

## 再生水中弗氏柠檬酸杆菌生物膜特性研究\*

张 静 李 进\*\* 王开强 孟小然

(北京交通大学市政与环境工程系, 北京, 100044)

**摘 要** 从使用再生水的某电厂冷却塔粘泥中分离出一株具有硫酸盐还原功能的弗氏柠檬酸杆菌. 利用扫描电子显微镜(SEM)和能谱仪(EDS)对再生水中HSn70-1A和BFe30-1-1两种合金表面弗氏柠檬酸杆菌生物膜结构和成分进行表征,结果表明HSn70-1A成膜特性好于BFe30-1-1,两种合金表面生物膜中C、O等无机元素含量较大、基体金属元素含量下降较为明显. 对不同时刻合金表面生物膜胞外聚合物(EPS)组分进行分析,多糖与蛋白质含量之比揭示出,在第3天和第7天两个关键期EPS的疏水性能对微生物膜的致密性和完整性产生重要影响,实验结果表明在两个关键期内HSn70-1A显示较好的疏水性能,使其比BFe30-1-1表现出较强的耐微生物腐蚀性能.

**关键词** 弗氏柠檬酸杆菌, 微生物腐蚀, 生物膜特性, 胞外聚合物, 硫酸盐还原菌.

城市污水经深度处理后回用于工业循环冷却水系统是解决我国北方地区水资源危机的重要途径之一. 同自然界淡水相比,再生水中的含盐量、有机物含量、氨氮含量高,细菌种群复杂,由此带来的微生物腐蚀问题十分突出<sup>[1]</sup>. 大量的研究及运行资料表明,硫酸盐还原菌(Sulfate-reducing bacteria, SRB)作用引起热交换器金属管材的微生物腐蚀是影响火电厂安全运行的潜在隐患. 本课题组在研究再生水中SRB对合金材料腐蚀影响过程中,从使用再生水作为循环冷却水系统补充水的华北某电厂冷却塔底的粘泥中分离出一种同样具有硫酸盐还原功能的弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)菌株<sup>[2]</sup>. 弗氏柠檬酸杆菌是一类常存在于粪便中,能引起尿道感染、菌血症、婴儿脑膜炎和其它的肠外感染的肠道杆菌,呼吸类型为兼性厌氧,呈革兰氏阴性<sup>[3]</sup>. 目前,国内外对弗氏柠檬酸杆菌的研究主要集中在酶工程、食品卫生学、预防医学、重金属吸附等方面<sup>[4-6]</sup>,而关于再生水中弗氏柠檬酸杆菌对金属材料的腐蚀机理研究鲜有报道.

弗氏柠檬酸杆菌寄生附着在合金表面并形成生物膜是引起微生物腐蚀和生物污损的前提. 不同合金表面生物膜结构特性和生物膜中胞外聚合物(Extracellular polymeric substances, EPS)组分与合金腐蚀的产生和发展有很大关系. Fang等<sup>[7]</sup>应用原子力显微镜对细胞、细胞之间、细胞周围基质表面粘附力进行了测试,认为粘附力大小与EPS组分有关.

本文利用SEM、EDS探讨再生水环境中,HSn70-1A和BFe30-1-1两种铜合金表面弗氏柠檬酸杆菌生物膜结构特征,采用紫外分光光度法测试不同铜合金表面生物膜中EPS主要组分,试图解析EPS组分与微生物膜结构之间的关系. 研究结果对于进一步深入了解微生物膜形成及其胞外聚合物对合金腐蚀作用机理具有重要意义.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验菌种来源于使用再生水作为循环冷却水系统补充水的华北某电厂冷却塔底的粘泥,经分离、纯化后使用. 弗氏柠檬酸杆菌的培养采用调整过的Postgate C培养基<sup>[8]</sup>,其组成为:1 g·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl, 2 g·L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1 g·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.5 g·L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1 g·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 乳酸钠酵母膏 1 g·L<sup>-1</sup>, Vc 0.3 g·L<sup>-1</sup>,用去离子水溶解,用HCl或NaOH调节pH值于7.0—7.2,灌装后在高压蒸汽锅121℃下灭

2010年12月20日收稿.

\* 河北大唐国际张家口热电有限责任公司基金(CX10001)资助.

\*\* 通讯联系人, Tel:010-51684391; E-mail:jinli@bjtu.edu.cn

菌 20 min,将半胱氨酸盐酸盐  $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  和抗坏血酸  $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  在紫外灯下灭菌 30 min.

实验所用合金材料为冷却水系统热交换器常用的HSn70-1A和 BFe30-1-1 两种铜合金. 将材料加工成  $\phi 10 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$  圆形试样片,用 200<sup>#</sup>、360<sup>#</sup>、2000<sup>#</sup> 水洗砂纸逐级打磨后,丙酮除去表面油,再用无水乙醇清洁表面后干燥,置于干燥器内备用. 使用前将其置于紫外灯下照射 30 min 灭菌.

实验所用的水为华北某电厂使用的再生水原水经过 3 倍浓缩之后形成的水,其水质分析如表 1.

表 1 实验所用水样的水质分析

Table 1 Analysis of the water used in the experiment

类型	pH	电导率/ ( $\mu\text{m}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	$\text{Cl}^-$ / ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$\text{SO}_4^{2-}$ / ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	钙硬 / ( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	总硬 / ( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$\text{COD}_{\text{Cr}}$ / ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$\text{NH}_4^+$ / ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	碱度 / ( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )
再生水	8.25	2430	290.5	439.3	5.02	7.27	99.6	2.7	2.35

## 1.2 实验方法

将备好的试片浸泡于接种了弗氏柠檬酸杆菌的再生水中,密封后,置于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  恒温箱中培养. 于不同时间取出试片,用乙醇溶液进行逐级脱水处理(50%、70%、80%、90%、95% 各 10 min,100% 的乙醇中脱水 30 min),待其自然干燥 24 h 后,再置于 JSM-6510A 型扫描电镜下(日本电子公司)进行表面形貌分析和表面成分的能谱分析.

采用甲醛-NaOH 法<sup>[9]</sup>提取 EPS. 首先配制  $\text{pH} = 7$  的缓冲溶液:2 mmol  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ,4 mmol  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,9 mmol  $\text{NaCl}$ ,1 mmol  $\text{KCl}$ . 在不同时间取出浸泡于含弗氏柠檬酸杆菌的再生水中的铜合金试片,用经紫外线消毒的刷子将试片表面的微生物膜刷入 50 mL 缓冲溶液中. 在含微生物膜的缓冲溶液中加入 0.3 mL 36.5% 的甲醛,在  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下搅拌 1 h 后,加入 50 mL  $0.04 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaOH,以  $300 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  的速度搅拌 1 h;以 6000 g 在  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下离心 10 min,用  $0.22 \mu\text{m}$  微孔滤膜过滤,而后在  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  透析(3500 Dalton)24 h 提纯,得到的溶液待测.

利用苯酚-硫酸比色法<sup>[10]</sup>测定胞外聚合物中的多糖含量,考马斯亮蓝(Coomassie Brilliant Blue)法<sup>[11]</sup>测定其蛋白质含量.

## 2 结果与讨论

### 2.1 合金表面生物膜结构表征

微生物膜是环境中的微生物以非常复杂的相互作用方式附着在金属表面而形成的,微生物膜与金属界面形成了一个不同于本体溶液的特殊环境,其中发生着诸多物理的、化学的、及生物的复杂反应. 当金属表面存在微生物膜时,金属表面/微生物膜界面的 pH 值、溶解氧浓度、有机和无机物的种类及其浓度改变了腐蚀的机理和速率<sup>[12]</sup>.

从热力学自发倾向性考虑,微生物在金属表面的附着过程是一个高度自发的过程. 图 1 和图 2 分别为 HSn70-1A 和 BFe30-1-1 试片浸泡于接种弗氏柠檬酸杆菌的再生水中,于不同时间取出在扫描电子显微镜下的表征结果. 可以看出,浸泡初期,弗氏柠檬酸杆菌首先以单个细菌的形式附着于合金表面,随后逐步形成小型菌落,进一步形成较为疏松的生物膜,并且随着其生命代谢活动不断产生代谢产物和腐蚀产物,生物膜面积逐渐增大,直至将试片表面大部分区域覆盖,而形成的生物膜分布并不均匀,厚度也不一.

图 1 显示未浸泡时,HSn70-1A 试片比较光滑;1 d 后,铜合金表面附着有少量的单个弗氏柠檬酸杆菌和大分子物质、悬浮颗粒物,并且出现少数细菌聚成团,形成一些小的菌落;随着浸泡时间增加,菌落面积不断扩大,并伴随胞外聚合物的产生,3 d 时细菌处于对数期,新陈代谢十分旺盛,HSn70-1A 试片表面微生物群落像蘑菇般扩展形成空间结构异相的微生物膜,但此时生物膜的完整性和致密性不高;7 d 后微生物膜层较厚,致密性较好,同时微生物膜新陈代谢过程中产生了大量的代谢产物,此时合金表面已经形成了由一个细菌代谢产物与金属腐蚀产物杂合而成的复杂膜层,14 d 时这层复杂膜更为严实,阻挡了溶液中  $\text{Cl}^-$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$  等侵蚀性因子与合金基体间的接触,从而一定程度上减缓了合金的腐蚀;21 d

时膜的完整性仍然较好,并未出现明显的膜层脱落现象.

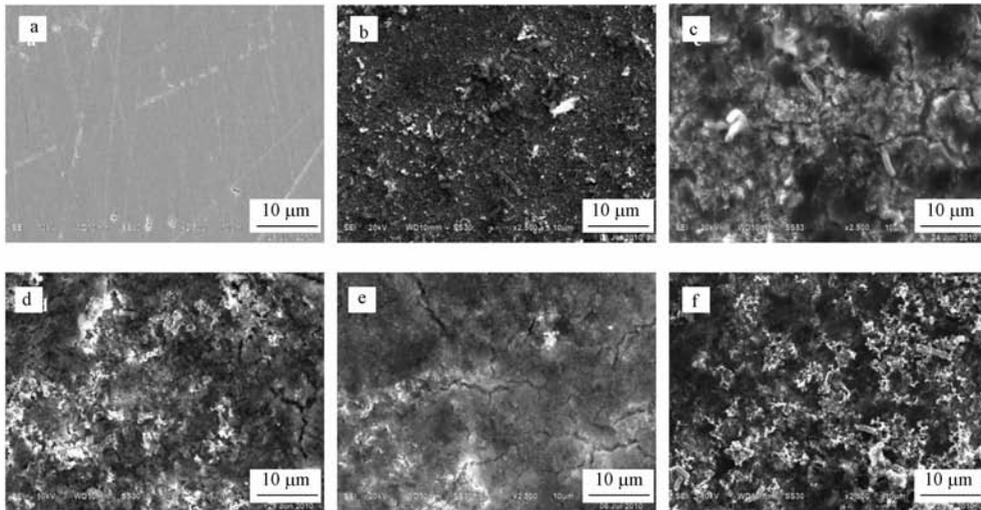


图1 浸泡于再生水中不同时间的HSn70-1A表面生物膜SEM表征( $\times 2500$ )  
(a、b、c、d、e、f分别表示合金的浸泡时间为0 d、1 d、3 d、7 d、14 d、21 d)

Fig.1 SEM photographs of biofilms on the surface of HSn70-1A immersed for different time period in reclaimed water with *Citrobacter freundii*  
(a, b, c, d, e, f denote respectively the immersion time 0 d, 1 d, 3 d, 7 d, 14 d, 21 d)

图2反映了接种弗氏柠檬酸杆菌的再生水中 BFe30-1-1 试片表面生物膜的结构特征. 浸泡1 d, BFe30-1-1 试片表面附着的细菌及颗粒物比同期的HSn70-1A表面少. 3 d时 BFe30-1-1 表面的膜层已较厚,但细菌在其表面所形成的生物膜覆盖层厚度分布及其结构不均匀,腐蚀产物的局部堆积现象较为明显,这很可能导致形成富氧区和贫氧区,形成氧浓差电池,易造成孔隙和缝隙腐蚀<sup>[13]</sup>. 另外微生物的新陈代谢产物和腐蚀产物向外扩散也同样被阻止,进一步形成局部浓度差异池. 浸泡7 d时 BFe30-1-1 表面生物膜层局部出现裂痕,甚至裸露出基体表面,14 d、21 d时膜层出现了严重的板结现象,发生裂痕的面积逐步扩大,此时膜层的完整性和致密性比较差,不仅使生物膜丧失了一定的保护作用,且使得局部腐蚀比较严重.

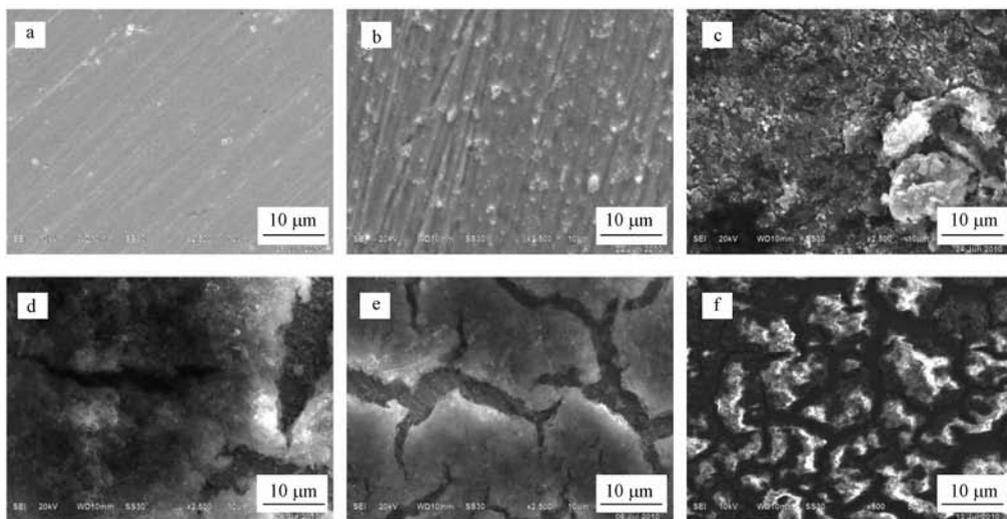


图2 浸泡于再生水中不同时间的BFe30-1-1表面生物膜SEM表征( $\times 2500$ )  
(a、b、c、d、e、f分别表示合金的浸泡时间为0 d、1 d、3 d、7 d、14 d、21 d)

Fig.2 SEM photographs of biofilms on the surface of BFe30-1-1 immersed for different time period in reclaimed water with *Citrobacter freundii*  
(a, b, c, d, e, f denote respectively the immersion time 0 d, 1 d, 3 d, 7 d, 14 d, 21 d)

图 1 和图 2 对比发现,两种铜合金表面生物膜的形成过程及其结构特征表现出显著的差异性. 3 d—7 d 时,HSn70-1A 表面的生物膜层的完整性、致密性明显好于 BFe30-1-1,生物膜的保护作用稍强. 14 d 以后,HSn70-1A 表面生物膜依然较为完整,合金表面几乎被膜层完全覆盖,未出现明显的膜层脱落现象,而 BFe30-1-1 表面则发生了明显的膜层裂痕,甚至出现大面积的板结现象,基体裸露现象较为严重,这不仅增加了 BFe30-1-1 基体与溶液中侵蚀性离子接触的面积和几率,且由于膜的均匀性较差,局部出现浓度极差,加剧了 BFe30-1-1 的腐蚀.

再生水环境下,弗氏柠檬酸杆菌在 HSn70-1A 和 BFe30-1-1 两种合金表面生物膜形成的差异性主要原因可能与两种合金所含主要的金属元素有关.一方面,微生物膜在一个洁净的表面吸附需要一个诱导期,在诱导期内水体中溶解态的有机物和无机物被吸附到材料表面,可能因为 BFe30-1-1 合金添加了 Mn、Ni 等元素,影响了诱导期内溶解态有机物和无机物与合金表面的吸附、附着过程.另一方面,微生物膜形成及细菌代谢过程中产生了大量的有机产物,其中多糖、蛋白质、氨基酸、脂类物质可能与 Mn、Ni 等离子发生了络合作用,影响了生物膜结构、膜内传质过程等.更深层次的作用机理有待进一步探索.

## 2.2 合金表面生物膜能谱分析

图 3 为两种铜合金试片浸泡 7 d 后生物膜能谱分析图.在能谱图上可以看到,HSn70-1A 合金表面沉积物中显示出较高的 Cu、Zn 元素的峰,BFe30-1-1 表面表现出较高的 Cu 元素峰.两种合金表面的能谱图中均表现出明显的 S 元素峰,而两种试片中原本均不存在 S 元素,由于弗氏柠檬酸杆菌具有硫酸盐还原功能,与传统的 SRB 类似,可能铜合金表面腐蚀产物中主要为铜的硫化物.同时,能谱图中 C、O、P 等无机元素比较明显,反映出生物膜层中产生了大量的有机物质.

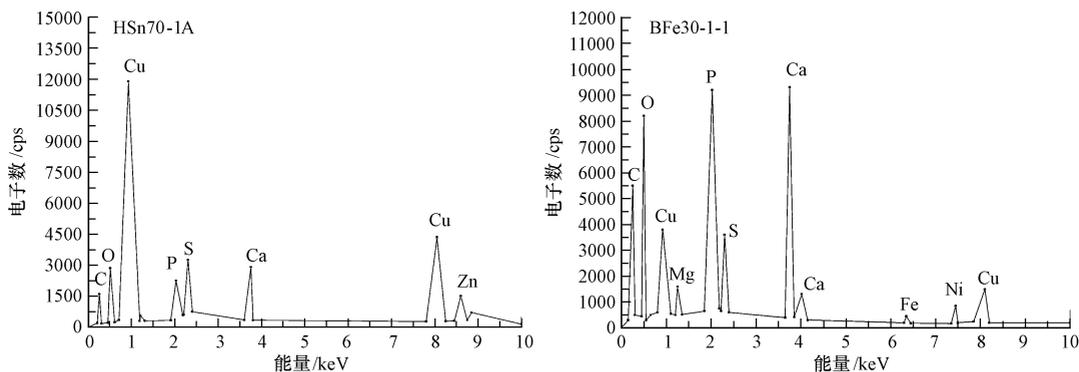


图 3 浸泡 7 d 时两种合金表面生物膜能谱分析

Fig. 3 Energy spectrum analysis of the biofilms on the surface of the two alloys immersed for 7 days

表 2 列出了浸泡于接种弗氏柠檬酸杆菌的再生水环境中不同时间(0 d、3 d、7 d、14 d)铜合金表面生物膜中元素分析结果.总体上看,随着浸泡时间增加,生物膜中合金基体主要金属元素(Cu、Zn、Ni)含量(mass%)均有不同程度的下降,O、S、P 等元素含量显著上升,反映出生物膜主要成分为 O、S、P 等元素构成的化合物,其组成十分复杂,更准确的说是由溶液中的悬浮颗粒、细菌及其新陈代谢过程产生的各种有机和无机代谢产物组成的混合物.对比发现,BFe30-1-1 表面生物膜中 C、O 元素含量百分比明显高于同期的 HSn70-1A,可能的原因是 BFe30-1-1 合金表面微生物代谢活动较强.

另外,2 种合金表面生物膜中都出现了 Ca、Mg、P 等元素,这极有可能是由于水中硬度较高,膜内出现了结垢现象,进而可能使合金局部产生垢下腐蚀.由此看来,再生水回用于冷却水系统时不仅会带来微生物腐蚀,且由于水中盐类成分较高,易形成污垢和结垢,进一步加剧金属材料的腐蚀.

## 2.3 生物膜中 EPS 组分分析

前文对弗氏柠檬酸杆菌在铜合金表面形成生物膜的结构特性进行了研究,而结构特性与生物膜的组分密切相关.微生物膜由细胞生物量和 EPS 组成,其中细胞生物量仅是生物膜中有机物质的微小部分,而 70%—90% 的总有机碳存在于细胞外<sup>[14]</sup>.EPS 主要来源于细菌的分泌、细菌表面物质的脱落、细菌溶解以及对周围环境物质的吸附,具有复杂的化学成分,其中多糖和蛋白质是其最重要的组成成分.采用甲醛-NaOH 法提取不同时刻 HSn70-1A 和 BFe30-1-1 两种铜合金表面生物膜中 EPS,并利用考

马斯亮蓝法分析 EPS 中蛋白质含量,用苯酚-硫酸法分析多糖含量. 其分析结果如图 4 所示.

表 2 不同时期 HSn70-1A 和 BFe30-1-1 生物膜 EDS 分析结果 (mass%)

Table 2 EDS analysis results of biofilms from HSn70-1A and BFe30-1-1 at different times (mass%)

元素	HSn70-1A				元素	BFe30-1-1			
	0 d	3 d	7 d	14 d		0 d	3 d	7 d	14 d
C		20.1	18.43	19.75	C		28.58	28.38	24.51
O		4.35	12.51	16.03	O		4.17	34.99	23.31
Mg		0.75	0.86	1.22	Mg			1.22	1.16
Si				0.16	Si		0.10	0.25	0.22
P		1.63	2.97	4.99	P		0.41	7.51	6.93
S		1.28	1.33	3.32	S		2.24	2.75	4.08
Ca		1.62	3.90	6.48	Ca		0.10	10.56	10.17
Cu	69.00	48.10	43.59	36.24	Cu	64.45	45.63	9.62	22.36
Zn	30.16	17.66	15.59	11.51	Ni	34.30	17.93	3.63	5.51
As	0.04				Fe	0.95	0.73	0.95	1.56
Sn	0.80	0.71	0.82	0.31	Mn	0.30	0.46	0.13	0.20
Total	100	100	100	100	Total	100	100	100	100

图 4a 为生物膜中 EPS 蛋白质含量. 可以看出,两种合金表面生物膜中 EPS 组分的蛋白质含量在弗氏柠檬酸杆菌生长周期内出现较大波动. 在 3 d 时 HSn70-1A 蛋白质含量最大,为  $178.75 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ , 随后急剧下降,7 d 和 14 d 有小幅上升,而后又逐渐下降,28 d 时含量已经下降到  $5.25 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . BFe30-1-1 试片生物膜中蛋白质含量比同期的 HSn70-1A 普遍要高,5 d 时含量达到最大值,为  $270.5 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ , 14 d 左右出现第二个小波峰,蛋白质含量为  $144.75 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ , 随后逐渐下降,28 d 时含量为  $14.5 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ .

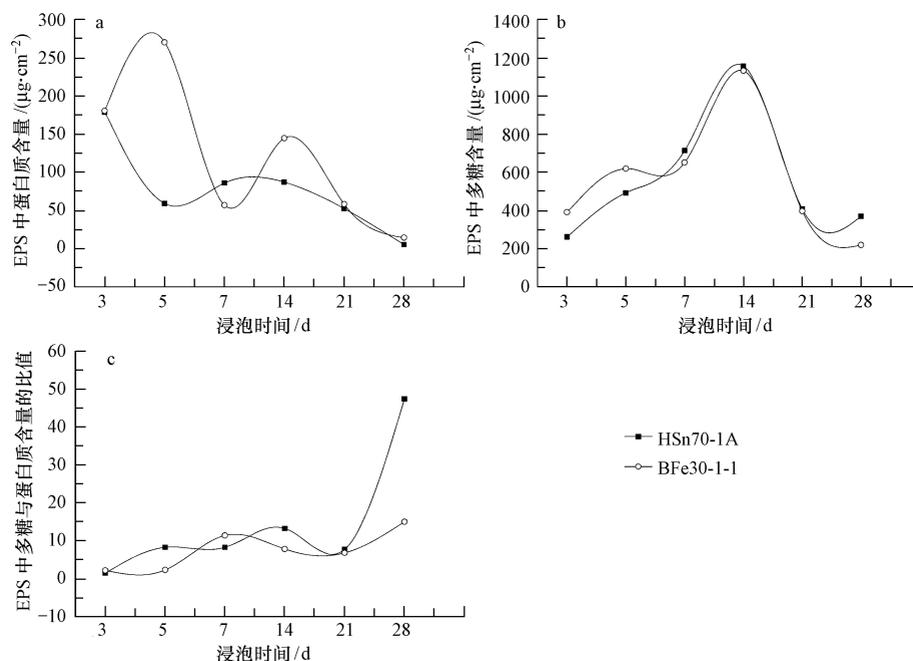


图 4 铜合金表面生物膜中 EPS 组分分析

(a 为蛋白质含量, b 为多糖含量, c 为多糖与蛋白质含量比值)

Fig. 4 Analysis of EPS contents in the biofilms on the surface of copper alloy

(a for the protein content, b for the polysaccharide content, c for the ratio of polysaccharide to protein content)

图 4b 为不同时刻两种铜合金表面生物膜中 EPS 多糖含量. HSn70-1A 和 BFe30-1-1 变化趋势基本一致,含量先逐渐增加,至 14 d 时出现最大值,含量为  $1130\text{—}1155 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ , 随后随时间推移多糖含量急剧下降. 前期含量增加主要是因为细胞进入对数期后细胞新陈代谢十分旺盛,代谢产物积累较多,稳

定期时开始出现细胞分解,胞内物质溶出使得 EPS 中碳水化合物含量急剧上升.而当细菌进入衰亡期后,细胞进入内源呼吸期,胞外聚合物中的碳水化合物成为此时细菌的主要营养源,从而导致多糖含量下降较快.两者区别在于 BFe30-1-1 在生物膜形成初期(5 d 前)含量稍高于 HSn70-1A,但后期(21 d 后)则恰好相反.另外,多糖含量绝对值远远高于同期的蛋白质含量.

EPS 中蛋白质和多糖的绝对含量大小一定程度上反映了生物膜层的厚度或细胞生物量大小等特性,而多糖与蛋白质含量的比值则与金属机体腐蚀程度可能存在着某种对应的关系.不同基质条件对于生物膜 EPS 组成及含量有较大影响<sup>[15]</sup>. EPS 的显著特性——疏水性受疏水基和水的极性影响,多糖和蛋白质含量比例对 EPS 的亲疏水性能有显著影响. Wrangstadh 等<sup>[16]</sup>发现,在批式研究中,饥饿状态的细胞由于疏水 EPS 碳水化合物的释放而疏水性较低,10 h 后当 EPS 碳水化合物被内源呼吸消耗后,疏水性上升. Jorand 等<sup>[17]</sup>研究表明, EPS 蛋白质促成了生物体的疏水性能,而碳水化合物则促成生物体的亲水性,即 EPS 的组成和含量会影响生物絮体的疏水性. Rosenberg 等<sup>[18]</sup>发现疏水性能促进微生物粘附于石油表面,进行生长发酵,实验结果说明疏水性能增进微生物细胞表面的粘附性.

图 4c 中为不同时刻铜合金生物膜 EPS 中多糖与蛋白质含量的比值,可以看出,随着时间推移, HSn70-1A 和 BFe30-1-1 两者 EPS 中多糖与蛋白质比值呈现震荡变化,但整体呈上升趋势,说明 EPS 的疏水性能下降较为显著,反映出微生物膜细胞表面粘附性降低.

从图 4c 中可以看出, BFe30-1-1 的比值在 3—5 d 维持在 2.1—2.3 之间,而 HSn70-1A 的比值由 3 d 的 1.45 急剧上升到 5 d 的 8.28. 到第 7 天时, HSn70-1A 的比值为 8.28, BFe30-1-1 为 11.4. 7 d 后 HSn70-1A 的比值都高于 BFe30-1-1. 数据反映出 3 d 和 7 d 时刻 HSn70-1A 表面生物膜中 EPS 的疏水性能较好. 生物膜中 EPS 疏水性能在 3 d 和 7 d 时表现比较特殊,很可能由于两个时刻铜合金表面 EPS 疏水性能的大小影响合金表面成膜整体过程,最终影响微生物结构的完整性及致密性等特性.

从前文的 SEM 表征结果可以看出,1—3 d 铜合金表面生物膜结构变化十分显著,很可能是微生物膜形成的关键期, BFe30-1-1 表面生物膜的完整性、均匀性均差于同期的 HSn70-1A. 主要原因可能是在成膜关键期(3 d 时) HSn70-1A 的疏水性能好于 BFe30-1-1,微生物细胞的粘附性更强,有助于细胞及其周围的胞外聚合物吸附更多物质. 微生物粘附于金属表面形成的多孔胶状细胞外周质高分子物质影响金属/微生物膜界面附近液体的流动,使金属/微生物膜/液体界面溶解氧分布及电解质扩散复杂化,同时构成 EPS 的高分子对微生物膜的结构完整性起主要作用. 在 3—5 d 内 HSn70-1A 表面生物膜较强的疏水性能,由于 EPS 捕获界面的金属离子和腐蚀产物,使膜结构的完整性进一步增强;同时 EPS 中凝胶状分子易降低金属/微生物膜界面间溶解氧、电解质及腐蚀产物扩散速度<sup>[19]</sup>,使膜内物质传质过程一定程度上受阻,使微生物膜起到了屏障作用,阻挡了膜外溶液中侵蚀性因子介入金属/微生物膜界面内,进而有助于减缓对金属基体的腐蚀. 因而分析得出,第 3 天是弗氏柠檬酸杆菌在铜合金表面形成微生物膜的关键期,膜的初期构造已经形成,这个时段 EPS 的疏水性能对生物膜的结构起着“根基”作用,一定程度上决定着后续膜的形成和发展.

另一个关键点出现在第 7 天,在此时刻主要是微生物膜的修缮阶段. 完整而致密的生物膜对于金属基体的腐蚀程度具有十分重要的作用. 生物膜的致密程度直接反应了膜层“屏障”功能的好坏. 7 d 后生物膜内的细菌开始处于内源呼吸时期, HSn70-1A 表面 EPS 在此阶段表现出较强的疏水性能,有助于 EPS 吸附水环境中较多的细菌及其它介质来补充局部受损的生物膜部分,以增加膜的面积和膜层厚度,使膜的完整性和致密性进一步增强,这使得合金基体几乎被生物膜层所覆盖. 相反,此刻 BFe30-1-1 表面生物膜的修缮功能较弱,局部疏松、残缺的膜层得不到完善,使合金表现出较差的耐腐蚀性能.

尽管 14 d 后, BFe30-1-1 的疏水性能要好于 HSn70-1A,甚至在 28 d 时,其 EPS 中多糖与蛋白质比值约是 HSn70-1A 的 1/3. 但由于成膜关键期微生物膜的“根基”不牢固,修缮阶段的功能不突出,使得后期微生物膜结构完整性表现较差,导致了 BFe30-1-1 耐腐蚀性差于 HSn70-1A.

通过以上 EPS 组分分析实验及前文生物膜的微观结构表征结果,可以推断出 EPS 疏水性能在微生物膜形成过程的两个关键期对于微生物膜结构完整性具有十分重要的影响. 在浸泡初期(第 3 天), HSn70-1A 具有较好的疏水性能有利于微生物膜“根基”结构的形成,对膜结构的后续发展影响较大;在浸泡中期(第 7 天),较好的疏水性能有助于 EPS 捕获溶液中合金腐蚀产物、细菌及其代谢产物,修复局

部残缺、受损的膜层,使生物膜的完整性、致密性、均匀度进一步增强.而 BFe30-1-1 在这两个关键期的 EPS 疏水性能较差,影响了微生物膜结构的完整性,导致其耐微生物腐蚀性能较差.

弗氏柠檬酸杆菌在金属表面附着、吸附成膜是一个复杂的过程,影响因素众多,如再生水水质、环境条件、金属材料性质、胞外聚合物等.本文的研究从微生物膜结构及其 EPS 中蛋白质和多糖组分含量方面入手,对比分析 HSn70-1A 和 BFe30-1-1 两种铜合金生物膜结构特性、EPS 组分对合金腐蚀的影响.然而,就生物膜中 EPS 而言,组分十分复杂, EPS 中的多糖、蛋白质、脂类、核酸及其它物质所含的主要官能团与金属表面溶解出的金属离子间络合作用机理,金属/生物膜界面传质过程及其对金属的腐蚀影响目前仍不清楚,有待后续进一步深入研究.

### 3 结论

(1) SEM 表征结果表明,弗氏柠檬酸杆菌在 HSn70-1A 合金表面形成微生物膜结构的完整性、致密性好于 BFe30-1-1,成膜的差异性可能与合金中某种或某几种金属元素有关.

(2) 能谱分析反映出随着浸泡时间增加,合金表面生物膜中 C、O、P 等无机元素含量增大,Cu、Zn、Ni 等合金基体金属元素含量下降比较显著,且 Ca、Mg 元素含量稍有增加,说明再生水回用不仅带来微生物腐蚀问题,而且易出现结垢,可能导致垢下腐蚀.

(3) 对不同时刻铜合金生物膜 EPS 组分进行分析, EPS 中多糖与蛋白质含量比值揭示出, EPS 疏水性能在微生物膜形成过程的两个关键期对于微生物膜结构完整性产生重要影响.在浸泡初期(第 3 天), HSn70-1A 具有较好的疏水性能有利于微生物膜“根基”结构的形成,对膜结构的后续发展影响较大;在浸泡中期(第 7 天),较好的疏水性能有助于 EPS 捕获溶液中合金腐蚀产物、细菌及其代谢产物,修复局部残缺、受损的膜层,使生物膜的完整性、致密性、均匀度进一步增强.而 BFe30-1-1 在这两个关键期的 EPS 疏水性能较差,影响了微生物膜结构的完整性,导致其耐微生物腐蚀性能较差.

### 参 考 文 献

- [ 1 ] 孙心利.城市污水再生水回用于电厂循环水的系统腐蚀及防护措施[J].中国电力,2007,40(6):28-31
- [ 2 ] Zhang Jing, Li Jin, Wu Chuan, et al. *Citrobacter freundii* on corrosion behavior of HSn70-1A in reclaimed water[ C ]. The International Conference on E-Product, E-Service and E-Entertainment(ICEEE2010), 2010, Vol 8:5309-5314
- [ 3 ] R. E. 布坎南, N. E. 吉本斯.中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组译.伯杰细菌鉴定手册(第八版)[M].北京:科学出版社,1984:390-391
- [ 4 ] Meenakshi Chandel, Wamik Azmi. Optimization of process parameters for the production of tyrosine phenol lyase by *Citrobacter freundii* MTCC 2424[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(5): 1840-1846
- [ 5 ] Khorasani G, Salehifar E, Eslami G. Profile of microorganisms and antimicrobial resistance at a tertiary care referral burn centre in Iran: Emergence of *Citrobacter freundii* as a common microorganism[J]. Burns, 2008, 34(7):947-952
- [ 6 ] 杨晶. 柠檬酸杆菌吸附重金属铀的试验研究[J].中国给水排水, 2009, 25(23):66-68
- [ 7 ] Fang Herbert H P, Chan Kwong-Yu, Xua Li-Chong. Quantification of bacterial adhesion forces using atomic force microscopy (AFM)[J]. Journal of Methods Microbiological, 2000, 40(2):89-97
- [ 8 ] Postgate J R. The Sulfate Reducing Bacteria [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1984:102-108
- [ 9 ] Liu Hong, Herbert H, Fang P. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges[J]. Journal of Biotechnology, 2002, 95(3):249-256
- [ 10 ] 张龙翔,张庭芳.生化实验方法和技术[M].北京:高等教育出版社,2005:1-3
- [ 11 ] 李建武等.生物化学实验原理和方法[M].北京:北京大学出版社,2000:174-176
- [ 12 ] Evans T E, Chart A, Skedgell A N, et al. The colored film on stainless steel[J]. Trans Inst of Metal Finish, 1972, 51(3):108-112
- [ 13 ] de Beer Dirk, Stoodley Paul, Roe Frank, et al. Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport[J]. Biotechnology and bioengineering, 1994, 43(11):1131-1138
- [ 14 ] John A, Nilsen P H. Cell biomass and exopolymer compositions in sewer biofilm[J]. Wat Sci Tech, 1998, 37(1):17-24
- [ 15 ] 李久义,左华,栾兆坤,等.不同基质条件对生物膜细胞外聚合物组成和含量的影响[J].环境化学,2002,21(6):546-550
- [ 16 ] Wrangstadh M, Conway P L, Kjelleberg S. The production and release of an extracellular polysaccharide during starvation of a marine *Pseudomonas* sp. and the effect thereof on adhesion[J]. Appl Microbiol, 1986, 145(1/4):220-227
- [ 17 ] Jorand F, Bou-Bigne F, Block J C, et al. Hydrophobic/hydrophilic properties of activated sludge exopolymeric substances[J]. Wat Sci

Tech, 1998, 37(4/5): 307-315

- [18] Rosenberg E, Legman R, Kushmaro A, et al. Oil bioremediation using insoluble nitrogen source[J]. Journal of Biotechnology, 1996, 51(3):273-278
- [19] Little B, Wagner P, Mansfeld F. Microbiologically influenced corrosion of metals and alloys[J]. Inter. Materials Reviews, 1991, 36(6): 253

## STUDY ON THE CHARACTERISTIC OF *CITROBACTER FREUNDII* BIOFILM IN RECLAIMED WATER

ZHANG Jing    LI Jin    WANG Kaiqiang    MENG Xiaoran

(Department of Municipal and Environmental Engineering, Beijing Jiaotong University, Beijing, 100044, China)

### ABSTRACT

A strain of *Citrobacter freundii* with sulfate-reducing function was isolated from the sludge at the bottom of cooling tower in a power plant using reclaimed water. Scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive spectrometry (EDS) were employed to investigate the characteristics of the biofilm formed on the surface of HSn70-1A and BFe30-1-1 in reclaimed water. The results show that the characteristics of biofilm-forming for HSn70-1A was better than BFe30-1-1. In biofilm the contents of C, O and other inorganic elements were relatively high, while the contents of matrix elements significantly decreased. The components of extracellular polymer substances (EPS) in the bio-film formed on the surface of copper alloy at the different time were analyzed. Differences in the ratio of polysaccharide to protein revealed that the 3<sup>rd</sup> day and 7<sup>th</sup> day were two critical periods for the formation of biofilm. During these two periods, EPS from HSn70-1A showed better hydrophobic properties than EPS from BFe30-1-1, which made HSn70-1A more resistant to microorganism corrosion.

**Keywords:** *Citrobacter freundii*, microbiologically induced corrosion, biofilm characteristics, extracellular polymer substance (EPS), sulfate-reducing bacteria (SRB).