

加氯量對自來水不鏽鋼管線生物膜生長影響的研究

蔡長憲¹ 盧重興² 李季眉² 朱振華¹

摘要

生物性污染一直是自來水配水系統二次污染最主要的問題之一，其中更以生物膜累積於管壁的問題難以解決。本研究的目的即在探討不同加氯濃度對自來水不鏽鋼管線生物膜生長的影響。研究中採用異營菌平板計數、ATP biomass、濾膜法測大腸菌以及菌種的分離及觀察等方法，評估加氯量對於管線生物膜消長的影響。

由試驗結果顯示，在異營菌計數方面，不加氯的情況下，培養 14 週後生物膜密度可達最大值 8.7×10^5 CFU/cm²；在加氯的情況下，高加氯濃度對生物膜累積的速率比低濃度慢。在 ATP biomass 方面，不加氯情況下平均生物膜形成速率為 325 ATP pg/cm²·day，低加氯濃度與高濃度試程則分別為 159 及 118 ATP pg/cm²·day。在大腸菌方面，不同加氯濃度在抑制大腸菌效果上，並無明顯差異。在菌種分離方面，生物膜中分離出的菌種種類較原水中多，且以革藍氏陰性桿菌居多。

壹、前言

依目前的淨水處理技術而言，水源經過淨水廠處理後的出流水，大都能夠符合自來水法規標準，然而民眾卻經常對飲用水質提出抱怨，主要原因常是由於自來水在輸送的過程中，受到二次污染所致。生物性污染一直是配水系統二次污染最主要的問題之一，添加餘氯即是被用來控制管線生物性污染最常見的方法。但由於管線本身很複雜，使得配水管線中經常出現微生物再生長繁殖的現象，其中更以生物膜累積與管壁的問題最難以解決。

本研究的目的即在探討不同加氯濃度對管線生物膜生長的影響，並採用多項分析方法，針對研究自來水管線生物膜發建立一套簡易、快速、合適本土性的定性與定量方法，以提供未來研究自來水微生物方面的基礎。

1 國立中興大學環境工程學系研究所

2 國立中興大學環境工程學系教授

貳、配水管線生物性污染問題

一、微生物再生長現象

自來水在流經配水管線後經常會出現水中微生物數量繁殖增加的現象，一般我們將這種情形稱之為自來水微生物再生長現象 (microbial regrowth or aftergrowth)。Brazos and O'Connor (1985) 曾針對此現象做明確的定義，其中 regrowth 是指自來水由處理廠流出後，水中部份未被消毒劑所抑制的微生物在管線中繁殖的現象；而 aftergrowth 則是指原本存在於管線中或經污染途徑進入管線的微生物，藉由適當的管線環境而繁殖的現象，但通常僅是簡單的以 regrowth 來表示自來水配水管線中微生物數量增加的情形。

二、配水系統生物膜

LeChevallier (1990) 指出，管壁上附著微生物的發生是因為水中微生物趨向於固液介面上累積所導致，這種行為在營養不足的環境中會造成一個有利於微生物生長的環境。因為在養分極低的水中，附著的微生物會產生一種胞外產物，這種胞外產物屬於一種醣類纖維 (glycocalyx)，亦是生物膜內微生物儲存養分的主要方法，提供微生物穩定的養分來源。此外，胞外產物也有助於細菌與細菌之間及細菌與表面之間的黏接，加強生物膜對表面的附著力，除能避免被水流的剪力沖走外，亦可抑制消毒劑的滲透作用，保護生物膜內的微生物免於受消毒劑的侵害。

三、加氯消毒對生物膜的影響

相較於其他消毒劑，加氯消毒的優點在於氯氣在水中可形成餘氯，使得自來水能夠在傳送的過程中依然可以保有消毒能力，維持管線中的水質。而自由餘氯水中微生物的瞬間殺菌力較強，但反應速率快，在水中會很快消耗，氯氣的優點則在於反應速率慢，可以在自來水中維持很長的消毒能力，因此對附著性微生物的控制效果較佳。LeChevallier *et al.* (1988) 的研究發現，在懸浮性細菌方面，消毒能力比較為 $\text{HOCl} > \text{Cl}_2\text{O} \gg \text{OCl}^- \gg \text{NH}_2\text{Cl}$ ；而在附著性細菌方面，明顯看出 NH_2Cl 對生物膜的抑制效果均比 HOCl 或 Cl_2O 佳。

四、生物膜生長速率指標

BFR (Biofilm formation rate) 是用以比較不同水質條件下生物膜生長能力的比較，常以 $\text{pg ATP/cm}^2\cdot\text{day}$ 或 HPC 表示生物膜的生質量生長速率或最大生質量累積量。van der Kooij *et al.* (1995) 研究發現，經過 78 天的培養後，地下水

及河水的平均 BFR 分別為 11 及 38 pg ATP/cm²·day，HPC 可達 8.9×10³ 及 2.5×10⁴CFU/cm²；而當以地下水另外添加 100 µg/l 醋酸為基質進行培養後卻發現，平均 BFR 提高至 382±30 pg ATP/cm²·day，異營菌最大密度也高達 2.5×10⁶ CFU/cm²。

參、材料與方法

一、試驗設備

本研究中的試驗設備是採取開放式連續流方式，管線主體是採用內徑 2cm 的 PVC 塑膠管，以向下螺旋 7 迴圈 (loop) 所構成，管線前端設置有餘氯注入口，用以控制進流水餘氯濃度，其設備示意圖如圖 1 所示。試驗中之生物膜培養片則採用不鏽鋼材質，單一採樣片微生物可附著總表面積約為 20.1cm²。試驗中之培養裝置設計為進出口兩端內徑大小不同，以固定採樣片。此外，相鄰兩採樣裝置設計為可拆卸式，可方便採樣，其構造示意圖如圖 2 所示。

二、試驗條件

本試驗將流速定在 10 cm/s。試驗初期採樣時間分別定為培養後 24、48、72 小時，之後採樣間隔定則延長為為一週。在不同加氯濃度方面分成不加氯、高加氯濃度(1.5~1.2 mg/l)及低加氯濃度(0.5~0.3 mg/l)二種。本實驗中所使用的水源為國立中興大學土木環工大樓所使用之地下水，並經過簡單的曝氣與過濾後，其水質監測結果如表 1 所示。

試驗前採樣片應浸泡於 95%酒精中 24 小時，再以超音波洗淨機清洗 30 分鐘，最後以鋁箔紙密封滅菌。而培養後的生物膜採樣片則以超音波洗淨機進行處理，震盪條件為連續二次 5 分鐘操作，之後取其懸浮液進行後續分析項目。

三、分析方法

本試驗中自由餘氯及總餘氯採用 DPD(N,N-diethyl-p-phenylenediamine) - 比色法測定。總異營菌計數是利用倒碟法，以 R2A agar 為培養基，每個樣品做二重複分析，培養溫度為 30°C，時間為 7 天；大腸菌類測定是利用薄膜過濾法 (membrane filter)，以 m-T7 agar 為培養基。ATP biomass count 則是以 Lumac Biocount M2010 測定，樣品體積為 100µl，萃取時間為 10 秒，發光反應時間 2 秒，積分時間 10 秒。另外，試驗中亦進行菌種分離觀察、電子顯微鏡照相及 Biolog GP/GN microplate (4.0 版) 鑑定，以了解培養生物膜中菌種的特性。

肆、結果與討論

一、總異營菌密度

(1) 不加氣試程

圖 3 為不加氣試程培養 140 天後生物膜上的總異營菌計數結果。由圖可以看出，在不添加任何餘氣的條件下，生物膜在培養 14 天後達到初步暫時性的穩定，其表面生物膜 HPC 密度可達 4.7×10^5 CFU/cm²。隨後，HPC 密度於 3 週內漸減至最低，之後再逐漸增加，並在第 7 週再度達到第二次高峰，此情形維持約 3 週後，HPC 密度再次減少至低點後再升高，且於 14 週時再達第三次穩定高點，此時之 HPC 密度為 8.7×10^5 CFU/cm²，且穩定時間連續達 4 週以上。

由上述結果得知，生物膜在不受氣抑制的情況下生長速率非常快速，僅需 1 週的時間即可累積至 10^4 CFU/cm² 以上，而生物膜生長至一定程度時會先達到暫時性的平衡，之後再逐漸減少，在整個培養過程中此現象交替出現，可以從生物膜形成的步驟來說明。

剛形成的生物膜結構分布較不均勻，且物化環境較不穩定，因此容易被水流剪力沖刷，故可從試驗結果中發現 HPC 密度會出現迅速下降的情形。結果亦可發現，此不穩定現象會隨培養時間增長，此時穩定的生物膜亦會隨之累積增厚。由此亦可推論，生物膜內的菌種關係和物化環境皆會隨時間而趨於平衡及穩定，生物膜的結構也會變得更均勻緊密。

(2) 加氣試程

圖 4 為三個不同試程培養 70 天後總異營菌計數比較結果。由圖可以看出，在加氣的條件下，生物膜中 HPC 累積的速率顯然較不加氣時慢，最大 HPC 密度也較小，但不穩定吸附現象較不明顯。在低加氣濃度時，生物膜生長至穩定需要 2~4 週，最大密度為 2.2×10^4 CFU/cm²；高濃度時則需要 4~6 週的時間，最大密度為 7.9×10^3 CFU/cm²。另外，在高加氣濃度條件下，生物膜累積的速度確實較緩慢，因此生長至穩定所需的時間也較長，但在生物膜最大密度方面，兩者的結果則很接近，且若培養時間大幅加長，則可預見加氣濃度造成的影響將愈小。

另外，在不加氣的試程中，試驗在培養第 18 週時，開始添加高濃度餘氣。由圖 3 的結果可以發現，加入氣後生物膜的 HPC 密度會立刻減低，由 8.7×10^5 CFU/cm² 減少至 3.8×10^4 CFU/cm²，但與高加氣濃度試程的最大值 (7.9×10^3 CFU/cm²) 比較，仍高出許多，此現象顯示出餘氣對於已穩定生物膜的抑制並不顯著。

由於消毒劑的效果取決於滲透機制是否完全，因此相較於全程加氣消毒，

當生物膜穩定後再開始添加餘氯，此時消毒劑通常僅能在表層附近發揮作用，而不能深入生物膜內層，故加氯後生物膜密度僅有少部份的減少。因此許多供水管線在出現微生物再生長問題後，都希望以提高餘氯濃度來解決，但獲得的效果通常是不佳的，主要原因可能是餘氯對於穩定生物膜無法發揮有效的抑制作用所導致。

二、ATP biomass。

圖 5 為不同試程培養 70 天後之 ATP biomass 結果。由結果可看出，不論是加氯或不加氯的試程，隨著培養時間增長，生物膜的 ATP biomass 皆會有逐漸上升的趨勢，而不加氯試程的最大 ATP biomass 為 14549 ATP pg/cm²，低加氯試程為 7791 ATP pg/cm²，高加氯試程為 5803 ATP pg/cm²。另外，在生物膜生長速率 BFR (最大 ATP 值/培養穩定時間) 方面，若以 49 天為培養穩定時間，則不加氯試程的平均 BFR 為 325.2 ATP pg/cm²·day，低加氯試程為 159 ATP pg/cm²·day，高加氯試程為 118.4 ATP pg/cm²·day。

整體而言，ATP biomass 的結果與 HPC 的結果類似，生物膜密度皆會隨培養時間增長而增加，但 ATP biomass 在不同加氯濃度方面的影響較不顯著。同時由結果可發現 ATP biomass 的結果增減變化很大，較異營菌計數結果的變動更為顯著，而根據推測，造成此現象的主因可能是由於 ATP biomass 分析方法的誤差。因為 ATP biomass 的分析方法靈敏度很高，主要用於食品衛生方面的微生物定量，而自來水中的微生物數量卻遠低於食品衛生方面的微生物數量，因此樣品中其他雜質對分析結果的影響相形之下顯得很大，再加上試驗使用的試劑容易變質，造成實驗的再現性不佳。

三、大腸菌類

表 2 為管線中不同試程培養 72 小時後大腸菌密度的分析結果。由表可以發現，在不加氯的試程中，大腸菌會很快地在生物膜中繁殖；在添加餘氯試程中發現，培養 24 小時內的大腸菌數量極少，但在培養 48 小時後，大腸菌則明顯開始繁殖，且不同加氯濃度在抑制大腸菌的效果上，並沒有太大的差異。整體而言，雖然餘氯的抑制作用對於水體中的大腸菌有效，但當有存活的大腸菌進入生物膜系統後，則會很快的造成繁殖。

四、菌種分離觀察

菌落分離結果在原水水樣中共分離出 4 株，不加氯試程中分離出 7 株菌，高加氯的試程中則共分離出 7 株菌，而將所有菌種簡單的分類後，總計共篩選出 8 株不同的菌種 (分別編號為 B1、B2、B3、B4、B5、B6 及 B7)。其中以革

藍氏陰性桿菌居多數，且原水中所分離出的菌種種類反而較管線生物膜中所分離出的菌種種類少，顯示管線生物膜的環境確實可提供較多樣的微生物生長。

另外，在不加氣試程的培養期間發現，培養初期菌種分布仍以 B1 及 B5 居多數，當培養時間達 12 周後，B1 比例由 30~40% 提高至 60~70%，相對地 B5 則由 30~40% 減少至 5~10%，顯示在不加氣消毒的條件下，B1 為其中較為優勢的菌種；在高加氣試程的培養期間發現，培養初期菌種分布仍以 B1 及 B5 居大多數，當培養時間達 3 周後，B5 比例則由 40~50% 大幅提高至 80% 以上，相對地 B1 則由 30~40% 減少至 5~10%，顯示不加氣消毒時 B5 為生物膜中的優勢族群。

伍、菌種鑑定

表 3 為先前分離出的 8 株菌種中，可經由 Biolog 系統鑑定出的，其中只有 3 株可鑑定出種名，其餘皆因為相似度不夠而無法採信。此外，值得注意的是 B7 這株屬於 *Bacillus* 菌，只出現在加氣的配水管線生物膜中，可見孢子確實會增加菌種對於氯的抵抗力。

六、掃描式電子顯微鏡觀察

圖 6、7、8 為不加氣條件下採樣片隨時間變化之菌相 SEM 照片。由圖可看出，培養初期採樣片上的菌種很複雜，以球菌數量為最多；在培養 2 周後，菌種則趨於簡單；經過 20 周培養後，已可以見到細菌及一些聚合物聚集的生物膜。另外，由觀察結果亦發現，不同加氯濃度對於菌相的種類及數量並無明顯的差異，且比較加氯及不加氯的觀察結果則發現，添加餘氯後，除菌種減少之外，細菌的數量亦大幅的減少，可見餘氯的抑制作用都仍存在。

伍、結論

1. 生物膜培養初期其結構及環境皆不穩定，但隨培養時間增長，生物膜會漸漸趨於穩定。
2. 高加氯濃度條件下，生物膜累積的速度較低濃度慢，生長至穩定的時間也較長。
3. 單靠添加餘氯並無法抑制管線中大腸菌的再生長，必須配合其他消毒劑，例如氯胺或控制有機營養源等方法，才可以有效地防止大腸菌的再生長。
4. 不論是否加氯，隨著培養時間增長，生物膜的 ATP biomass 皆會有逐漸上升的趨勢。

5. 管線中的生物膜提供了較多樣的生存環境，因此在生物膜中所分離出的菌種種類反而較原水中多。

陸、參考文獻

Brazos, B.J. and O'Conner, J.T. "A transmission electron micrograph survey of the planktonic bacteria population in chlorinated and nonchlorinated drinking water." *Proceedings, Water Quality Technology Conference: Advances in Water Analysis and Treatment*. Houston, TX, pp.275-305 (1985)

Gordon A.M., *Drinking Water Microbiology*, 1nd Ed., Springer-Verlag, New York, pp.249-268 (1990)

LeChevallier M.W., Cawthon C. and Lee R.G., "Inactivation of biofilm bacteria." *Appl. Envir.Microbiol.*, Vol.54, pp.2492-2499. (1988)

LeChevallier M.W. "Coliform regrowth in drinking water: a review". *J. Am. Wat. Wks Assoc.*, Vol.82, pp.74-86. (1990a)

van der Kooij, D., Veenendaal H.R., Baars-Lorist C., van der Klift D.W. and Drost Y.C., "Biofilm formation on surface of glass and teflon exposed to treated water." *Wat. Res.*, Vol.7, No.7, pp.1655-1662. (1995)

表 I 地下水水質

	地下水原水 (處理前)	進流水 (處理後)
	範圍 (平均值) N=24	範圍 (平均值) N=24
總異營菌落數 (CFU/ml)	3200-8100 (6000)	220-610 (510)
大腸菌密度 (CFU/100ml)	65-42 (54.5)	0-6 (3.2)
pH	6.85-7.10	7.01-7.51
溫度 (°C)	22.1-28.4	28.2-30.0
濁度 (NTU)	0.85-1.24	0.14-0.62
比電導度 (µs/cm)	386.2-453.6	324.1-243.2
DOC (mg/l)	1.24-1.38 (1.32)	0.65-0.70 (0.68)
有效餘氯 (mg/l)	trace	trace
硫酸鹽 (mg/l)	92.2-80.3 (80.5)	58.0-67.3 (67.0)
磷酸鹽 (mg/l)	0.32-0.41 (0.35)	1.52-1.68 (1.60)
硝酸鹽 (mg/l)	3.60-3.52 (3.56)	1.50-1.60 (1.53)
亞硝酸鹽 (mg/l)	0.011-0.012 (0.012)	0.006-0.007 (0.006)

N=總樣品數

表 2 管線中不同培養試程之大腸菌密度分析結果

平均大腸菌密度 (CFU/cm ²)			
培養時間 (小時)	不加氣試程	低餘氯試程	高餘氯試程
24	7.5	<1	<1
48	105	3	2
72	142	45	32

表 3 Biolog 系統鑑定出之菌種

編號	分類	相似度	機率	菌種名稱
B4	GN-NENT	0.558	71%	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>
B5	GP-COCCUS&ROD	0.569	100%	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
B7	GP-ROD SB	0.777	98%	<i>Bacillus cereus thuringiensis</i>

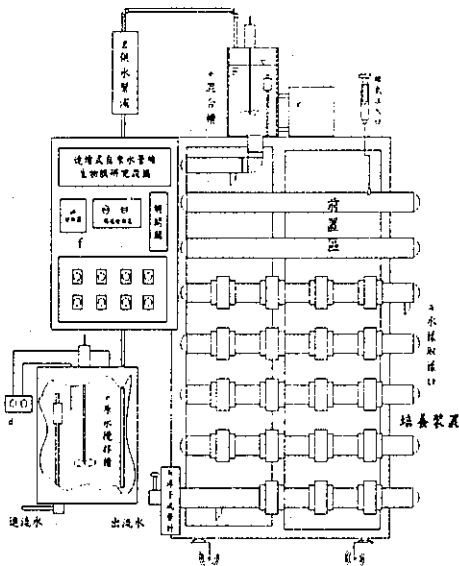


圖 1 連續式配水管線試驗設備圖

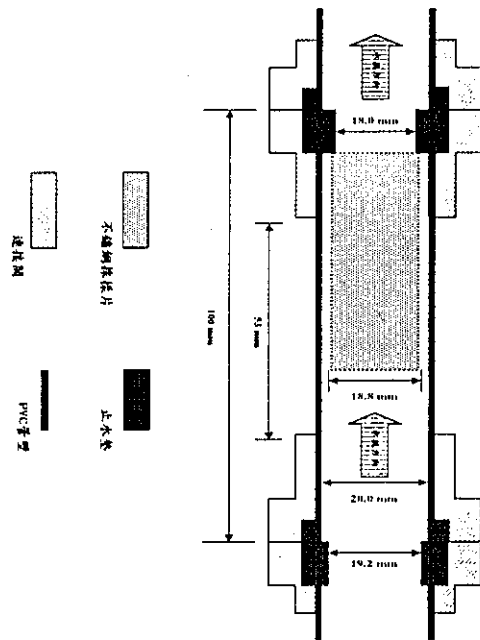


圖 2 生物膜培養裝置剖面

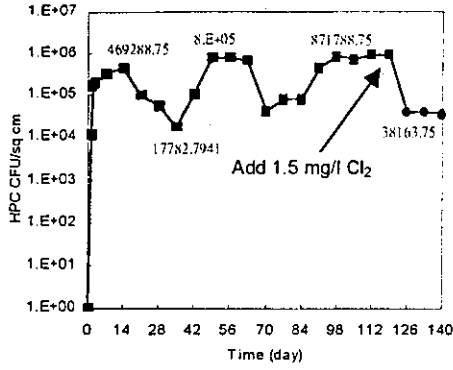


圖 3 不加氯試程培養 140 天後 HPC 結果

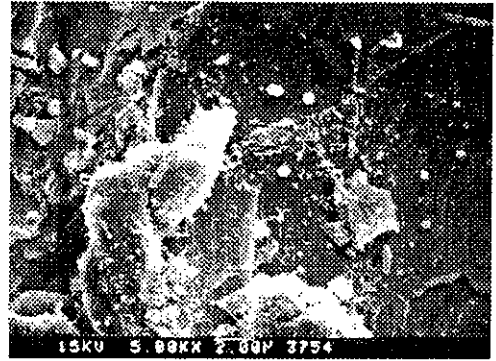


圖 6 不加氯條件下培養 1 天後 SEM 照片

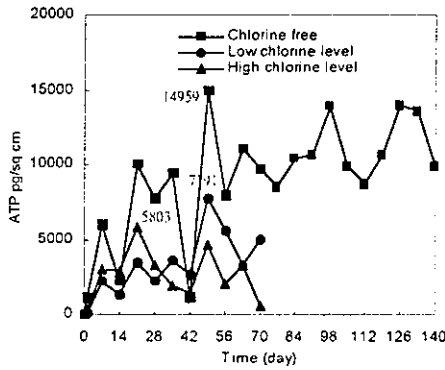


圖 4 不同試程培養 70 天後 HPC 比較



圖 7 不加氯條件下培養 14 天後 SEM 照片

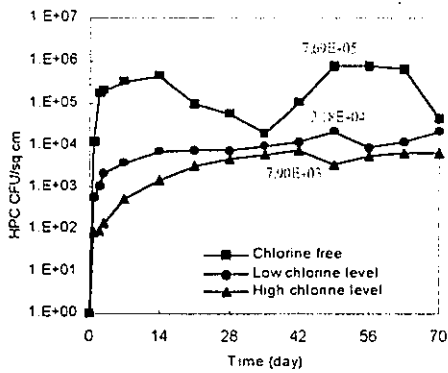


圖 5 不同試程培養 70 天後 ATP biomass 比較

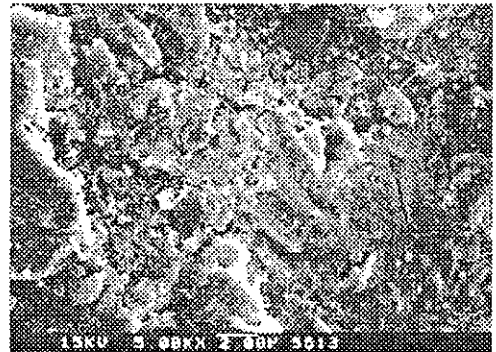


圖 8 不加氯條件下培養 140 天後 SEM 照片