

给水塑料管材生物稳定性快速评价方法的建立与运用

文 刚, 黄廷林

(西安建筑科技大学环境与市政工程学院, 陕西 西安 710055)

摘要: 给水塑料管材的生物稳定性直接影响供水水质。建立了评价饮用水塑料管材生物稳定性的新方法(BioMig), 并使用该方法评价了典型塑料管材的生物稳定性。该方法主要由迁移实验、生物膜形成实验、病原菌形成潜能和毒性评价组成。该方法具有操作简单、易于推广、灵敏度高、重现性好等优点。研究表明: 管道材料 PEX-a 和 PEX-c 具有很好生物稳定性, 而密封材料 EPDM 2%却具有很高的微生物再生长潜能。除 EPDM 20%外的其它管材均能支持三种病原菌的生长, 其中 *P. aeruginosa* 比 *E. coli* O157 和 *V. cholerae* 在迁移水中具有更高的生长潜能。EPDM 20%具有很高的有机物释放潜能, 但由于其毒性作用抑制微生物在溶液及其表面生长。

关键词: 塑料管材; 生物稳定性; 测试方法

中图分类号: TU 991

文献标志码: A

文章编号: 1006-7930(2014)04-0578-05

饮用水输配过程可能会导致水质恶化, 例如部分管材会释放污染物, 如臭味^[1]、有毒有害物质^[2]或支持微生物再生长^[3]。塑料管材由于良好的抗腐蚀性和低廉的价格, 在过去 20 年被广泛用作给水管材^[4]。大多数高分子聚合物均含有有机添加剂, 如软化剂、润滑剂、抗氧化剂和稳定剂等, 而这些物质与水接触时可能会释放到水中, 一部分物质对细菌的生长具有毒害作用而另外一部分对细菌生长具有促进作用^[5-6]。对于不采用消毒剂或消毒剂浓度非常低的管网系统, 塑料管材的生物稳定性至关重要。

目前用于评价饮用水塑料管材是否适合在给水管输配中的使用, 主要基于两种测试方法: (1)塑料材料迁移到水中的物质, 通常以总有机碳(TOC)含量的高低来表示塑料材料释放有机物的潜能^[7]; (2)微生物在塑料材料表面的生长潜能, 如英国的 MDOD 方法^[8], 德国的 W270 方法^[9], 荷兰的 BPP 方法^[10]等。但这些方法都存在一些缺点, 如方法灵敏度低, 需要很长的测试时间, 很难重现等。

本研究提出了将迁移测试和生物膜形成测试两种方法同时运用于塑料管材生物稳定性的评价, 形成了目前的方法-BioMig。该方法主要包括两部分, 第一部分是迁移实验(Migration test), 用来评价塑料管材的生物稳定性和毒理学特性, 包括塑料管材释放有机物的潜能(TOC 含量)和微生物再生长的能力(AOC 含量)。第二部分是生物膜形成实验(Biomass test), 用来评价塑料管材的长期生物稳定性。BioMig 方法还可以评价管材的病原菌再生长潜能(PGP)、释放的有机物对微生物的毒理作用, 即 BioMig 方法可以根据需要进行组合。

1 实验材料与方法

1.1 测试样品的准备

以常见的几种塑料材料为研究对象, 其特性见表 1。塑料材料的清洗方式: 先用自来水冲洗表面的杂质, 然后在超纯水中浸泡 1 h, 超声波水浴中清洗 10 min, 最后用超纯

水再次进行清洗, 每个测试的塑料的表面积为 100 cm², 在 250 mL 测试瓶中进行。玻璃器皿的清洗: 首先用 0.2 M 盐酸溶液浸泡 24 h 去除无机污染物, 然后将水烘干, 最后在 500℃高温加热 2 h 去除有机污染物。实验中涉及到的塑料瓶盖、弹簧以及用于生物膜脱落实验的组件, 首先在 0.2 M 盐酸溶液中浸泡 24 h 去除无

表 1. 塑料管材的特性

Tab.1 Properties of polymeric materials in this study

材料缩写	材料全名	添加剂	样品形状	饮用水应用	是否合格
PVC-P	聚氯乙烯	增塑剂	平板 2 mm	阳性对照	否
PB	聚丁烯	无	管状和平板	管材	是
PEX	交联聚乙烯	无	管状	管材	是
EPDM 2%	三元乙丙橡胶	2%增塑剂	平板 2 mm	密封圈	是
EPDM 12%	三元乙丙橡胶	12%增塑剂	平板 2 mm	膜材料	否
EPDM 20%	三元乙丙橡胶	20%增塑剂	平板 2 mm	密封圈	否

收稿日期: 2014-02-17 修改稿日期: 2014-07-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(51308438); 教育部博士点新教师资助项目(20136120120002); 陕西省教育厅重点实验室资助项目(13JS047); 陕西省教育厅专项基金资助项目(2013JK0883)

作者简介: 文刚(1983-), 男, 博士, 讲师, 主要从事高级氧化和生物稳定性的研究。E-mail: hitwengang@163.com

机污染物,然后在过硫酸钾(100 g/L)溶液中(60℃)反应 1 h 去除有机物,最后用超纯水清洗,风干^[11]。

1.2 迁移实验

首先将测试材料清洗干净,清洗的方法是用自来水清洗材料表面,然后换超纯水用超声波清洗器清洗 10 min,倒掉该水样。在测试玻璃瓶中放入待测的材料,加入 100 mL 用 0.22 μm 滤膜过滤的 Evian 水,在 60℃ 浸泡 24 h,将第一次的浸泡液倒掉,再加入 100 mL 用 0.22 μm 滤膜过滤的 Evian 水,连续进行 7 次实验(M1-M7),每次实验结束后更换 0.22 μm 滤膜过滤的 Evian 水,每次实验结束后的水溶液(M1-M7)分别测定 TOC, AOC, PGP。每个测试样品至少需要进行 2 次重复实验。

1.3 生物膜形成实验

将清洗干净的测试材料置于 250 mL 反应瓶中,加入 100 mL 用 0.22 μm 滤膜过滤的 Evian 水,在 60℃ 浸泡 24 h,然后将第一次的浸泡液倒掉,加入 0.22 μm 滤膜过滤的 Evian 水,再加入接种液,接种液初始浓度为 1×10^4 cells/mL,在 30℃ 中培养 2 周。实验结束后,需要测定液相中和材料表面的细菌总量,以及溶出到水体中的有机碳(DOC)含量。生物膜形成实验中使用玻璃和 PVC-P 分别作为阴性和阳性对照,每个测试样品需要重复 2-3 次实验。

1.4 病原菌生长潜能

采用水中三种常见的病原菌(*Escherichia coli* O157, *Vibrio cholera* El-Tor 和 *Pseudomonas aeruginosa*)测定迁移到水中有机物的病原菌生长潜能(PGP)^[12]。病原菌生长潜能的测定原理和 AOC 测定一致,分别使用这三种病原菌代替了土著菌进行实验,实验中需要防止其它细菌的污染。三种病原菌在进行该实验前需要进行预培养以适应贫营养环境。三种病原菌的初始接种浓度为 1×10^3 cells/mL,在 30℃ 避光培养至稳定期(7d),用流式细胞仪测试法定量水中病原菌的数量和尺寸。

1.5 塑料材料的毒性评价

细菌能否在塑料材料的迁移溶液中或材料表面进行生长,取决于塑料材料释放的 TOC 含量和释放有机物的微生物可利用性,除碳之外其它的元素是否充足和释放的有机物的毒性决定。评价材料的毒性方法主要包括:(1)在迁移水中生长细菌的细胞膜完整性,主要采用 SYBG Green I 和 PI 联合染色,表征细菌细胞膜完整性^[13];(2)共聚焦激光扫描显微镜观察细菌的生理特性^[14]。

1.6 可同化有机碳的测定

取 20 mL 用 0.22 μm 滤膜过滤的待测水样,70℃ 灭菌 1h,冷却至室温后接种 Evian 水并加入矿物元素,天然菌的初始浓度为 5×10^3 cells/mL,在 30℃ 培养至细菌达到稳定期,用流式细胞仪测定细菌总数。在测定 AOC 过程中如果水样中有残余氧化剂,需要用无机还原剂进行终止。AOC 的浓度用统一的转换系数 1×10^7 cells/μg AOC 进行计算^[11]。

2 典型塑料管材的生物稳定性评价

2.1 迁移实验结果

迁移实验结果如图 1 所示,包括了阴性对照(玻璃)、阳性对照(PVC-P)、两种管道材料(PEX-a 和 PEX-c)和两种管道密封材料(EPDM 2%和 EPDM 20%)七次连续迁移实验的结果。在阴性对照中,随着迁移步骤进行,TOC 和 AOC 变化很小,TOC 的平均浓度为 0.18 mg/L(n=50)而 AOC 的浓度为 0.04 mg/L(n=40),在样品测试过程中,均已扣除了阴性对照的数值。除阴性对照外,其余材料随迁移步骤的进行,TOC 和 AOC 的浓度均逐渐降低。管道材料 PEX-a 和 PEX-c 释放的 TOC 浓度非常接近,但是 AOC 浓度不同,PEX-a 中仅有约 30%的 TOC 为 AOC,而对于 PEX-c 却有超过 80%的 TOC 为 AOC。此外,与 PEX-c 相比较,PEX-a 释放 TOC 的速率更加快,M7 溶液的 TOC 和 AOC 均已经接近检测限。对于这两种 PEX 材料,7 次迁移实验后其 TOC 含量均低于 0.5 mg/L,满足德国饮用水标准^[9]。EPDM 2%比 PEX 材料释放的 TOC 高 2-3 倍,有 50%的 TOC 能够被微生物利用。EPDM 20%释放更多的有机物,在相应的迁移步骤中 TOC 浓度高

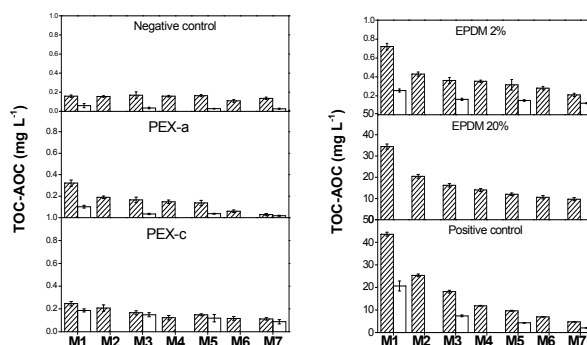


图 1 TOC和AOC连续迁移实验结果
Fig. 1 TOC and AOC in the seven migration waters

100~200 倍,但是该材料释放的有机物不能支持微生物生长.综上所述,迁移实验结果可以表征塑料材料的有机物释放潜能和微生物可利用性.

2.2 生物膜形成实验结果

迁移实验主要通过短期实验来评价材料释放的有机物特性,但并不能获得直接的生物形成潜能信息.生物膜形成实验同时决定了水溶液中的微生物形成潜能(pBPP)、材料表面的生物膜形成潜能(sBPP)及总生物膜形成潜能(BPP),还包括塑料材料迁移到水溶液中未被微生物利用的有机碳(DOC).实验结果如图 2 所示,除 EPDM 20%外,其余材料的生物膜实验结果与迁移实验结果具有非常好的一致性,PEX-a 和 PEX-c 的 BPP 均很低,而 EPDM 2%的 BPP 却相当高.测试结果可以发现,生长于材料表面的微生物(sBPP)均远高于水溶液中的微生物(pBPP).剩余 DOC 也表现出相似的规律,对于 PEX 材料,DOC 浓度非常低,仅有不到 0.5 mg/L 的有机物未被微生物利用,而 EPDM 2%却有 6.35 mg/L 的有机物残余.利用 BPP 计算 AOC 含量(使用转换系数 1×10^7 cells/ μ g),发现对于 PEX-a, PEX-c, EPDM 2%和 EPDM 20%,其迁移到水中的有机物有 92.4%, 87.4%, 81.1%和 2.4%已被微生物利用.对于 EPDM 20%,基本没有微生物生长,无论是 pBPP 还是 sBPP,其值均较低,残余的 DOC 高达 24.31 mg/L.这可能是由于释放的有机物对微生物的生长具有抑制或毒害作用.

2.3 塑料材料的病原菌生长潜能

研究测试了三种病原菌 *E. coli* O157, *V. cholera* 和 *P. aeruginosa* 在材料表面的生长潜能.材料选用了 PEX-a, PEX-c 和 EPDM 2%,由于 EPDM 20%具有毒性不支持微生物生长未进行测试,以迁移测试的 M1(第 1 次浸出液)作为测试溶液.实验结果如表 2,三种病原菌均能在这三种材料的 M1 溶液中生长. *P. aeruginosa* 比 *E. coli* O157 和 *V. cholerae* 具有更高的生长潜能,并且发现多数有机碳均能支持 *P. aeruginosa* 的生长,而仅有 20%的有机碳能够支持 *E. coli* O157 的生长,三种材料支持病原菌生长的特性也不一样,这可能是因为 *P. aeruginosa* 可利用的营养物范围更广泛. PEX-c 释放的有机物能支持更多的病原菌生长.

2.4 塑料材料的毒性评价

细胞膜的完整性通过流式细胞仪结合染料 PI 进行了检测,结果如图 3(D-F)所示.图中的右下角方框区域表示细胞膜完整细菌,而左上角方框内表示细胞膜不完整的细菌.对于 EPDM 2%和 12%,无论是水溶液还是生物膜上,均未检测到细胞膜破裂的细菌.但对 EPDM 20%,水溶液中有 $57\pm 21.2\%$ 的细菌细胞膜被破坏,而生物膜中也超过了 $45.5\pm 11.3\%$ 的细菌细胞膜不完整.为了进一步证实材料的毒性作用,通过激光共聚焦显微镜直接观察材料表面生长的微生物.实验使用不同的染色剂来表征不同的毒理作用:细菌细胞用 DAPI 进行染色(蓝色荧光)、细菌细胞膜完整性用 PI 染色(红色荧光)和胞外有机物用 WGA 进行染色(绿色荧光),结果见图 3(A-C)所示.在 EPDM 2%和 EPDM 12%的表面观察到蓝色和绿色荧光,表明在其表面的细菌活性较高,不含死亡细胞.而在材料 EPDM 20%的表面,可以发现很多黄色的细菌,这是由于红色荧光和绿色荧光的叠加,这说明材料表面含有大量的死亡细胞,这与生物膜形成实验结果相一致.

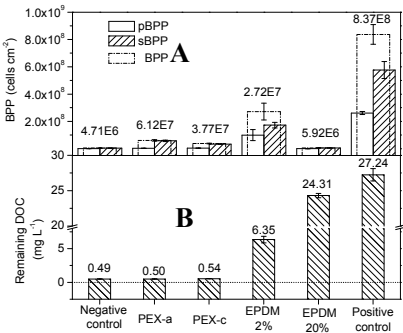


图 2 生物膜形成潜能 (A) 和剩余 DOC 含量 (B)
Fig. 2 Biomass production potential (BPP) determined with the “BioMig” assay

表 2 三种塑料材料支持病原菌生长潜能和消耗的有机物占 AOC 的比例
Tab.2 Growth potential of an estimated fraction of AOC consumed by the three pathogens on organic carbon compounds migrating from plastic materials

参数		PEX-a	PEX-c	EPDM 2%
P. aeruginosa	DOC (mg/L)	0.17	0.62	0.83
	PGP(10 ⁵ cells/mL)	1.55±0.10	8.50±0.40	6.50±0.20
	AOC 消耗 (%)	36±1.4	88±12	40.5±1.8
	PGP(10 ⁵ cells/mL)	1.35±0.10	6.30±0.88	1.80±0.01
V. cholera	AOC 消耗 (%)	26.5±1.7	42.1±3.5	16.8±0.6
	PGP(10 ⁴ cells/mL)	4.80±1.00	10.10±2.10	7.30±0.09
E. coli O157	AOC 消耗 (%)	17.8±0.4	18.8±0.6	16.9±0.3

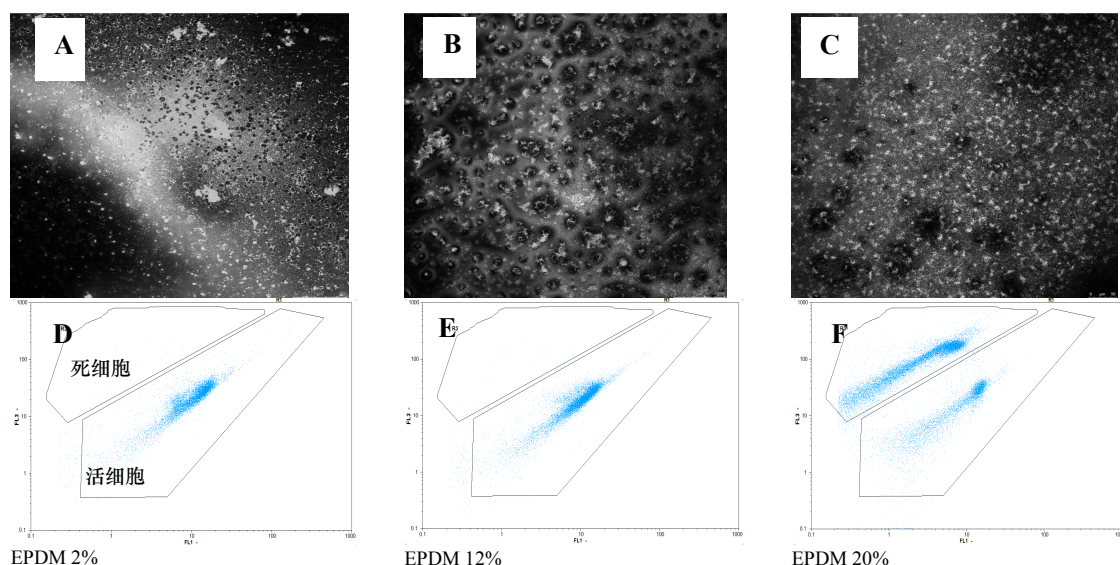


图3 A-F 三种材料对于微生物生长的活性影响

Fig.3 A-F Effect of materials on cell viability during growth on EPDM

3 测试方法的检测限与重现性

3.1 测试方法的检测限

在迁移实验中,阴性对照的 TOC 和 AOC 结果分别为 0.12-0.2 mg/L 和 0.02-0.06 mg/L;阳性对照 PVC-P 的 TOC 和 AOC 结果分别为 4.7~43.6 mg/L 和 2.1~20.6 mg/L. 在阴性对照中, TOC 和 AOC 变化很小, 阴性对照的数值表明了该方法的最低检测水平, 即 TOC 和 AOC 的最低检测范围为阴性对照的结果. 在迁移实验中, 从阴性对照到阳性对照, TOC 和 AOC 的值变化超过了 750 倍, 说明该方法具有很大的检测范围. 对于生物膜形成实验, 阴性对照和阳性对照的 BPP 分别为 4.7×10^6 和 8.4×10^8 cells/mL, BPP 的量变化超过了 190 倍. 说明 BioMig 具有很好的线性范围.

3.2 测试方法的重现性

实验结果如图 4(A)所示. 对于迁移实验, 选用 EPDM 2% M1 进行 7 次重复实验, 分别测定了 TOC、AOC 和 ATP 含量. TOC 的结果介于 0.79~0.89 mg/L 之间, 相对标准偏差为 4.7%, AOC 和 ATP 七次实验的相对标准偏差为 8.8%和 16.7%. 说明在迁移实验中, 得到的结果具有很好的重复性. 对于生物膜形成实验, 结果见 4(B), 共进行了 5 次生物膜形成实验.

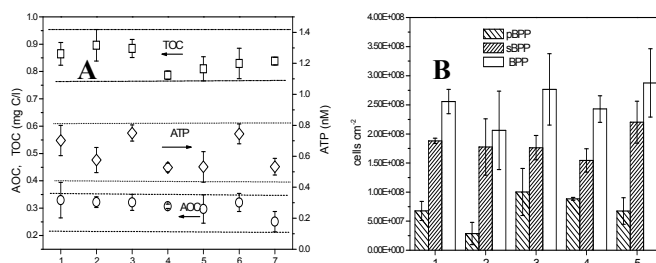


图4 迁移实验和生物膜形成实验的重现性

Fig.4 The repeatability of migration test and biomass test with the test of EPDM 2%

实验. pBPP、sBPP 和 BPP 的相对标准偏差分别为 38.6%、13.1%和 12.5%. 在现有的方法中, 如 MDOD 方法, 当 MDOD 值介于 3~5 mg/L 时, 其标准偏差<10%, 但当 MDOD 值介于 0 到 0.1 mg/L 时, 其标准偏差高达 100%^[8]. 而 W270 的标准偏差也介于 10%~40%之间^[9]. 荷兰的 BPP 方法标准偏差为 40%左右^[10]. 通过对比发现本研究开发的生物膜形成实验具有很好的重现性. 此外, 实验中还计算了 Cronbach 系数 α ($\alpha > 0.9$ 表示结果具有很好一致性), 发现迁移测试中 TOC 和 AOC 的 Cronbach 系数 α 分别为 0.97 和 0.96, 生物膜形成潜能实验中 pBPP、sBPP 和 BPP 的 Cronbach 系数 α 分别为 0.91、0.92 和 0.99, 表明 BioMig 方法具有很好的重现性.

4 结论

成功建立了 BioMig 方法, 该方法主要由迁移实验、生物膜形成实验、病原菌形成潜能和毒理评价组成. 该方法具有很好的灵敏度和重现性. 不同塑料管材释放有机物的潜能不同, 管道材料 PEX 具有很好

生物稳定性,而密封材料 EPDM 却具有很高的微生物再生长潜能。

参考文献 References

- [1] TOMBOULIAN P, SCHEWEITZER L, MULLIN K. Materials used in drinking water distribution systems: contribution to taste and odor [J]. *Water Science and Technology*, 2004, 49(9): 219-226.
- [2] BROCCA D, ARVIN E, MOSBAEK H. Identification of organic compounds migrating from polyethylene pipelines into drinking water [J]. *Water Research*, 2002, 36(15): 3675-3680.
- [3] NIQUETTE P, SERVAIS P, SAVOIR R. Impacts of pipe materials on densities of fixed bacterial biomass in a drinking water distribution system[J]. *Water Research*, 2000, 34(6): 1952-1956.
- [4] 高立新. 塑料管在市政工程中的应用 [J]. *给水排水*, 2003, 29(4): 69-72.
Gao Lixin. Application of plastic pipe on municipal engineering [J]. *Water Supply and Drainage*, 2003, 29(4): 69-72.
- [5] LEHTOLA M J, MIETTINEN I T, KEINÄNEN M M. Microbiology, chemistry and biofilm development in a pilot drinking water distribution system with copper and plastic pipes [J]. *Water Research*, 2004, 38(17): 3769-3779.
- [6] LEHTOLA M J, MIETTINEN I T, HIRVONEN A. Estimates of microbial quality and concentration of copper in distributed drinking water are highly dependent on sampling strategy [J]. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2007, 210(6): 725-732.
- [7] CEN/EN12873-1 Influence of materials on water intended for human consumption-Influence due to migration - Part 1: Test method for non-metallic and non-cementitious factory made products [S]. Brussels: European Committee for Standardization, 2004
- [8] COLBOURNE J S, BROWN D A. Dissolved oxygen utilization as an indicator of total microbial activity on non-metallic materials in contact with potable water[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 1979, 47(2): 223-231.
- [9] DVGW.W270 Research into the refinement of the DVGW code of practice W270."surface biomass of micro-organisms on materials used in drinking water supply" [S]. Bonn: DVGW, 2007.
- [10] VAN DER KOOIJ D, VEENENDAAL H R, BAARS-LORIST C. Biofilm formation on surfaces of glass and Teflon exposed to treated water [J]. *Water Research*, 1995, 29(7): 1655-1662.
- [11] HAMMES F, EGLI T. New method for assimilable organic carbon determination using flow-cytometric enumeration and a natural microbial consortium as inoculums [J]. *Environmental Science & Technology*, 2005, 39(9): 3289-3294.
- [12] VITAL M, STUCKI D, EGLI T. Evaluating the growth potential of pathogenic bacteria in water [J]. *Applied and Environmental microbiology*, 2010, 76(19): 6477-6484.
- [13] HAMMES F, EGLI T. Cytometric methods for measuring bacteria in water: advantages, pitfalls and applications [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [J]. 2010, 397(3): 1083-1095.
- [14] CHEN M Y, LI D J, TAY J H. Staining of extracellular polymeric substances and cells in bioaggregates [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 75(2): 467-474.

The establishment and application of the method for rapid assessing the biological stability of plastic pipes in drinking water

WEN Gang, HUANG Tinglin

(School of Environmental and Municipal Engineering, Xi'an Univ. of Arch. & Tech., Xi'an 710055, China)

Abstract: The biostability of plastic pipes directly affect the water quality during distribution. The present study established a new method(BioMig) to evaluate the biostability of drinking water plastic pipes, and apply the method to evaluate the biological stability of typical drinking water plastic pipes. The method comprised a migration test, biofilm formation test, pathogen growth potential and toxicity assessment, with the characterization of easily operated, world-wide spread, sensitive and reproducible. The results indicated that the two kinds of pipes PEX-a and PEX-c have a good quality and biostable, however the selected sealing material EPDM 2% could support huge bacteria regrowth on their surface and associated water. All the selected materials can support three pathogens growth (*P. aeruginosa*, *E. coli* O157 and *V. cholerae*) except EPDM 20% due to its toxic to the natural bacteria, and *P. aeruginosa* can utilize more widespread carbon released from the pipe materials than *E. coli* O157 and *V. cholera*.

Key words: plastic pipes; biostability; test method

(本文编辑 沈波)