

分析 & 监测

PCR 技术检测饮用水中大肠杆菌

马颖¹, 龙腾锐¹, 方振东²

(1. 重庆大学 城市建设与环境工程学院, 重庆 400045; 2. 后勤工程学院 科研部, 重庆 400016)

摘要: 研究了基于聚合酶链式反应(PCR)检测饮用水中大肠杆菌的方法,所设计的引物对埃希氏大肠杆菌有特异性。该方法比较适于检测经氯剂消毒或臭氧消毒的饮用水中的大肠杆菌,检测结果与常规滤膜培养法有较好的一致性,且分析时间短(4~5 h)、反应灵敏。

关键词: 聚合酶链式反应; 饮用水; 大肠杆菌

中图分类号: TU991.2 **文献标识码:** C **文章编号:** 1000-4602(2004)09-0093-03

Polymerase Chain Reaction (PCR) for Detecting Coliform in Drinking Water

MA Ying¹, LONG Teng-rui¹, FANG Zheng-dong²

(1. School of Urban Construction and Environmental Engineering, Chongqing University, Chongqing 400045, China; 2. Dept. of Scientific Research, Logistics Engineering University, Chongqing 400016, China)

Abstract: The study was made on the method of polymerase chain reaction for detecting coliform in drinking water. The primer designed has specificity to *E. coli*. The method is more suitable for detecting the coliform in chlorine and ozone disinfected drinking water, and is in good agreement with the conventional membrane filter method. It is characterized by short period of analysis (4-5 h) and more sensitive detection.

Key words: polymerase chain reaction; drinking water; coliform

聚合酶链式反应(PCR)是一种分子生物学检测方法,广泛应用于生物医学研究领域,将PCR用于检测饮用水微生物,具有快速、灵敏、操作简便等优点。

1 试验方案

1.1 埃希氏大肠杆菌PCR检测方法

上游引物: 5'-tgt tca gtg gca aga gtt-3', 228~245 bp。

下游引物: 5'-taa tcg ata tac ccg ctc-3', 564~581 bp^[1]。

PCR 扩增反应体系^[2]: 10 × PCR 缓冲液, 5 μL;

Tag 酶(2 U/μL), 1 μL; MgCl₂ 溶液(25 mmol/L), 5 μL; dNTP(2.5 mmol/L), 5 μL; ddH₂O 29 μL; 上游引物(10 μmol/L), 2 μL; 下游引物(10 μmol/L), 2 μL; 模板 DNA(1.5 μg/μL), 1 μL。

PCR 扩增循环参数: 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 36 个循环。

采用溴化乙锭染色、琼脂糖凝胶电泳并在紫外光下拍摄图片的方法观察 PCR 扩增产物。将 PCR 扩增产物条带与 DNA 分子量标准对比,判断有无埃希氏大肠杆菌(光亮色带为阳性,无光亮色带为阴性)。试验平行进行多次,大肠杆菌菌株采用工程

菌株 JM109、大肠埃希氏菌、临床大肠杆菌 I 和临床大肠杆菌 II。

1.2 引物特异性检验

选择假单胞菌 P17、螺旋菌、埃希氏大肠杆菌、链球菌、绿脓杆菌、铜绿假单胞菌、葡萄球菌、志贺氏菌、沙门氏菌、临床大肠杆菌、柠檬酸杆菌、霍乱弧菌等 12 个菌株。提取各菌株的 DNA, 按 1.1 引物和反应体系进行 PCR 扩增, 同样用凝胶电泳进行产物观察和判断。

1.3 不同消毒工艺水样的检测

取含有埃希氏大肠杆菌的水样, 分别采用氯剂、紫外线和臭氧消毒灭活后, 用 PCR 方法和滤膜法各自检测大肠杆菌。以滤膜培养法检测结果作为大肠杆菌是否具有活性的标准, 将 PCR 法与滤膜法的检测结果相对比, 若 PCR 法与滤膜法都检出水样中含有大肠杆菌, 则认为结果是阳性; 若滤膜法检出水样中不含有大肠杆菌, 而 PCR 法检出水样中有大肠杆菌, 则认为 PCR 法的检测结果为假阳性。

1.4 不同水样的检测

14 个水样均采用氯剂消毒, 编号为 2~15。其中水样 2~8 为自来水; 9~12 取自市政二次管网贮水池(贮水时间约为 24 h); 13~15 取自水厂的清水池。14 个水样均按 1.1 引物和反应体系进行 PCR 扩增, 采用凝胶电泳进行观察和判断。同时进行传统膜滤培养法检测。

2 结果与讨论

2.1 PCR 扩增大肠杆菌 DNA

进行多次平行试验, 由凝胶电泳图像可观察到各株大肠杆菌 DNA 扩增产物的清晰染色条带。根据 Marker 条带的分子质量分布可推知各扩增产物条带位于 300~400 bp 之间, 设计引物 DNA 条带的长度为 353 bps, 可以断定产物即大肠杆菌目的 DNA 片断。这说明按照所设计的引物和 PCR 反应体系进行大肠杆菌目的 DNA 扩增, 并通过凝胶电泳观察, 可以检测大肠杆菌。

2.2 特异性分析

对 12 个菌株进行 DNA 扩增并观察产物的结果表明, 埃希氏大肠杆菌检测结果呈阳性, 临床大肠杆菌由于含有埃希氏大肠杆菌也出现阳性检测结果, 其余菌株检测结果为阴性, 这说明所设计的引物和反应体系对于埃希氏大肠杆菌具有良好的特异性。

2.3 不同消毒工艺水样的检测

将埃希氏大肠杆菌经次氯酸钠、紫外线、臭氧消毒等三种方法灭活后, 用 PCR 方法检测。结果表

明, PCR 方法检测次氯酸钠消毒和臭氧消毒水样的大肠杆菌结果呈阴性, 而紫外线消毒水样大肠杆菌检测结果呈阳性。而采用培养法检测 2~7 号水样时, 结果全部为阴性。

分析认为, 这种现象是因为紫外线消毒破坏大肠杆菌细胞壁或者其他结构, 大肠杆菌已经不具有活性导致培养法检测出现阴性结果; 但紫外线消毒未破坏大肠杆菌 DNA, 其 DNA 结构仍然是完整的, 可以实现 DNA 扩增, 这使得 PCR 法检测得到阳性结果。氯剂和臭氧消毒破坏了大肠杆菌的 DNA 结构, 尤其是 DNA 的靶序列核苷酸, 使 PCR 法检测呈阴性。因此, PCR 法比较适用于氯剂消毒和臭氧消毒的饮用水大肠杆菌的检测, 而不适宜于紫外线消毒的饮用水大肠杆菌检测。

2.4 水样大肠杆菌 PCR 方法检测实例

各水样中大肠杆菌的滤膜培养法与 PCR 法检测结果比较如表 1 所示。

表 1 水样中大肠杆菌的滤膜培养法和 PCR 法检测结果

Tab. 1 Result of *E. coli* in water sample by cultivation and PCR method

序号	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
膜滤法	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
PCR	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

由表 1 可见, 有两个水样(8 和 11)结果出现差异: PCR 法的检测结果为阳性, 而滤膜培养法的结果为阴性。对这 14 个水样, PCR 法和膜滤培养法检测结果的一致率为 85.7%。

所取水样均采用氯剂消毒, 可以排除 PCR 法假阳性。分析认为, 两种检测方法对于少许相同水样出现不同结果, 是由于方法灵敏性不同造成的: 8 和 11 这两个水样中可能含有极少量大肠杆菌, 滤膜培养法因精度差、不敏感而无法检出, 其结果判断为阴性; 而 PCR 法灵敏度高, 可以检出水样中极少量的大肠杆菌, 其结果判断为阳性。

3 结论

① 所设计的引物和反应体系、循环参数可以用于扩增饮用水大肠杆菌 DNA, PCR 方法具有良好的特异性。

② PCR 法检测大肠杆菌, 比较适宜于氯剂消毒和臭氧消毒的饮用水试样; 而对于经紫外线消毒的饮用水试样, 则容易出现假阳性结果。

③ PCR 法检测饮用水中大肠杆菌,与常规方法(滤膜培养法)有较好的一致性,分析时间短(4 ~ 5 h),灵敏度更高。

2002.

[2] 林稚兰,黄秀梨. 现代微生物学与实验技术[M]. 北京:科学出版社,2002.

参考文献:

[1] Robert F Weaver. 分子生物学[M]. 北京:科学出版社,

电话:(010)66975504 (023)68571183

E-mail:cq_mage@163.com

收稿日期:2004-03-01

· 技术交流 ·

供水泵站节能管理措施

秦港供水泵站负责整个秦皇岛港务集团的生产、生活供水,配备有两台 250S-65 水泵、两台 IS200-150-400 水泵。止回阀为普通旋启式,停泵水锤冲击波使止回阀经常损坏、严密性差,泵房压力水可通过非工作水泵严密性差的止回阀回流,造成水泵总出水量大于泵站供水量,产生浪费。2001 年平均耗电为 $0.236 (\text{kW} \cdot \text{h})/\text{m}^3$ 。采用二氧化氯消毒,控制清水池出水余氯为 $0.9 \sim 1.1 \text{ mg/L}$,管网末梢水余氯 $\geq 0.05 \text{ mg/L}$,手动标定加药量。2001 年消毒成本为 $0.05 \text{ 元}/\text{m}^3$,与国内同类企业比较消毒成本相对较高。

1 节能措施

① 提高清水池水位,降低水泵扬程

将圆形清水池分成 a、b、c 三格,其中 b 格作为水泵吸水井,c 格作为调蓄水量用。a 格与 c 格顶部采用溢流孔连接,c 格底部利用单向出水管拍门与 b 格连接,a 格底部利用出水管与 b 格连接。原水首先进入 a 格,并通过底部出水管进入 b 格,当 a 格、b 格水位达到高限时,通过 a 格溢流孔流入 c 格调蓄水量;当进水少时,c 格水可通过出水管拍门流入 b 格。两根出水管的出流量可根据水位自动调节,这样,水泵吸水井始终保持高水位。加氯点设在 b 格吸水井,加氯点至泵站出水停留时间为 48 min,满足规范中“不少于 30 min”的要求。

② 更新水泵出水管止回阀,增加回流判断装置

使用新式消声止回阀,减少止回阀阻力,降低泵站噪音。在止回阀与水泵出水管间增加一泄水阀以判断止回阀的回流情况,并利用电磁阀、水流指示器、时间继电器和报警器进行自动监测,及时发现止回阀损坏情况。

③ 用微机监测水泵运行效率,及时发现水泵故障

采用计算机系统将水泵流量、扬程实际参数转换成电信号,通过现有内部网络远传到生产调度中心,定时显示实际运行曲线,自动判断曲线偏离程度,及时发现水泵故障。

④ 增设管道中间加氯点,降低消毒成本

在供水主干管中间偏末梢处设置中间加氯点,可以降低泵房出水加药浓度。该措施相当于泵房出水加药浓度随着水的流动不断消耗掉之前再次补氯。根据测试,在泵站投加浓度为 0.6 mg/L ,中间点投加浓度为 $0.2 \sim 0.3 \text{ mg/L}$,可满足要求。

⑤ 增设自动投药系统,全屏显示消毒情况。

2 实施效果

2002 年 3 月实施节能措施以来,取得了明显的经济效益和社会效益。单位电耗降至 $0.203 (\text{kW} \cdot \text{h})/\text{m}^3$,消毒成本降至 $0.035 \text{ 元}/\text{m}^3$,以供水 $550 \times 10^4 \text{ m}^3/\text{a}$ 、电价为 $0.58 \text{ 元}/(\text{kW} \cdot \text{h})$ 计,可节省运行电费 10.53 万元/a、消毒费用 8.25 万元/a,共计 18.78 万元/a。同时,降低消毒剂用量可延长管网使用寿命,降低供水浊度,同时减少饮用水中消毒副产物含量。

(秦皇岛港务集团有限公司 张玉祥 供稿)