。

微生物生长会影响多孔材料的渗透性, 表现为渗透率降低、弥散度增加和优先流的出现^[1]。然而, 细菌细胞的体积仅占孔隙体积的不到1%, 胞外聚合物(EPS)被认为是生物淤堵的主要贡献者^[2]。EPS主要由多糖、蛋白质和DNA组成^[3]。Vandervivere和Baveye^[4]从他们的实验中得出结论, 只有黏液状EPS会导致渗透率降低, 而不是胶囊

状 EPS, 生物膜会形成桥接孔隙的空间结构。

传统研究侧重于培养皿或固体表面上细菌纯培养物的形态。但在自然界中, 大多数细菌生活在如土壤、沉积物和河床等多孔环境中。论文观察了不同尺寸孔隙的多孔介质中微生物的微观结构, 并测量了胞外多糖的变化, 以期探索多孔环境中的生长特征和生存策略。

2 材料和方法

2.1 多孔介质微生物淤堵模拟柱实验

将 50mL 注射器分别用 0#、3#、4#、5#、6#、7#、8# 和 9# 石英砂均匀包装压实, 模拟一维多孔介质。填充后过水流量为 0.039ml/min, 平均流速 $v=Q/A=0.00384\text{cm/s}$ 。

将砂注灭菌后, 将 250mL 菌液注入。使用恒定水头容器(图 1) 供应营养液, 保持恒定水头。每天测量流速两次。实验在 25°C 的恒温下运行。

混合菌液培养: 收集生活污水, 取上清液用液体培养基培养细菌。液体培养基 (MM) 由 20g/L 葡萄糖、1.0g/L NaCl、1.0g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 组成; 0.5g/L 磷酸二氢钾、2.65g/L 磷酸二氢钠、12H₂O、0.73g/L 硫酸镁·7H₂O; 0.2g/L 氯化钙; 以及 0.67mL 微量元素 (1g FeSO₄·7H₂O、0.32g CoCl₂·6H₂O、0.2g ZnSO₄·7H₂O、0.04g CuSO₄·5H₂O、0.2g NiSO₄·6H₂O、0.1g MnCl₂·4H₂O、0.025g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 和少量 H₃BO₃)。将培养基的 pH 值调节至 7.4~7.6。

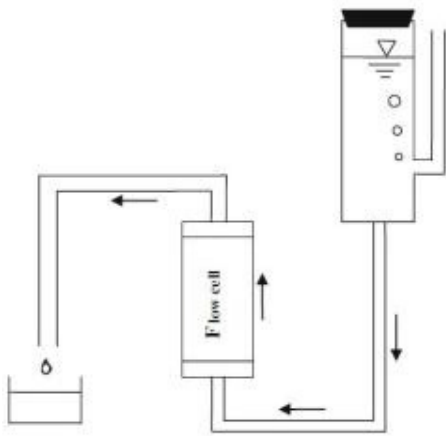


图 1 微生物对多孔介质渗流影响的实验装置

2.2 微生物膜观察实验

使用 400 目(孔隙尺寸: 20um × 200um)、350 目(25um × 80um)、300 目(40um × 55um)、250 目(65um × 85um)、200 目(70um × 95um)、180 目(90um × 120um)、150 目(100um × 130um) 和 120 目(200um × 200nm) 等不同目数尼龙材料模拟多孔介质, 将其灭菌后固定在 5cm 亚克力柱中, 并接种菌液 (OD₆₀₀=1.51)。以 3mL/min 的速度垂直连续供应灭菌液体培养基 (MM, 稀释 20 倍)。培养 7 天后取出晾干, 在扫描电镜 (Phenom XL, 功率 300W, 分辨率 14nm) 下观察。

DNA 提取和测序: 采用基因提取、PCR (通用引物) 和 16s rDNA 测序技术分析 120 和 400 目介质上的微生物种群分布。

EPS 提取、胞外多糖和胞内多糖测定: 将接种培养的 120 目和 400 目介质每天各取出 1 片, 浸泡在 50mL 离心管(含 10mL PBS) 中, 超声 (16kHz) 30 分钟, 220rpm 水平振荡 15min, 5000g 离心 15 分钟, 测量上清液的 600OD。上清液以 0.22um 膜滤器过滤, 其中有机化合物为 LB-EPS, 其多糖为胞外多糖。向菌液中加入 10mL PBS, 16kHz 超声 30 分钟, 取出 0.22um 的膜。细胞破碎后, 测定胞内多糖。采用蒽酮-硫酸分光光度法测定多糖含量。

3 结果和讨论

3.1 砂柱中微生物的生长

菌液接种对多孔介质渗流速度的影响如下: ①速度在 30~45um 孔隙中下降最快(柱 7#, 速度在 41h 降至 0cm/s)。②在 45~500um 的孔隙中(柱 4#、柱 5# 和柱 6#), 速度降到初始值的 0%~17%。③在 500~1000um 和 19~38um 的孔隙中(柱 3# 和柱 8#), 速度降至初始值的 15%~64%。④ 1250~2000um 和 9um 孔隙中的速度保持不变(柱 0# 和柱 10#)。

3.2 单层多孔介质的 SEM 观察

SEM 观察结果如图 2 所示。在相对较大的孔隙(孔径 70~200um 之间)中观察到更多生物膜桥接结构。在相对较小的孔隙(孔径 20~65um 之间)中观察到的微生物膜较少。

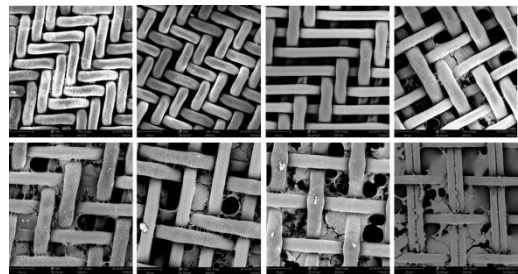


图 2 不同孔隙尺寸的多孔介质上微生物膜的 SEM 图像

注: 第一行: 400、350、300 和 250 目介质; 第二行: 200、180、150 和 120 目介质。

图 3a 为接种后第 7 天无细菌粘附的生物膜, 细胞仅在膜的两端固体表面。图 3b 为接种后第 9 天细菌由 EPS 桥的迁移。这表明, 细菌可通过自身形成的 EPS 架桥结构进行迁移, 以进行空间的延展。孔隙中的桥接结构与传统生物膜中细胞嵌入 EPS 内部的生物膜完全不同。

图 4a 描述生物膜形成一般过程, ①浮游细胞在固体表面的可逆粘附; ② EPS 分泌和细胞单层引起的不可逆粘附; ③分层生物膜(多层细胞); ④成熟的生物膜。在无限空间内, 细菌生长沿着二维固体表面向水平方向延展, 细菌细胞嵌入 EPS 基质中, 呈蘑菇形(抛物线形), 主要功能是加

强对固体表面的粘附、保护内部的细菌细胞，将分散的细胞粘合成聚集体。图 4b 描述了有限孔隙（有限三维空间）中生物膜的形成过程：①浮游细胞的可逆粘附；②二维延展形成单层细胞并分泌 EPS。③细菌垂直于表面向远离表面方向延伸，形成 EPS 桥接结构，功能是结构支撑、空间延展和营养捕获。④细菌细胞通过 EPS 迁移。

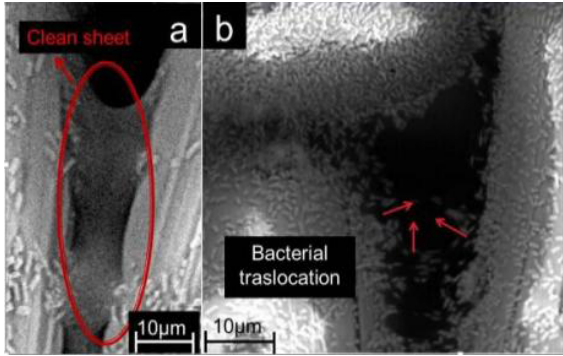


图 3 微生物在胞外多聚物（EPS）架桥结构中的转移

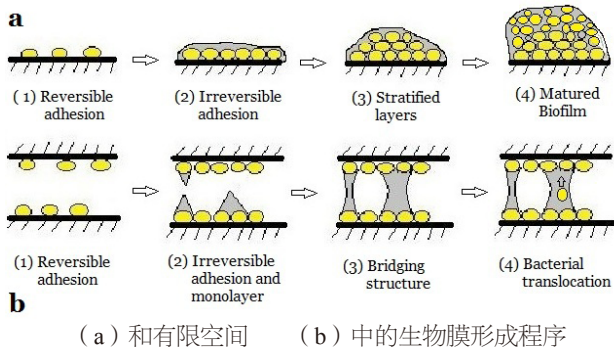


图 4 无限空间与有限空间中的微生物生长规律及微生物膜结构

3.3 细菌群落分析

由 16S-DNA 结果得知，在 120 目介质中，优势细菌占比 55%，高于 400 目介质（42%）。肠杆菌（120 目介质）的丰度是 400 目介质中的 2 倍。孔隙尺寸影响菌落种群之间的竞争。Foster^[5] 提出，生物膜形成是利用营养物质分泌提供胞外公共物品，而非自我生长繁殖。生物膜的形成减缓细胞繁殖速度，但对取得物种竞争优势有利。

3.4 细胞外和细胞内多糖含量

胞外多糖和胞内多糖含量如图 5 所示。

左图为胞内多糖含量，右图为胞外多糖含量。第一天，120 目介质中的胞外多糖（0.138mg）是 400 目介质（0.076mg）的 1.81 倍。初始阶段，大孔内胞外多糖分泌多，利于形成桥接结构微生物膜的支撑骨架。400 目介质的胞外多糖含量

相对平稳。第 6 天，400 目介质中的胞外多糖含量超过 120 目介质。

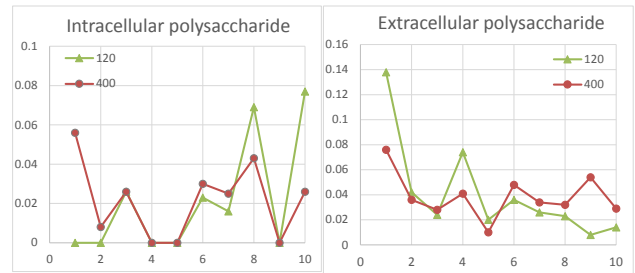


图 5 不同孔隙尺寸的多孔介质中细菌胞外多糖与胞内多糖浓度

4 结论

在孔隙为 1250~2000µm 和 9µm 的介质中，微生物对流速无显著影响。在 30~500µm 的孔隙中，微生物生长对流速影响最大，流速降至接种前的 0%~17%。在 500~1000µm 和 19~38µm 的孔隙中，速度降至 44%~64%。SEM 图像显示，70~200µm 的孔隙中有架桥结构的微生物膜比在 20~65µm 的孔隙中多。接种后第一天，120 目介质中的胞外多糖含量（0.138mg）是 400 号介质（0.076mg）的 2 倍。在 120 目介质中优势细菌占比（55%）高于 400 号介质中优势菌占比（42%）。

参考文献

- [1] Yang, GuiqinLin, JunZeng, et al. Extraction and characterization of stratified extracellular polymeric substances in Geobacter biofilms[J]. *Bioresource Technology: Biomass, Bioenergy, Biowastes, Conversion Technologies, Biotransformations, Production Technologies*, 2019(276).
- [2] Limoli, Dominique H, C. J. et al. Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function[J]. *Microbiology Spectrum*, 2015(3).
- [3] Katharine Z. Coytea, Herve' Tabuteau, Eamonn A. et al. Microbial competition in porous environments can select against rapid biofilm growth[J]. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 2016:161-170.
- [4] Philippe Vandevivere, Philippe Baveye. Effect of bacterial extracellular polymers on the saturated hydraulic conductivity of sand columns[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992(58):1690-1698.
- [5] Carey D. Nadell, Knut Drescher, Kevin R. Foster. Spatial Structure, Cooperation, and Competition in Biofilms[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016(14):589-600.