

北京市给水管网管壁微生物膜群落

刘小琳¹, 刘文君¹, 金丽燕¹, 顾军农²

(1 清华大学 环境科学与工程系, 北京 100084; 2 北京市自来水集团 水质监测中心, 北京 100031)

摘要: 为研究给水管网管壁微生物膜的群落结构, 采用异养菌平板计数(HPC)和单链构象多态性(SSCP)技术, 分析了北京市第九水厂管龄接近, 管材和余氯浓度不同的2个样品异养菌数目和种类。细菌计数结果表明, 2个样品微生物数量有较大差异。SSCP电泳及测序结果则显示2个样品中4条相同条带与蜡状芽孢杆菌、假单胞菌、苏云金芽孢杆菌和溶血不动杆菌的同源性分别为100%、99%、100%和97%。另一条只在第2个样品中出现的条带测序与未培养细菌(GenBank 登录号EF09462)的同源性为96%。潜在致病菌的存在警示应更加重视饮用水的微生物安全性。

关键词: 给水管网; 微生物膜; 异养菌平板计数; 单链构象多态性

中图分类号: X 172

文献标识码: A

文章编号: 1000-0054(2008)09-1454-04

Microbes in the Beijing water distribution system

LIU Xiaolin¹, LIU Wenjun¹, JIN Liyan¹, GU Junnong²

(1 Department of Environmental Science and Engineering,
Tsinghua University, Beijing 100084, China;

2 Center of Water Quality Examination of Beijing
Waterworks Group, Beijing 100031, China)

Abstract: Single strand conformation polymorphism (SSCP) and heterotrophic bacterial plate counts were used to identify the compositions of two biofilm samples, S1 and S2, from the Beijing 9th Waterworks Pipe Network. The pipes have similar ages but different pipe materials and different residual chlorine concentrations. The results show that the two samples had different heterotrophic bacterial counts. The SSCP electrophoresis bands were sequenced and contrasting with Genbank Data show that the two samples had 100% homology with *Bacillus cereus*, 99% with *Pseudomonas* sp. yged143, 100% with *Bacillus thuringiensis*, and 97% with *Acinetobacter haemolyticus* strain AR-46. The band observed only in the S2 sample had 96% homology with the uncultured bacterium clone. These potential pathogens require that more attention be paid to the microbiology safety of the Beijing drinking water.

Key words: water distribution system; biofilm; heterotrophic bacterial plate count; single strand conformation polymorphism

饮用水水质与人们生活质量和身体健康密切相关。饮用水的微生物风险是影响人体健康最主要的因素。微生物风险是由于饮用水中致病菌引起的。细菌在给水管网中繁殖, 会导致供水水质恶化, 加速管网的腐蚀, 因此了解管网系统中微生物群落的种群分布、遗传多样性及其动态特征, 认识细菌群落的稳定性和功能菌的作用对研究解决管网二次污染是非常必要的。由于实际管网取样的困难, 一般研究工作都用模拟管网来进行。模拟管网在管龄及水质条件等方面往往难以与实际管网一致, 因此往往造成分析结果的误差。

微生物群落结构分析主要有基于微生物纯培养的传统分析方法和分子生物学方法。纯化培养的方法主要为富集、分离、纯化得到单个微生物的菌落, 然后根据相应的程序进行鉴定。这种方法工作繁复、分析速度慢, 制约因素多。比较而言, 应用分子生物学方法能更客观地反映微生物群落结构的本质。单链构象多态性(single strand conformation polymorphism, SSCP)技术是Orita等^[1]建立的, 它是以环境基因组信息为基础, 以核糖体小亚基RNA基因为对象, 从而实现分析群落动态的目的。与其他分子生物学技术相比, SSCP技术具有使用设备简单、只需普通引物、不需后续杂交处理等优点。在根际微生物群落结构分析、自然环境微生物多样性调查、有机肥沤制和反应器崩溃过程中微生物群落动态学研究等方面, SSCP技术都表现出较强的应用潜力。近年来, 这一技术也越来越多地应用到水体微生物群落结构的分析研究中^[2-3]。

在细菌总数的测量方法上, 目前国内通常采用以牛肉膏蛋白胨为培养基的异养菌平板计数法

收稿日期: 2007-08-21

基金项目: 北京市科学技术委员会基金项目(0605004040521)

作者简介: 刘小琳(1974—), 女(汉), 江西, 博士后。

通讯联系人: 刘文君, 教授, E-mail: wjlju@mail.tsinghua.edu.cn

(heterotrophic plate counts, HPC) 来测定饮用水中的活菌数。然而, 由于饮用水中的贫营养环境有别于传统培养基提供的富营养环境, 大多数在显微镜下观察到的细菌不能在传统培养基上生长, 导致活菌计数结果偏低甚至检测不出。而采用R2A 培养基则能取得更好的效果^[4]。HPC-R2A 测试方法的培养温度更接近实际管网水的温度, 而且培养时间更有利于不同生长特性的细菌生长繁殖。美国国家环保局颁布的美国饮用水水质标准中规定的异养菌总数即以HPC-R2A 为指标, 并认为HPC-R2A 指标是一个比大肠杆菌总数更为严格的控制指标, 可以作为考察水处理效率, 指示微生物生长的指标。

本研究拟通过对北京市第九水厂给水管网壁微生物膜HPC-R2A 计数, 结合细菌 16S rDNA 的

PCR-SSCP 序列的比较分析, 考察实际给水管网的微生物群落结构。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

PCR 扩增仪为德国Eppendorf 5332 型。电泳仪为北京六一仪器厂稳压稳流电泳仪DYY-III型。电泳槽为北京六一仪器厂垂直电泳槽DYY-III-28B 型(带有冷水循环装置)。丙烯酰胺、硝酸银、碳酸钠、甲醛等均为国产分析纯产品。

1.2 样品采集

本实验的取样位点及相关信息如表1 所示。取样时用无菌棉签擦取水管内壁的微生物膜, 放入无菌容器, 置于便携式冰箱内, 尽快送实验室处理。

表1 取样位点及相关参数

样品号	管材	取样位点	取样时间	管龄 a	流速 $m \cdot s^{-1}$	余氯浓度 $mg \cdot L^{-1}$
S ₁	水泥内衬钢	第九水厂内	2007-03-23	15	0.6	0.50
S ₂	钢	上清桥	2007-04-26	14	0.6	0.04

1.3 HPC 计数

采用R2A 平板培养(酵母提取物 0.50 g, 胰蛋白胨 0.50 g, 酸水解酪素 0.50 g, 葡萄糖 0.50 g, 可溶性淀粉 0.50 g, 丙酮酸钠 0.30 g, 磷酸氢钾 0.30 g, 7 水硫酸镁 0.05 g, 琼脂 15.00 g, 蒸馏水 1000 mL。在加入琼脂前用结晶的磷酸氢钾或磷酸二氢钾调整pH 值为7.2。加入琼脂后, 加热培养基使其沸腾, 琼脂溶解后121 高压灭菌15min), 24 培养3~5 d 后, 计算细菌菌落数。

1.4 DNA 提取、引物选择及PCR 扩增

R2A 液体培养3~5 d 后, 取3~5 mL 培养物, 12000 g 离心1min, 收集菌体, 采用基因组提取试剂盒(上海生工)提取DNA, 操作步骤按厂家说明。

基因扩增引物为: P968f (5'-AACGCGAA-GAACCTTAC-3') 和P1392r (5'-ACGGCGGTG-TGTAC-3')^[5], 对应于 *E. coli* 16S rDNA 的V6—V8 区。反向引物P1392r 的5'端采用磷酸化标记。由北京赛百胜生物技术有限公司合成并标记。

PCR 采用大连宝生物有限公司的Taq DNA 聚合酶。50 μL 反应体系中分别包括: 10×PCR buffer (含Mg²⁺ 2.5 mmol·L⁻¹) 5 μL, dNTP (4 种物质各为250 μmol·L⁻¹) 4 μL, 引物各5 μL (5 μmol·L⁻¹), Taq DNA 聚合酶0.5 μL (5 U·μL⁻¹), 模板5 μL。反应程序为: 94 变性5 min 后, 接以30 个循环, 即

94 变性40 s, 50 退火30 s, 72 延伸40 s; 循环完毕后72 延伸10 min。取5 μL PCR 反应物于1%的琼脂糖凝胶上电泳, 并与100 bp DNA marker (大连宝生物有限公司) 进行比较, 以确定分子大小。

1.5 PCR 产物的λ 核酸外切酶处理

λ 核酸外切酶能够很专一地降解双链DNA 中5'磷酸标记的链, 从而使非标记的单链释放出来^[6]。60 μL 反应体系中包括: λ 核酸外切酶(5 U·μL⁻¹) (New England Biolabs Inc, USA) 4 μL, 10×buffer 6 μL, PCR 产物50 μL。37 温浴4 h, 处理完毕后, 72 10 min 灭活λ 核酸外切酶。

1.6 凝胶制备及SSCP 图谱的获得

SSCP 电泳采用5%的聚丙烯酰胺凝胶(交联度29:1, Sigma, USA)。30 mL 凝胶中加入质量分数10%的过硫酸铵(Amresco) 250 μL, Temed (Applied Biosystems, USA) 25 μL, 室温凝固30 min 后, 8 mA 恒电流, 预电泳60 min。λ 核酸外切酶处理过的样品与等量上样缓冲液(体积分数95%的去离子甲酰胺, NaOH 和EDTA 的质量摩尔浓度分别为10 mmol·L⁻¹和20 mmol·L⁻¹, NaOH 和EDTA 的质量摩尔浓度分别为质量分数分别为0.02%二甲苯氰FF 和0.02%溴酚蓝)^[7]混合后, 直接上样。4 下, 恒流8 mA, 电泳7 h。电泳结束后, 剥胶染色,

银染按Bassam^[8]的方法进行。

1.7 条带分离与克隆及测序

特异条带的回收按Tebbe等^[7]的方法进行。取回收的DNA 10 μ L 为模板,采用同前体系和PCR 程序分别进行扩增。取5 μ L 产物进行琼脂糖电泳验证后,对PCR 产物切胶纯化(纯化试剂盒,上海生工生物公司)。并按产品说明书克隆进T-载体(pMD-2182T,大连宝生物有限公司)。对转化子的筛选采用蓝白斑及PCR 的方法,PCR 直接以白斑菌落为模板,采用能与T-载体插入点两侧特异结合的M 13通用引物进行检测。每条带选取3~4个克隆,同样以M 13通用引物进行测序(3730, Applied Biosystems)。测序由上海生工公司完成。通过Blast软件,将测序获得的序列与GenBank 进行比对。

2 结果与讨论

2.1 HPC 计数

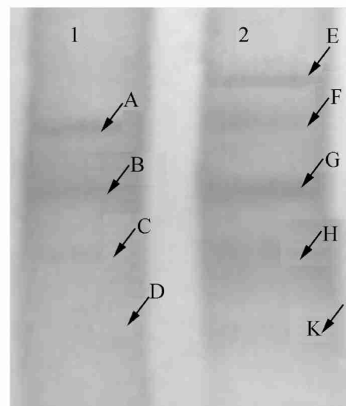
影响细菌在管网生长的因素有很多。总的说来,包括余氯、营养条件、管材与其腐蚀状况和水力因素等。出厂水通过加氯或氯胺消毒,并保持管网内有一定的余氯以控制微生物生长是目前普遍采用的方法。氯或氯胺消毒的原理是破坏细胞膜、酶系统、蛋白质。经氯消毒的细菌在管网中能修复、重新生长,但加氯量过高会引起氯化消毒副产物的生成,使饮用水中“致病、致畸、致癌”物质增加,对人体健康造成威胁。因此仅靠增加余氯来控制管网细菌生长是不可取的。管材对给水管网细菌生长的影响主要在于是否向水中释放促进微生物生长的营养物质和其表面是否有利于微生物附着生长。

本次研究的2个样品主要特点是取自管材和余氯不同的管网。样品S₁和S₂的HPC计数结果分别为 $15 \times 10^7 \text{ cfu} \cdot \text{cm}^{-2}$ 和 $7.8 \times 10^7 \text{ cfu} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。从中可以看出,S₁的异养菌数约为S₂的2倍。这可能与水泥内衬钢管内壁比较粗糙,有利于微生物附着生长及其余氯浓度较低有关。因此在实际给水中,如何有效控制细菌生长,保证消毒效果,需综合考虑各方面的因素影响。

2.2 SSCP 电泳图谱

SSCP 是依据单链DNA 分子立体构象的不同来实现电泳分离的。相比于热变性,用 λ 核酸外切酶(λ exonuclease)将5磷酸标记的反义链水解掉,不仅可以提高SSCP 的灵敏度,还可以提高SSCP 分析长片段DNA 的能力^[9]。本研究得到的

SSCP 图谱如图1所示。样品S₁和S₂分别分离得到4和5条明显带。其中S₁的4条带与S₂中4条带的位置大致相同。



1、2泳道分别为样品1和2;箭头及字母标示条带为回收并测序带

图1 SSCP 电泳图谱

SSCP 技术在微生物群落组成结构及动态分析中的应用尚不是十分完善,许多方法还需统一。SSCP 图谱与群落实际结构符合程度有待提高,这主要是由基因组DNA 提取方法和PCR 选择性放大造成的偏差,到目前为止还没有更好的办法消除。其中核酸提取是整个PCR-SSCP 技术的基础,能否获得具有代表性的核酸样品将决定后续分析的可信程度。

2.3 微生物群落及其对人的健康风险

将SSCP 凝胶中条带切胶回收,与T-载体连接后转入感受态*E. coli* DH5 α ,挑阳性克隆,提取质粒并测序。将测序结果提交基因组数据库进行blast对比。结果显示,2个样品出现在同一位置的条带均为同一种微生物。图1中A与F,B与G,C与H,D与K分别最可能是蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、假单胞菌(*Pseudomonas* sp. yged143)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)和溶血不动杆菌(*Acinetobacter haemolyticus* strain AR-46)。E则最可能是未培养细菌(Uncultured bacterium clone Ms-R289)。表2列出了给水管网管壁微生物测序结果,蜡状芽孢杆菌为革兰氏染色阳性菌,产生芽孢,需氧或兼性厌氧,无荚膜,多数溶血,通常过氧化氢酶阳性。如果这类细菌在人体内,通常是在肠道内生长,会导致人生病,即感染性食物中毒^[10]。假单胞菌为革兰氏阴性杆菌,以极生鞭毛运动,不形成芽孢,好氧,呼吸代谢。广泛存在于土壤、水、污物及空气中,大多数种不需要有机生长因子。有的种对人、

动物或植物有致病性。苏云金芽孢杆菌是一种革兰氏阳性细菌。它能产生对害虫专一性的杀虫晶体蛋白, 具有对人类健康和环境安全的优点。溶血不动杆菌为需氧, 粗短或球形的革兰氏阴性菌。广泛分布于外界环境, 主要是水和土壤中, 为机会性感染致病菌, 常引起医院内感染。由于其对多种抗生素耐药, 一旦感染, 病情多较严重。

表2 给水管网管壁微生物测序结果

条带	最可能的微生物	基因同源性/%	Genbank 登录号
A, F	<i>Bacillus cereus</i>	100	AB190077
B, G	<i>Peudamonas</i> sp. yged143	99	EF419342
C, H	<i>Bacillus thuringiensis</i>	100	EF537013
D, K	<i>A cinetobacter haemolyticus</i> strain AR-46	97	AY586400
E	Uncultured bacterium clone M s-R 289	96	EF094627

3 结 论

1) 使用年限接近的水泥内衬钢管(余氯浓度为0.04mg•L⁻¹)比普通钢管(余氯浓度为0.5mg•L⁻¹)的管壁微生物HPC 计数高出约1 倍。

2) 在北京市第九水厂给水管网的2 个取样点中共发现蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、假单胞菌(*Peudamonas* sp. yged143)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)、溶血不动杆菌(*A cinetobacter haemolyticus* strain AR-46)和未培养细菌(Uncultured bacterium clone M s-R 289)等5 种细菌。其中蜡状芽孢杆菌、假单胞菌和溶血不动杆菌为潜在致病菌。

致谢: 感谢北京市第九水厂在取样及相关参数方面提供的方便和支持; 感谢黄凯锋和王迪同学在取样时给予的帮助。

参考文献 (References)

[1] Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, et al Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction [J]. *Genomics*, 1989, 5(4): 874-879

[2] Brettar I, Labrenz M, Flavier S, et al Identification of a *thiamicrospira denitrificans*-like epsilonproteobacterium as a catalyst for autotrophic denitrification in the central baltic sea [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72: 1364-1372

[3] Eichler S, Christen R, Hltje C, et al Composition and dynamics of bacterial communities of a drinking water supply system as assessed by RNA- and DNA-based 16s rRNA gene fingerprinting [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72: 1858-1872

[4] 鲁巍, 姜登岭, 张晓健. 配水管网中AOC与细菌再生长的关系 [J]. 中国给水排水, 2004, 20(5): 5-8
LU Wei, JIANG Dengling, ZHANG Xiaojian. Relationships between AOC and bacterial regrowth in distributing network [J]. *China Water & Wastewater*, 2004, 20(5): 5-8 (in Chinese)

[5] Zhang T, Fang H P. Phylogenetic diversity of an SRB-rich marine biofilm [J]. *Applied and Microbiology Biotechnology*, 2001, 57: 437-440

[6] Subramanian K, Rutvisuttinunt W, Scott W, et al The enzymatic basis of processivity in λ exonuclease [J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31: 1585-1596

[7] Tebbe C C, Schmalenberger A, Peters S, et al Single-strand-conformation polymorphism (SSCP) for microbial community analysis [C]. *Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Applications* U K Wymondham: Horizon Scientific Press, 2001: 161-175

[8] Bassam B J, Caetano-Anolles G, Gresshoff P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels [J]. *Analytical Biochemistry*, 1991, 196: 80-83

[9] Schwieger F, Tebbe C C. A new approach to utilize PCR-single-strand conformation polymorphism for 16S rRNA gene based microbial community analysis [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64: 4870-4876

[10] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, et al *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* [M]. 9th ed. Baltimore: William Wilkins Co, 2000