水世界-中国城镇水网
www.Chinacitywater.org
水业焦点 | 水业手册 | 企业之窗 | 求职招聘 | 学术论坛
行业论文 | 专家咨询 | 会展信息 | 行业分析 | 下载专区

给水管道生物膜中的细菌生长研究

[我要评论] [返回]

作　　者：于水利;余鑫晶;邱晓霞;

出　　自：中国土木工程学会水工业分会给水委员会第十次年会暨 2005 年中日水处理技术交流会

发表时间：2005-11-9

摘　　要：近年来，人们越来越关注饮用水在管道中的二次污染问题，并提出了饮用水质的生物稳定性概念。本文用生物学方法分析了给水管网生物膜中细菌的种群生长情况。PCR 扩增、凝胶电泳试验检测结果表明，试验管道和哈尔滨自来水管道生物膜中不含铜绿假单胞菌。从拍摄的扫描电镜可以看出，附着在管壁上的微生物多为球菌和杆菌。从模型管网分离出 20 株菌，其中玫瑰色微球菌、藤黄微球菌、地杆菌属、扩展短杆菌、节杆菌属是模型管道试验的优势菌。输送同一水质的哈尔滨市实际管网管壁生物膜中的细菌种类与模型管道中的类似。

给水管道生物膜中的细菌生长研究

于水利*　余鑫晶　邱晓霞

Yu Shuili　Yu Xinjing　Qiu Xiaoxia

（哈尔滨工业大学市政环境工程学院　150090）

（School of Municipal and Environmental Engineering，Harbin Institute of Technology，P.R.China，150090）

摘要：近年来，人们越来越关注饮用水在管道中的二次污染问题，并提出了饮用水质的生物稳定性概念。本文用生物学方法分析了给水管网生物膜中细菌的种群生长情况。PCR 扩增、凝胶电泳试验检测结果表明，试验管道和哈尔滨自来水管道生物膜中不含铜绿假单胞菌。从拍摄的扫描电镜可以看出，附着在管壁上的微生物多为球菌和杆菌。从模型管网分离出 20 株菌，其中玫瑰色微球菌、藤黄微球菌、地杆菌属、扩展短杆菌、节杆菌属是模型管道试验的优势菌。输送同一水质的哈尔滨市实际管网管壁生物膜中的细菌种类与模型管道中的类似。

关键词：饮用水生物稳定性、优势菌种、分菌、PCR 扩增、铜绿假单胞菌

Abstract: The recontamination during distribution of drinking water has been receiving considerable attention these years. Microbiological method wad used to analyze the population of the biofilms. Pseudomonas aeruginosa was not found in the biofilms by the PCR amplification and agarose gel eletrophoresis. According to the scanning electron microscopic photos, most microorganisms attached inside pipelines were found to be cocci and bacilli. 20 bacteria strains were obtained. For the model pipeline, the dominant species living throughout the test periods were Micrococcus Roseus, Micrococcus luteus, Terrabacter Collins, Brevibacterium linens and Arthrobacter. The strains of the actual pipeline was similar with the model pipeline.

Key words: Biostability of drinking water, Dominant species, Isolation, PCR reactions, Pseudomonas aeruginosa.

0 前言

中国城镇水网 www.chinacitywater.org

近年来，人们越来越关注饮用水在管道中的二次污染问题，并提出了饮用水质的生物稳定性概念。饮用水生物稳定性（biological stability of drinking water）是指饮用水中可生物降解有机物支持异养菌生长的潜力，即当有机物成为异养菌生长的限制因素时，水中有机营养物支持细菌生长的最大可能性。饮用水生物稳定性高，表明水中细菌生长所需的有机营养物质含量低，细菌不易在其中生长；反之，饮用水生物稳定性低，则表明水中细菌生长所需的有机营养物质含量高，细菌容易在其中生长[1]。

研究控制给水管网中细菌再生长成为提高水质生物稳[3]定性的关键。本文采用生物学方法，对给水管网管壁中形成的生物膜进行分菌、纯化试验，分析生物膜中的细菌生长情况，找出给水管道生物膜中的优势菌，寻找从根本上提高饮用水管道的生物稳定性的方法。由于传统的细菌分菌方法具有一些局限性，难以保证分离一些量少或不容易存活的细菌，本文用分子生物学方法，检测某些病原菌或有特定研究意义的菌种。文献[2]曾报导在饮用水中发现铜绿假单胞菌（绿脓杆菌）的存在，它是一种机会致病菌，对人体会产生一定的危害。因此，本文尝试用 PCR（聚合酶链反应）扩增及凝胶电泳的方法来检测给水管网生物膜中是否有铜绿假单胞菌的存在。PCR 扩增检测具有快速准确的优点，可以推广应用于检测水中病原菌的试验中。

1 试验设备与方法

1.1 试验设备

管道生物膜在一个实验室管道模型中培养，管道长 0.4m，内径 150mm，模型的示意图见图 1。管道材质采用铸铁管，管上有 6 个取样口，用套有相同铸铁片的螺栓拧在模型上，铸铁片即为模拟的管壁，在其上培养生物膜。

该模型连接在自来水管道上，自来水的水质情况如表 1 所示。

实验室自来水水质（哈尔滨市）　　表 1

项目	水质指标检测值
PH	6.9
余氯	0.05mg/l
氨氮	0.26 mg/l
浊度	1.0NTU,
COD_{Mn}	2.34 mg/l
TOC	2.86mg/l
UV254	$0.050cm^{-1}$
水温（平均）	19℃

模型从 2004 年 3 月起开始运行，于 2004 年 7 月（培养 4 个月）、11 月（培养 8 个月）与 2005 年 3 月（培养 12 个月）分别取样进行分菌纯化鉴定试验。另外于 2005 年 5 月对实际管网（检修时）取样进行分菌纯化鉴定分析。

中国城镇水网 www.chinacitywater.org

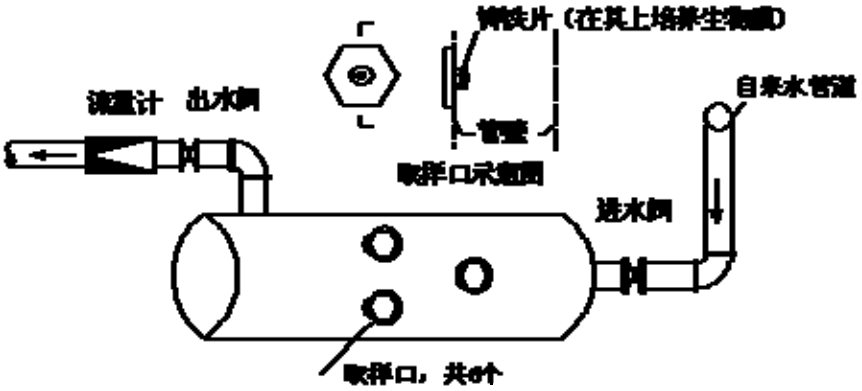


图 1 实验室管道模型示意图

1.2 试验方法

1.2.1 分菌

取样：无菌操作，用一小团灭菌的脱脂棉轻轻擦拭在铸铁片上形成的生物膜，立即投入盛有 100ml 无菌水的锥形瓶中，塞上棉塞，用力震荡约 15 分钟，使脱脂棉上的菌胶团充分打散。

增菌：对水样用牛肉膏蛋白胨培养液分别作好氧菌和厌氧菌的增菌培养，好氧 30℃，48 小时，厌氧 30℃，4 天。模型管网的第三批水样进行了增菌处理，同时也作了不增菌的平行样，之后进行分菌。

分菌：取增菌后的培养液进行逐倍稀释，用涂布与混合法在固体培养基中培养菌落，30℃培养 1~7 天，对长出的不同菌落进行划线分离。

纯化：对分离出的菌落进行多次划线分离纯化，划线 4~5 次后基本可以确定为纯菌，将纯菌转移到斜面平板上保存并分析。

鉴定：细菌鉴定按文献[3]所描述的水中常见细菌的生理生化鉴定方法，从以下几个主要生化特性对细菌进行鉴定：革兰氏染色；淀粉水解；接触酶试验；产吲哚；产硫化氢；硝酸盐还原；葡萄糖发酵；V.P 和需氧性。鉴定依据《伯杰细菌鉴定手册》[4]和《常见细菌系统鉴定手册》[5]。《伯杰细菌鉴定手册》和《常见细菌系统鉴定手册》对细菌的形态、生理生化特性和营养需求等均有详细的描述，是细菌分类鉴定的重要参考书。

1.2.2 电子显微技术

对分离出的几个菌种拍摄透射电镜，以便更好的观察菌种的形状。

对管道生物膜拍摄扫描电镜，以便直观的观察生物膜的生长状况。

1.2.3 PCR 扩增

聚合酶链反应（PCR）是一种对特定的 DNA 片段在体外进行快速扩增的新方法。该方法一改传统的分子克隆技术的模式，不通过活细胞，操作简便，在数小时内可使几个拷贝的模版序列甚至一个 DNA 分子扩增 10^7~10^8 倍，大大提高了 DNA 的得率。作为检测手段的 PCR 技术，成败的关键在于选择合适的靶序列，使其产物具有所需要的特异性，而其产物能否具有特异性，又取决于引物的设计。不同的试验所需要扩增的 DNA 片段也可能不同，因此设计的引物也不一定相同。

目前已经有很多用 PCR 检测铜绿假单胞菌的实例，临床医学应用相对较多。K.P.Song[6]用外毒素 A（ETA）特异引物进行 PCR 扩增，对眼科疾病患者检测是否受到铜绿假单胞菌的感染；Ferenc Karpati[7] 用 PCR 对部分 16S rRNA 序列进行扩增，检测患囊肿性纤维化的病人受到铜绿假单胞菌的感染；Gareth Lloyd-Jones[8] 用荧光 PCR 对新西兰的土壤中的铜绿假单胞菌进行量化分析；Nicola M.Kingsford[9]用 PCR 对部分 16S rRNA 序列进行扩增，检测出羊毛废水含有铜绿假单胞菌。由于铜绿假单胞菌的 ETA 基因是唯一的，且在所有的铜绿假单胞菌菌株中均能存在，具有很强的专属性。因此本次实验也采用文献[6]中的引物，由上海基康生物有限公司合成，引物序列如下：

中国城镇水网 www.chinacitywater.org

1, 5 -GAC AAC GCC CTC AGC ATC ACC AGC-3

2, 5 -CGC TGG CCC ATT CGC TCC AGC GCT-3

实验设计了 5 个样，T 为铜绿假单胞菌纯菌培养液，R1、R2 为实际管网水样，M1、M2 为模型管网水样。其中 R1、R2、M1、M2 水样取法同分菌试验，再用牛肉膏蛋白胨培养液在 35℃下富集 48 小时（铜绿假单胞菌在该富集培养液中能够很好的生存繁殖），为避免培养液中因目标菌株量少而导致 DNA 提取失败，本实验直接用培养液进行 PCR 扩增与凝胶电泳实验。PCR 扩增体系如下：

总体积：12.5ul；EXtag：0.2ul（5U/ul）；10x PCR buffer（含镁离子）：1.25ul；2.5m M 的 DNTP：1ul；Primer：0.25ul（each,20m M）；菌液：1ul；DdH$_2$O：8.55ul。PCR 反应条件如下：（a）预变性：95℃下，18min；（b）三温循环法：95℃下，15s，54℃下，1min，72℃下，1min，进行 35 个循环；（c）结束：72℃下，10min。电泳所用的胶为琼脂糖凝胶（1%），EB 染色。

2 结果与分析

2.1 试验结果

2.1.1 分菌结果

本次试验发现，模型管网三次分菌纯化鉴定试验共得到 20 种不同的菌株，对三次试验依次编号 1、2、3，其中样 3 平行增菌的水样编号 3’，实际管网分菌试验编号 4，试验结果见表 2。各个菌株的部分生理生化结果见表 3，其他几项生理生化试验结果差别不大并对鉴定没有决定性的作用，只作为鉴定的参考，因此并未列出。

从鉴定结果不难看出，从给水管壁生物膜中分离出的细菌均为化能异养菌，多为革兰氏阳性菌，好氧或者兼性厌氧且杆菌较多。由于传统的生理生化试验考察的菌株特性有限，所以部分菌株只能鉴定到属，如果要进一步作准确地鉴定，可以结合 PCR 扩增、DNA 测序等较新的技术进行测定。

模型管网分菌结果　　表 2

试验编号	菌种	菌株数
样 1	玫瑰色微球菌，藤黄微球菌，变异微球菌，极小短小杆菌，地杆菌属，扩展短杆菌，黄色节杆菌，需土节杆菌，乳微杆菌，蛾微杆菌，产左聚糖微杆菌	11
样 2	玫瑰色微球菌，藤黄微球菌，球形节杆菌，地杆菌属，扩展短杆菌，厌氧弧菌，嗜热球杆菌，木亚棍状菌，萎蔫短小杆菌，密执安亚种，乳杆菌属	11
样 3	玫瑰色微球菌，藤黄微球菌，地杆菌属，扩展短杆菌，节杆菌属	5
样 3’	扩展短杆菌，反硝化里斯特氏菌，嗜碱芽孢杆菌	3
样 4	玫瑰色微球菌，变异微球菌，白色短小杆菌，扩展短杆菌，黄色节杆菌，乳微杆菌，嗜碱芽孢杆菌	7

各菌株的生理生化特性　　表 3

菌种名称	革兰氏	接触酶	NO_3 还原	产吲哚	葡萄糖产酸	V.P	需氧性	菌落颜色

www.chinacitywater.org 中国城镇水网

玫瑰色微球菌（微球菌属） Micrococcus Roseus	+	+	+	-	-	-	好氧	粉红
藤黄微球菌（微球菌属） Micrococcus luteus	+	+	-	+	-	-	好氧	黄色
变异微球菌（微球菌属） Micrococcus varians	+	+	+	-	-	-	好氧	浅黄
极小短小杆菌（短小杆菌属） Curtobacterium Pusillum	+	+	-	-	+	-	好氧	浅黄
球形节杆菌（节杆菌属） Arthrobacter globiformis	+	+	+	-	-	-	兼性厌氧	无色
地杆菌属 Terrabacter Collins	+	+	+	-	-	-	好氧	白色
扩展短杆菌（短杆菌属） Brevibacterium linens	+	+	-	-	-	+/-	好氧	橙色
黄色节杆菌（节杆菌属） Arthrobacter flavescens	+	+	+	-	-	-	好氧	柠檬黄
需土节杆菌（节杆菌属） Arthrobacter terregens	+	+	-	+	-	+	好氧	黄色
乳微杆菌（微杆菌属） Microbacterium lactium	+	+	-	+	-	-	好氧	白色
蛾微杆菌（微杆菌属） Microbacterium imperiale	+	+	-	+	-	-	好氧	橙红
厌氧弧菌（弧菌属） Anaerovibrio	-	+	-	+	-	-	厌氧	无色
嗜热球杆菌（球杆菌属） Sphaerobacter thermophilum	+	+	-	+	-	-	好氧	黄色
木亚棍状菌（拉氏杆菌属） Clavibacter subsp	+	+	-	+	-	-	好氧	白色

中国城镇水网 www.chinacitywater.org

萎蔫短小杆菌（短小杆菌属） Curtobacterium flaccumfaciens	+	+	+	-	+	+	好氧	橙黄
密执安亚种（棍状杆菌） Clavibacter subsp.michiganensis	+	+	-	+	-	-	兼性厌氧	白色
反硝化里斯特氏菌（李斯特菌属） Listeria denitrificans	+	+	+		+		兼性厌氧	无色
嗜碱芽孢杆菌（芽孢杆菌） Bacillus alcalophilus	+/-	+	-		+		好氧	白色
乳杆菌属 Lactobacillaceae	+	-	-	-	+	-	兼性厌氧	白色
产左聚糖微杆菌（微杆菌属） Microbacterium laevaniformans	+	+	-	+	-	-	好氧	浅黄

2.1.2 透射电镜

由于细菌个体较小，利用一般的光学显微镜观察不够清晰，为此，挑选几种菌株拍摄了透射电镜，它们的形态在本次分菌试验中具有一定的代表性，本次试验对玫瑰色微球菌、反硝化利斯特氏菌、节杆菌、扩展短杆菌进行透射电镜拍摄观察，结果见图 2 所示。

从透射电镜照片可以清楚地看到菌株单个细胞的形态及附属物，细胞的组合方式等。图 2 中的玫瑰色微球菌为球形，四联排列；反硝化利斯特氏菌细胞幼菌为端圆短杆，老菌呈长杆状，长有周生鞭毛；节杆菌老期培养物几乎都是球状菌，且大小不一，在较大的球状细胞中，可能从细胞的两个，三个或罕有从四个部位长出突起，该特点与《伯杰氏细菌鉴定手册》对节杆菌的描述一致，是节杆菌鉴定的重要特征；扩展短杆菌幼菌呈长的不规则杆状，单个或成对，老菌为球状。

www.chinacitywater.org 中国城镇水网

玫瑰色微球菌　反硝化利斯特氏菌　反硝化利斯特氏幼菌

节杆菌属（老培养物）　扩展短杆菌

图 2 优势菌种透射电镜照片

2.1.3 扫描电镜

为了对管壁生物膜进行更直观地观察，于 2005 年 3 月对 1 号口进行取样拍摄扫描电镜，观察管壁生物膜的生长情况电镜照片如图 3 所示。

从扫描电镜照片中可以看出，管壁表面已经形成了管垢，管垢中有许多大小不均一的孔隙，为细菌的附着生长进而形成生物膜提供了条件，生物膜中附着有大量的球菌和杆菌及其菌胶团。这为致病菌的附着生长提供了很好的环境。管道中的水压或水流流速变化使管壁上的生物膜被冲刷，就很容易导致水中细菌数增多及致病菌的爆发，因此该管道水存在细菌爆发的潜在危机。

www.chinacitywater.org 中国城镇水网

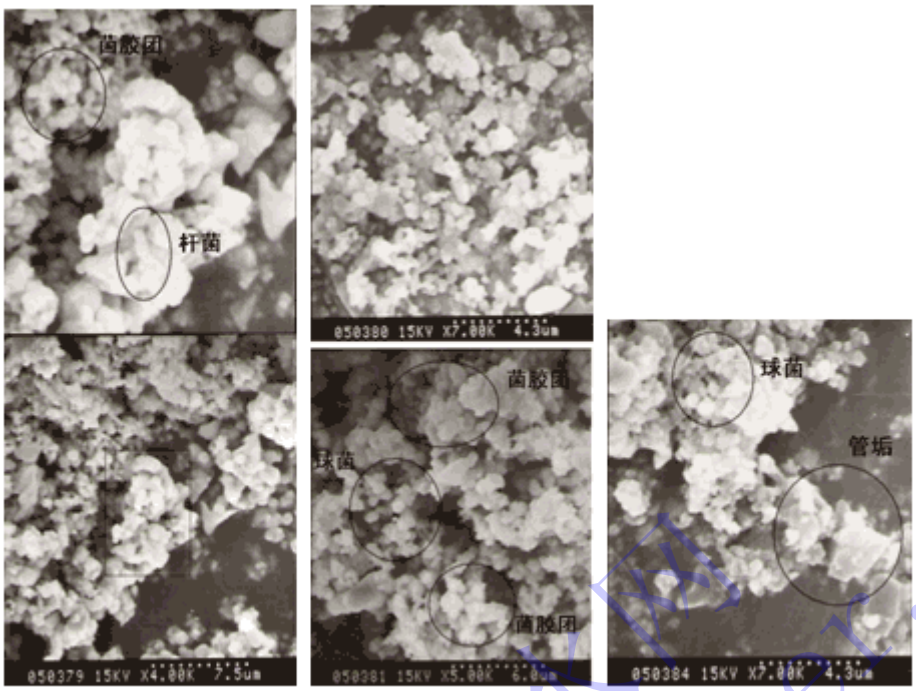
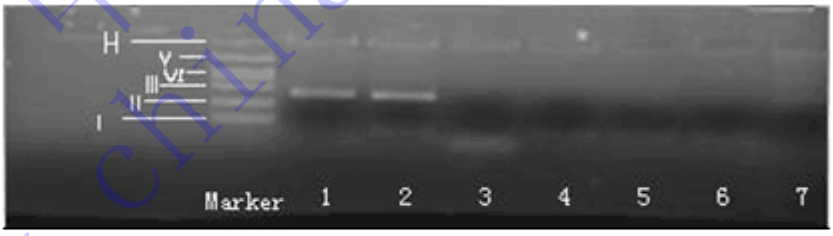


图 3 管壁生物膜扫描电镜照片

2.1.4 PCR 扩增结果

PCR 扩增后的凝胶电泳照片如图 4 所示。泳道 1、2 在 II、III 之间有一条特异扩增条带，为阳性，其他样品及空白泳道无条带显示，为阴性。实验中特别设计了铜绿假单胞菌纯菌样品（T，由黑龙江省微生物研究所提供，菌株编号为 ATCC 27853）同时进行实验，为阳性结果，这就说明设计的引物对铜绿假单胞菌是具有特异扩增效果的，排除了其他样品因非特异扩增而产生的阴性结果产生错误结论。从结果可以说明管道的几个水样 R1、R2、M1、M2 不存在铜绿假单胞菌。



图中 I——100bp； VI——750bp； 1——T； 4——R2； 7——无样品对照
II——250bp； V——2000bp； 2——T； 5——M1；
III——500bp； H——点样孔； 3——R1； 6——M2；

图 4 PCR 产物凝胶电泳

2.2 试验结果分析

从鉴定结果不难看出，从给水管壁生物膜中分离出的细菌均为化能异养菌，多为革兰氏阳性菌，好氧或者兼性厌氧且杆菌较多。其中玫瑰色微球菌、藤黄微球菌、地杆菌属、扩展短杆菌、节杆菌属在管道模型三次试验中均分离得到，说明这几种菌在模型管道管壁的生物膜上一直存在，已经适应了管道的贫营养环境，是该次模型管道试验的优势菌。根据文献[4]对这些优势菌营养要求的描述，发现这两种球菌的生

www.chinacitywater.org 中国城镇水网

长依赖于乙酸，乳酸盐，丙酮酸盐，琥珀酸盐，甘油和碳水化合物（特别是葡萄糖）；这几种杆菌的营养要求更为复杂，碳水化合物，糖类，脂肪酸，二羧酸，羟酸，乙二醇，氨基酸，杂环化合物等等都是它们能够利用的营养物质。因此，从彻底去除细菌所需的营养物质角度来控制管道中的细菌再生长有一定的难度，需要在各个工艺上加强这些营养物质的去除效果。

从第三批经过增菌试验的样品共分出三种菌株，可以推断这三种菌株在营养丰富的条件下繁殖较快，很快的在培养液里占据了优势，而其他在不增菌条件下分离得到的其他菌株可能不适应富营养条件的培养液，被逐渐淘汰，因此未在增菌试验的分菌试验中得到。这些是只适应管道贫营养生长环境的菌种，在研究管道生物时应该予以重视。另外，扩展短杆菌在增菌或不增菌试验中均存在，说明该菌的适应能力较强，既能适应管道的贫营养生长环境也能适应富营养生长环境。

从实际管网的分菌结果看出，实际管网管壁生物膜中生长的细菌种类与模型管道中的类似，由于模型管道与实际管网输送的是同一水质的水，因此可以推断长期输送该水质管道的管壁上容易滋生这些类型的细菌。虽然这些细菌不是致病菌，但是管壁上大量细菌的附着与繁殖有利于某些机会病原菌的滋生，一旦管道中的水流速度、压力发生变化冲刷管壁形成的生物膜就容易导致水中病原菌的爆发，危害人类健康。

从拍摄的模型管网扫描电镜照片可以看出，管壁表面已经形成了管垢，管垢中有许多大小不均一的孔隙，为细菌的附着生长进而形成生物膜提供了条件，生物膜中附着有大量的球菌和杆菌及其菌胶团。这为致病菌的附着生长提供了很好的环境。管道中的水压或水流流速变化使管壁上的生物膜被冲刷，就很容易导致水中细菌数增多及致病菌的爆发，因此该管道水存在细菌爆发的潜在危机。

从PCR扩增检测铜绿假单胞菌的结果说明此次试验的模型管网与实际管网中并不存在铜绿假单胞菌，目前较为安全。

3 结论

（1）从模型管网（运行一年）的扫描电镜照片可以看出，管壁表面已经形成了管垢，管垢中有许多大小不均一的孔隙，为细菌的附着生长进而形成生物膜提供了条件，生物膜中附着有大量的球菌和杆菌及其菌胶团。这为致病菌的附着生长提供了很好的环境。管道中的水压或水流流速变化使管壁上的生物膜被冲刷，就很容易导致水中细菌数增多及致病菌的爆发，因此该管道水存在细菌爆发的潜在危机。

（2）从鉴定结果不难看出，从给水管壁生物膜中分离出的细菌均为化能异养菌，多为革兰氏阳性菌，好氧或者兼性厌氧且杆菌较多。其中玫瑰色微球菌、藤黄微球菌、地杆菌属、扩展短杆菌、节杆菌属在管道模型三次试验中均分离得到，说明这几种菌在模型管道管壁的生物膜上一直存在，已经适应了管道的贫营养环境，是该次模型管道试验的优势菌。

（3）根据这些优势菌的营养要求，我们发现玫瑰色微球菌、藤黄微球菌的生长依赖于乙酸，乳酸盐，丙酮酸盐，琥珀酸盐，甘油和碳水化合物（特别是葡萄糖）；地杆菌属、扩展短杆菌、节杆菌属的营养要求更为复杂，碳水化合物，糖类，脂肪酸，二羧酸，羟酸，乙二醇，氨基酸，杂环化合物等等都是它们能够利用的营养物质。因此，从彻底去除细菌所需的营养物质角度来控制管道中的细菌再生长有一定的难度，需要在各个工艺上加强这些营养物质的去除效果。

（4）从第三批经过增菌试验的分菌结果看出，共分出三种菌株，可以推断这三种菌株在营养丰富的条件下繁殖较快，很快的在培养液里占据了优势，而其他在不增菌条件下分离得到的其他菌株可能不适应富营养条件的培养液，被逐渐淘汰，因此未在增菌试验的分菌试验中得到。这些是只适应管道贫营养生长环境的菌种，在研究管道生物时应该予以重视。另外，扩展短杆菌在增菌或不增菌试验中均存在，说明该菌的适应能力较强，既能适应管道的贫营养生长环境也能适应富营养生长环境。

（5）从实际管网的分菌结果看出，实际管网管壁生物膜中生长的细菌种类与模型管道中的类似，由于模型管道与实际管网输送的是同一水质的水，因此可以推断长期输送该水质管道的管壁上容易滋生这些类型的细菌。虽然这些细菌不是致病菌，但是管壁上大量细菌的附着与繁殖有利于某些机会病原菌的滋生，一旦管道中的水流速度、压力发生变化冲刷管壁形成的生物膜就容易导致水中病原菌的爆发，危害人类健

中国城镇水网 www.chinacitywater.org

康。

（6）从 PCR 扩增检测铜绿假单胞菌的结果看出，此次试验的模型管网与实际管网中并不存在铜绿假单胞菌，目前较为安全。PCR 扩增方法简便快速，可以针对某一菌种进行快速检测，比起传统的生物学方法具有很大的优越性，值得推广。

中国城镇水网
www.chinacitywater.org