

DOI:10.19853/j.zgjsps.1000-4602.2020.21.007

供水管网中耐氯菌的分离鉴定及特性分析

褚福敏, 孙韶华, 逯南南, 王明泉, 赵清华, 贾瑞宝
(山东省城市供排水水质监测中心, 山东 济南 250013)

摘要: 供水管网中的耐氯菌筛查及特性分析在饮用水微生物安全评估方面具有重要意义。基于传统微生物培养技术,提出了一种供水管网耐氯菌筛选分离方法,并从某市引黄供水管网中成功分离到一株耐氯菌——土地戈登氏菌(*Gordonia terrae*),该菌株为条件致病菌,革兰氏阳性,好氧。该菌株的耐氯性较大肠埃希氏菌显著增强,2.5 mg/L 余氯在2 h内无法将浓度为 10^7 CFU/mL的土地戈登氏菌(*Gordonia terrae*)全部灭活,灭活率仅为3个对数去除率,相同消毒条件下,大肠埃希氏菌在消毒剂作用20 min后基本全部被灭活。供水管网中耐氯菌的出现对水厂现行消毒工艺提出了新的挑战。

关键词: 供水管网; 耐氯菌; 土地戈登氏菌; 分离; 鉴定

中图分类号: TU991 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4602(2020)21-0042-05

Isolation, Identification and Characteristic Analysis of Chlorine-resistant Bacteria in Urban Water Supply Pipe Network

CHU Fu-min, SUN Shao-hua, LU Nan-nan, WANG Ming-quan, ZHAO Qing-hua,
JIA Rui-bao

(Shandong Province City Water and Drainage Water Quality Monitoring Center, Jinan 250013, China)

Abstract: Screening and characterization of chlorine-resistant bacteria in urban water supply pipe network are of great significance in microbial safety assessment of drinking water. Based on traditional microbial culture technology, a method for screening and isolating chlorine-resistant bacteria in urban water supply pipe network was proposed, and a chlorine-resistant bacterium—*Gordonia terrae*, was successfully isolated from a water supply pipe network of Yellow River Diversion Project. The strain was a conditional pathogen, Gram-positive and aerobic. The chlorine resistance of this strain was significantly higher compared with that of *Escherichia coli*. Within 2 hours, 2.5 mg/L of residual chlorine could not inactivate all the *Gordonia terrae* with a concentration of 10^7 CFU/mL, and the inactivation rate was only 3lg. Under the same disinfection conditions, *Escherichia coli* was basically inactivated after 20 minutes of disinfectant action. The emergence of chlorine-resistant bacteria in water supply pipe network poses a new challenge to the current disinfection process in water treatment plants.

Key words: water supply pipe network; chlorine-resistant bacteria; *Gordonia terrae*; isolation; identification

基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2017ZX07501-003、2017ZX07502-003-06、2017ZX07502-002); 山东省泰山学者建设工程专项(ts201712084); 泉城“5150”引才倍增计划项目; 山东省自然科学基金资助面上项目(ZR2017MC047)

通信作者: 贾瑞宝 E-mail: jiaruibao1968@163.com

微生物安全性一直是饮用水处理所关注和必须保障的基本目标,消毒是实现这一目标的最后屏障^[1]。目前氯消毒依然是国内水厂广泛采用的消毒工艺,加氯的过程也是对细菌耐氯性选择的过程。城市供水管网中长期存在的细菌逐渐对消毒剂产生了抗性^[2],并在管网中大量繁殖而成为优势菌^[3],这部分细菌通常称为“耐氯菌”^[4]。存在于供水系统中的耐氯菌对饮用水的微生物学安全性构成了威胁,一方面有些耐氯菌本身就是病原菌或者条件致病菌,如分枝杆菌^[5]、鞘氨醇单胞菌^[6]、铜绿假单胞菌^[7]、金黄葡萄球菌^[8]等;另一方面,耐氯菌导致氯消毒失效,引发供水管网中微生物的再生长,降低了供水管网的生物稳定性,从而引起用户龙头水菌落总数、色度、浊度等水质指标超标^[9]。

管网中的细菌在某些因子(如低温、紫外、超声等)作用下,诱导进入不可培养但又具活性状态,这种状态的细菌生长活性降低、代谢速率减慢,但对外界不利因素的耐受性显著提高,而且仍保持致病性^[10-11]。供水管网中的耐氯菌长期处于一个贫营养且余氯浓度较高的极端环境体系下,大量研究表明水体中可培养的细菌数量不足其总量的10%,现行菌落总数的检测方法远远不能体现水体中真实的细菌数量分布情况。现行菌落总数检测的国标方法在耐氯菌检验过程中存在较大局限性,大大限制了对供水管网中耐氯菌的研究。此外,具有消毒剂抗性的微生物,通常对抗生素也有一定的抗性,而且有研究显示此类微生物临床感染的几率更大,也更难控制^[12]。因此,城市供水系统中耐氯菌的分离鉴定以及耐氯菌株的系统研究,对水厂消毒技术优选及保障城市饮用水安全具有重要的社会意义和广泛的应用前景。

1 实验部分

1.1 样品来源

样品来源为某市引黄供水系统管网末梢主体水。样品采集与保存按照 GB/T 5750.12—2006 中微生物指标要求执行。

1.2 分析方法

异养菌平板计数(HPC):采用 R2A 琼脂培养基平板涂布法进行测定,涂布好的平板置于 22℃ 条件下培养 7 d 计数;实验中所用消毒剂为次氯酸钠,消毒剂浓度用余氯表示,余氯采用便携式余氯分析仪测定;革兰氏染色镜检:采用革兰氏染色试剂盒染色

后,在显微镜下观察菌体着色情况;菌体形貌观察:培养好的菌体先用 2.5% 戊二醛固定 4 h,然后用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液漂洗,再经酒精梯度(30%、50%、70%、80%、100%)脱水,其中 100% 酒精脱水 2 次、每次 10 min,接着采用乙酸异戊酯置换,50% 置换一次,100% 置换两次,最后放在二氧化碳临界点干燥器中干燥,并用离子镀金仪喷金镀膜,将喷金后的样品置于扫描电镜下观察。

1.3 耐氯菌的分离鉴定方法

1.3.1 菌株富集培养

水样经 0.22 μm 聚碳酸酯膜富集浓缩,然后用生理盐水洗脱,于 3 500 r/min 下离心,弃上清液,收集菌体;收集到的菌体加入 5 mL 营养肉汤并置于 37℃ 隔水式恒温培养箱中培养 24 h 进行增菌;培养后的菌液在 3 500 r/min 下离心 10 min,弃上清液后加 10 mL 生理盐水涡旋制备成菌悬液备用。

1.3.2 耐氯菌的筛选、分离纯化

制备好的菌悬液加入次氯酸钠溶液至余氯浓度为 9 mg/L,分别在作用 30、60、120 min 时进行异养菌平板计数及余氯浓度的测定,保持实验结束时余氯浓度 >0.5 mg/L;记录菌落形态特征及数量,此时平板上的菌落均有一定耐氯性。

挑取平板上的菌落至新的 R2A 平板上划线纯化,置于 22℃ 条件下培养 7 d;培养后,挑取分离较好的单菌落放至营养肉汤(37℃)中培养 24 h 增菌,增菌后再进行划线分离纯化;重复上述“划线-增菌-划线”过程 3 次。纯化好的菌株采用磁珠冻存管置于 -80℃ 下保存,供后续研究使用。

1.3.3 耐氯性验证

初筛获得的菌株有一定耐氯性,对初筛的菌株进行进一步耐氯性验证。挑取分离好的单菌落加入到 5 mL 营养肉汤中,于 37℃ 下培养 24 h;培养后的菌液经 3 500 r/min 离心 10 min 弃上清液,加入 10 mL 生理盐水涡旋制备成菌悬液备用。向上述菌悬液中加入次氯酸钠溶液至余氯浓度为 15 mg/L,耐氯性验证过程中,每 10 min 测定 1 次余氯浓度,确保实验结束时余氯浓度不小于 0.5 mg/L;作用 120 min 后加入 100 μL 浓度为 5 g/L 的硫代硫酸钠终止反应,此时取 100 μL 菌液进行 HPC 测定。培养结束后,若平板上有菌落检出,则表示该菌株通过耐氯性验证,具有较强耐氯性。水体中耐氯菌筛选分离流程见图 1。

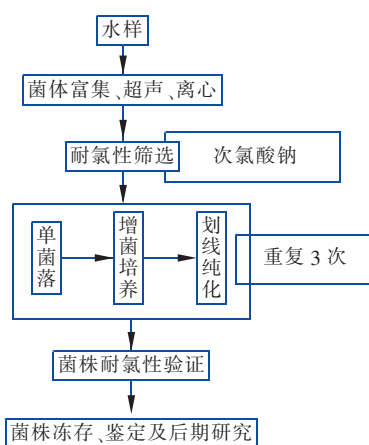


图1 水中耐氯菌筛选分离流程

Fig.1 Flow chart of chlorine-resistant bacteria screening and isolation in water

1.4 菌株鉴定

观察菌落形态并通过扫描电镜观察菌体的形态、大小、有无鞭毛等特征,对菌株进行形态学鉴定。

参照《微生物学实验指导》和《伯杰氏细菌鉴定手册》对细菌进行生理生化实验,分析其生理生化特征,对菌株进行生理生化鉴定。

用试剂盒提取菌株的DNA,采用通用引物进行扩增,然后对扩增产物进行测序,并将16S rRNA基因所测得的双向序列进行拼接,然后上传到基因库中获取登录号,此项工作委托上海生工生物有限公司完成。

2 结果与讨论

2.1 初筛结果

初筛获得9株具有耐氯性的菌株,通过耐氯性验证的菌株为6株,这6株菌株可能具有更强的耐氯性。消毒剂作用120 min的HPC平板上仅筛选出1株菌,且该菌株经过耐氯性验证后仍有细菌存活,初步判定该菌株耐氯性较强,因此选取该菌株进行分析研究,菌株编号为1#d。该菌落为橙红色、圆形,表面光滑湿润、菌落凸起,直径为1~3 mm,边缘整齐平滑,生长缓慢。扫描电镜结果显示,菌体呈杆状,无鞭毛,直径约为0.7 μm,大小为(0.5~0.7) μm × (1.2~2.0) μm。

通过生理生化验证,菌株1#d为革兰氏阳性菌,好氧,生长温度为20~45℃,适宜生长的pH值为6.5~7.2,乳糖发酵实验不产酸、不产气,产氨实验为阴性,氧化酶阴性、过氧化氢酶阳性。

菌株的16S rRNA基因长度为1470 bp,将测序

结果在核酸数据库NCBI中进行比对,并选取相应的模式菌株进行16S rRNA基因序列分析,用MEGA 4.0软件构建系统发育树。结果显示,菌株1#d的基因序列同多株戈登氏菌(*Gordonia*)的基因序列有高度同源性,结合其生理生化特征及形态特征分析,确定该菌株为土地戈登氏菌(*Gordonia terrae*)。

2.2 菌株特性分析

2.2.1 反应体系对菌株耐氯能力的影响

分别用生理盐水和磷酸盐缓冲液(PBS)作为反应体系,制备菌浓度为 10^6 CFU/mL的实验样品,加入同等剂量的次氯酸钠,测定pH值变化情况,并对作用30 min的样品分别进行HPC测定,具体数据见表1。可以看出,加入次氯酸钠后,生理盐水制备的样品pH值变化较大,由原来的弱酸性变为弱碱性,PBS缓冲液制备的样品pH值则波动不大。消毒剂作用30 min后HPC结果显示,消毒剂在碱性体系中对细菌的灭活效果优于酸性或中性条件下的灭活效果,这与Isaac等^[13]的研究结论一致。不同的反应体系或者外部生存环境,均会对菌株的耐氯性产生影响。PBS缓冲液对菌体受到的外部刺激有一定的缓冲作用,因此该反应体系一定程度上增强了菌株的耐氯性;贫营养环境有利于激发菌株的耐氯性^[14],反之,经过多次传代培养的细菌,耐氯性可能存在退化的现象。

表1 不同反应体系加氯前后pH值、HPC的变化

Tab.1 Changes of pH and HPC in different reaction systems before and after chlorination

项 目	pH 值		HPC/(CFU · mL ⁻¹)	
	加氯前	加氯后	加氯前	氯作用30 min后
生理盐水	6.65	8.76	10^6	0
PBS缓冲液	7.33	7.40	10^6	10^2

对实验菌株进行贫营养驯化更能反映菌株固有耐氯性,因此在后续实验中采用了菌株驯养以及PBS缓冲液作为反应体系进行菌株耐氯性及灭活特性研究。

2.2.2 不同消毒剂浓度对菌株的灭活效果

以PBS缓冲液为反应体系,制备菌浓度为 10^5 CFU/mL的实验样品2份,加氯浓度分别为1 mg/L和5 mg/L。分别在作用0、5、10、20、30、60、120 min时取出1 mL样品加入100 μL浓度为5 g/L的硫代硫酸钠溶液终止反应,并进行HPC测定,结果见图2(初始HPC数量用 N_0 表示,作用 t 时间后HPC数量

用 N_t 表示)。

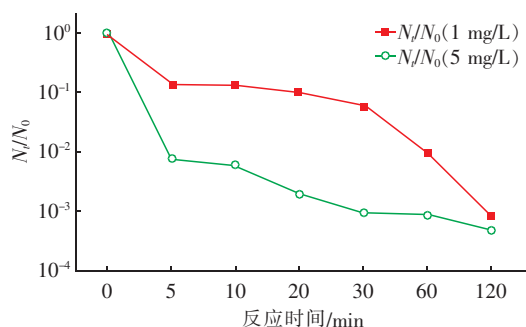


图2 不同消毒剂浓度对菌株的灭活效果

Fig. 2 Inactivation effect of different disinfectant concentrations on strains

从图2可知,消毒剂加入后5 min,细菌快速被灭活,消毒剂浓度越高,细菌灭活速率越快,但消毒剂作用120 min后,两种消毒剂浓度的样品均未完全灭活菌株。5 mg/L的氯在30 min内可将菌株灭活3个对数去除率,此后细菌的灭活率变化不大;1 mg/L的氯在作用120 min时可将菌株灭活3个对数去除率。氯对菌株的灭活效果与消毒剂浓度及作用时间密切相关。

2.2.3 菌株耐氯能力的初步测定

为了更好地评价土地戈登氏菌(*Gordonia terrae*)的耐氯能力,以大肠埃希氏菌标准菌株(ATCC8739)为参照菌株进行实验。在保持初始菌浓度(约为10⁷ CFU/mL)一致、相同消毒剂浓度(约为2.5 mg/L)条件下,分别计数消毒剂加入0、5、10、20、30、60、120 min后两株菌的存活数量,结果如图3所示。

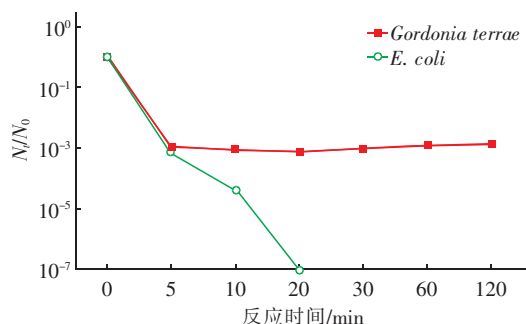


图3 土地戈登氏菌与大肠埃希氏菌的耐氯性比较

Fig. 3 Comparison of chlorine-resistance between *Gordonia terrae* and *E. coli*

图3显示,在消毒剂作用20 min后,大肠埃希氏菌基本全部被灭活;土地戈登氏菌(*Gordonia*

terrae)在前5 min灭活效果明显,5~60 min时灭活率变化不大,60~120 min时存活细菌量反而呈上升趋势,这可能与消毒剂浓度的快速消耗以及细菌的修复功能^[15]有关。

3 结论

基于传统微生物培养划线技术和分子生物学技术,建立了一种供水管网中耐氯菌的分离鉴定方法,采用该方法从供水管网中分离到一株土地戈登氏菌(*Gordonia terrae*)。该菌为革兰氏阳性菌,杆状,生长速度较慢,适宜生长的温度较低,在营养琼脂平板上生长的速度高于R2A平板。

细菌的耐氯性随环境因素的改变而变化。研究结果显示,细菌耐氯性分析过程宜采用PBS缓冲液作为反应体系,同时对菌株进行贫营养驯化,以激发菌株固有耐氯性。在上述实验条件下,土地戈登氏菌(*Gordonia terrae*)对氯的耐受性明显高于大肠埃希氏菌。

目前国内对于供水管网中存在的耐氯菌研究还不多,且耐氯菌的分离鉴定没有标准方法,本研究提出了一种供水管网中耐氯菌分离鉴定方法,为供水管网中耐氯菌筛查及污染状况分析调研提供了一定的理论基础。随着人们对饮用水安全要求的提高,微生物安全性也越来越受到重视,因此探索和尝试新型消毒技术及消毒工艺也迫在眉睫。

参考文献:

- [1] 刘文君. 高度重视饮用水微生物学安全性强化紫外线消毒技术研究与应用[J]. 给水排水, 2011, 37(8): 1-5.
Liu Wenjun. Pay intense attention to microbiology security of drinking water, enhance the research and application of UV disinfection technology[J]. Water & Wastewater Engineering, 2011, 37(8): 1-5 (in Chinese).
- [2] Wen G, Xu X Q, Huang T L, et al. Inactivation of three genera of dominant fungal spores in groundwater using chlorine dioxide: effectiveness, influencing factors, and mechanisms[J]. Water Res, 2017, 125: 132-140.
- [3] Li D, Zeng S Y, Gu A Z, et al. Inactivation, reactivation and regrowth of indigenous bacteria in reclaimed water after chlorine disinfection of a municipal wastewater treatment plant[J]. Journal of Environmental Sciences, 2013, 25(7): 1319-1325.

- [4] Sun W J, Liu W J, Cui L F, *et al.* Characterization and identification of a chlorine-resistant bacterium, *Sphingomonas* TS001, from a model drinking water distribution system [J]. *Science of the Total Environment*, 2013, 458/460C: 169 – 175.
- [5] Chen Y Q, Chen C, Zhang X J, *et al.* Inactivation of resistant *Mycobacteria mucogenicum* in water: chlorine resistance and mechanism analysis [J]. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2012, 25(2): 230 – 237.
- [6] 陈雨乔, 段晓笛, 陆品品, 等. 给水管网中耐氯性细菌的灭活特性研究 [J]. *环境科学*, 2012, 33(1): 104 – 109.
Chen Yuqiao, Duan Xiaodi, Lu Pinpin, *et al.* Inactivation of the chlorine-resistant bacteria isolated from the drinking water distribution system [J]. *Environmental Science*, 2012, 33(1): 104 – 109 (in Chinese).
- [7] Monika S, Joanna S, Marie L, *et al.* Multi-species biofilms defined from drinking water microorganisms provide increased protection against chlorine disinfection [J]. *Biofouling*, 2013, 29(8): 917 – 928.
- [8] Zhang M L, Chen S, Gnegy M, *et al.* Environmental strains potentially contribute to the proliferation and maintenance of antibiotic resistance in drinking water: A case study of *Cupriavidus metallidurans* [J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 643: 819 – 826.
- [9] 祝泽兵, 吴晨光, 钟丹, 等. 寒区湖库型水源供水系统中耐氯菌的生长 [J]. *哈尔滨工业大学学报*, 2015, 47(8): 1 – 6.
Zhu Zebing, Wu Chenguang, Zhong Dan, *et al.* The growth of chlorine resistant bacteria in water supply sourced from lakes and reservoirs in cold region [J]. *Journal of Harbin Institute of Technology*, 2015, 47(8): 1 – 6 (in Chinese).
- [10] 李林云, 谭璐, 崔玉晓, 等. 饮用水细菌耐药性及其健康风险研究进展 [J]. *生态毒理学报*, 2018, 13(2): 1 – 12.
Li Linyun, Tan Lu, Cui Yuxiao, *et al.* Bacterial resistance and human health risk in drinking water [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2018, 13(2): 1 – 12 (in Chinese).
- [11] Marek B, Urszula C. Spores and vegetative cells of phenotypically and genetically diverse *Bacillus cereus sensu lato* are common bacteria in fresh water of Northeastern Poland [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2017. DOI: 10.1139/cjm-2017-0337.
- [12] Khan S, Beattie T K, Knapp C W. Relationship between antibiotic- and disinfectant-resistance profiles in bacteria harvested from tap water [J]. *Chemosphere*, 2016, 152: 132 – 141.
- [13] Isaac O, Maddila S, Lin J, *et al.* Chlorine dioxide oxidation of *Escherichia coli* in water—A study of the disinfection kinetics and mechanism [J]. *Journal of Environmental Science and Health*, 2017, 52(7): 1 – 9.
- [14] 李伟英, 周艳彦, 张骏鹏, 等. 营养物质和氯对饮用水中细菌再生长的影响 [J]. *哈尔滨工业大学学报*, 2017, 49(2): 70 – 76.
Li Weiying, Zhou Yanyan, Zhang Junpeng, *et al.* Effects of nutrients and chlorine on bacterial regrowth in drinking water [J]. *Journal of Harbin Institute of Technology*, 2017, 49(2): 70 – 76 (in Chinese).
- [15] 王秀娟, 朱琳, 陈中智, 等. 细菌“活的不可培养状态”的生态意义及研究进展 [J]. *微生物学通报*, 2008, 35(12): 1938 – 1942.
Wang Xiujuan, Zhu Lin, Chen Zhongzhi, *et al.* Ecological significance and processes in research of the viable but nonculturable state in bacteria [J]. *Microbiology China*, 2008, 35(12): 1938 – 1942 (in Chinese).



作者简介: 褚福敏 (1985 –), 女, 山东菏泽人, 本科, 工程师, 研究方向为水中微生物监测技术研究及应用。

E-mail: chufumin3908@163.com

收稿日期: 2020 – 03 – 02