

# 矿泉水水井取水管道内壁附着物分析研究\*

张菊梅 吴清平 郭伟鹏 吴慧清 王元平

(广东省微生物研究所广东省菌种保藏与应用重点实验室 广州 510070)

**摘要:** 矿泉水水井因污染而在取水管道内壁形成大量的褐色粘液状粘泥, 显微形态观察表明, 典型样品中的粘泥主要为细菌污染大量繁殖形成的生物膜。样品经 HCl 处理后, 其中黄褐色晶体、霉菌样丝状体消失, 显示晶体和丝状体为金属沉积物; 样品滴加亚铁氰化钾和 HCl, 出现普鲁士蓝沉淀, 证明了样品中的金属沉积物是含铁物质, 从而推断取水管内壁附着物主要为铁细菌大量繁殖, 氧化铁、沉积铁而形成的生物膜。从生物膜中取样进行微生物分离培养, 铁细菌检出阳性, 固体培养物同样与亚铁氰化钾反应出现普鲁士蓝沉淀, 且显微形态与样品中微生物一致, 进一步证明取水管内壁附着物中污染微生物主要为铁细菌。

**关键词:** 矿泉水, 管道附着物, 铁细菌

**中图分类号:** Q93-3      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0253-2654 (2002) 05-0052-05

## ANALYSIS OF BIOFILM FORMED IN PIPELINE OF MINERAL WATER'S WELL

ZHANG Ju-Mei WU Qing-Ping GUO Wei-Peng WU Hui-Qing WANG Yan-Ping

(Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Laboratory of  
Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou 510070)

**Abstract:** The brown slime inside pipeline of the polluted mineral water's well was analyzed. It was confirmed that the brown slime was a biofilm formed mainly by growth of bacteria contaminant, using microscope analysis. After treated with HCl, the brown crystals and mycelioid matter presented in slimes disappeared. It was verified these were metal deposits. The samples produced Prussia blue deposits by dropping  $K_4Fe(CN)_6$  and HCl, which proved that the metal deposits were iron compound. Also it was believed the biofilm was produced by growth of iron bacteria, mixed with deposits of iron compound. The iron bacteria have been isolated from the slimes and cultured in the laboratory. The colony on agar plate also produced Prussia blue deposits after treated with  $K_4Fe(CN)_6$  and HCl. The cell's form of pure culture was the same as that in the samples by electronmicroscope analysis. Therefore, It indicated that the bacteria on biofilm inside pipeline were iron bacteria mainly.

**Key words:** Mineral water, Biofilm inside pipeline, Iron bacteria

饮用天然矿泉水是在特定的地质条件下形成的地下深部循环的水, 是一种宝贵的

\* 广东省重点科技攻关项目

收稿日期: 2001-07-05, 修回日期: 2002-06-25

矿产资源。随着生活水平的提高、消费观念的转变及水质污染的加剧,极大地促进了饮用水产业的迅猛发展。一般情况下,深层地下水不含微生物,但是特定的地层结构和不当的取水工艺可能造成矿泉水水井受到特定微生物类群的污染,甚至在取水管道内壁形成生物膜,在矿泉水厂生产过程中造成水处理过滤系统的堵塞,增大了水处理的难度和生产成本,直接影响到矿泉水的正常生产和产品质量。为了清除这些污染物,有些厂家分别用洁净压缩空气和稀盐酸对取水管道内壁和水井进行吹洗,但并未奏效,一段时间后,污染的情况依然重现,并且有愈来愈严重的发展趋势,故从卫生、安全和生产的角度考虑,均迫切需要对取水管道内壁的沉积物进行深入分析,以便寻找相应的解决办法。本文选取地层结构为海洋沉积相的矿泉水水井污染作为典型进行微生物分析,以期对污染问题的解决提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

在夏季选取反复出现乳黄色至黄褐色粘液状污染的矿泉水井取水管道内壁附着物作为代表样进行分析,其中出现黄褐色污染物的水井标为1<sup>#</sup>井,出现乳黄色污染物的水井标为2<sup>#</sup>井。

### 1.2 微生物分离培养

铁细菌的分离培养采用柠檬酸铁铵液体培养基、柠檬酸铁铵琼脂培养基<sup>[1]</sup>;氧化亚铁硫杆菌的分离培养采用 Leathen 液体培养基、Leathen 琼脂培养基<sup>[1]</sup>;化能自养的氧化硫的细菌采用硫化细菌液体培养基<sup>[2]</sup>;普通霉菌、酵母菌的分离培养采用虎红琼脂培养基<sup>[3]</sup>;一般细菌培养采用营养琼脂培养基<sup>[4]</sup>;藻类培养采用藻类液体培养基<sup>[5]</sup>。

### 1.3 菌体外沉积物和杂质的溶解

挑取样品在载玻片上,盖上盖玻片,滴加几滴 2mol/LHCl 在盖玻片的一侧边缘,然后用滤纸在盖玻片另一侧拉引,直到 HCl 中不再呈明显的黄色<sup>[2]</sup>。

### 1.4 样品中铁细菌的定性检测

挑取样品在载玻片上,滴加 10g/L 亚铁氰化钾,盖上盖玻片,同 1.3 法从盖玻片下拉引 2mol/LHCl,观察是否产生普鲁士蓝沉淀<sup>[1]</sup>。

### 1.5 样品显微形态观察

样品经各种处理后,采用光学显微镜和电子显微镜进行形态观察。

## 2 结果

### 2.1 取水管内壁附着物初步分析

1<sup>#</sup>井取水管内壁附着物为一层黄褐色的粘液状粘泥,2<sup>#</sup>井取水管内壁附着物为乳黄色粘液状粘泥,挑取粘泥直接涂片在高倍镜下(400×)观察,1<sup>#</sup>为大量杆菌体、黄褐色晶体,少量圆形细胞、霉菌样丝状体(见图1);2<sup>#</sup>为大量杆菌体,少量黄褐色晶体、无色晶体。因此,初步判断管内壁附着物是以细菌污染为主形成的生物膜。

2.1.1 样品涂片固定,用结晶紫染色液染色,在油镜下观察:1<sup>#</sup>:大量细菌(主要有细长、短粗、椭圆形三种形态),少量圆形细胞(中间着色,周围不着色)和晶体等杂质;2<sup>#</sup>:大量细菌(菌体小,形态比1<sup>#</sup>单一)和杂质(见图2)。

2.1.2 样品直接用电镜观察:因粘液太多,无法看清,故取样品1:1加矿泉水,振

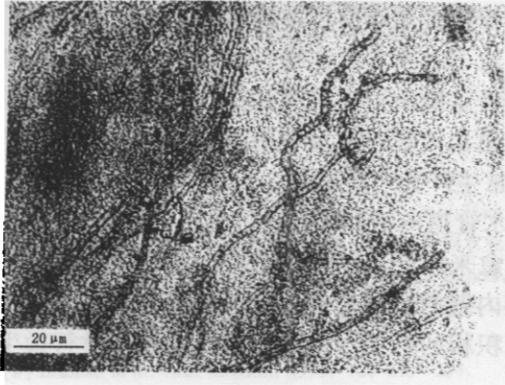


图1 1\*样高倍镜照片(525×)

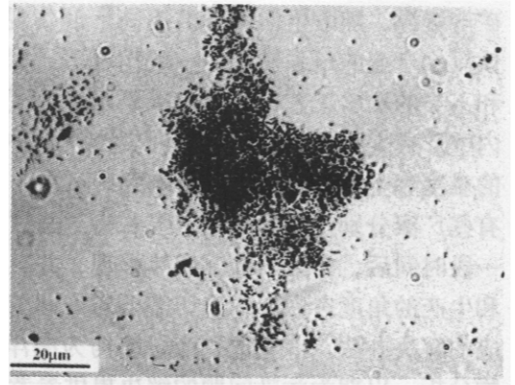


图2 2\*样结晶紫染色照片(600×)

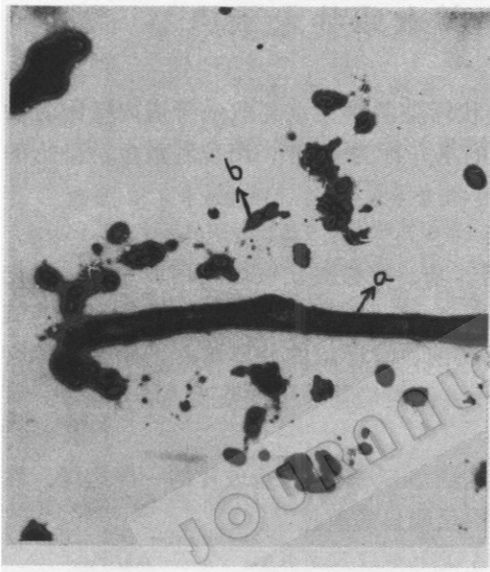


图3 1\*样直接电镜照片(2500×)

a 铁细菌形成的鞘, b 菌体

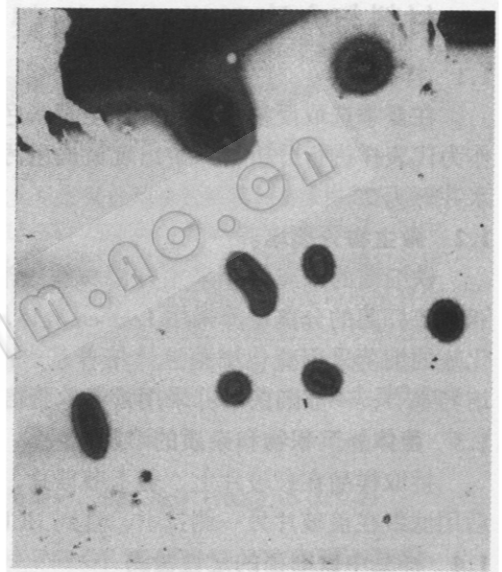


图4 1\*样加HCl洗后电镜照片(3500×)

荡, 2000r/min 离心 2min 去杂质, 再吸取上清进行电镜观察。1\*: 电镜下可见杆状、短杆状、近球形等没有鞭毛的细菌、霉菌样丝状体, 同时有大量的晶体、粘液等杂质(图3); 2\*: 电镜下可见大量没有鞭毛的小杆菌和粘液、晶体等杂质。

**2.1.3 菌体形态的观察:** 样品加 2mol/LHCl 溶解杂质, 分别在高倍镜和电镜下观察, 结果: 1\* 黄褐色晶体等杂质消失, 霉菌样丝状体消失, 视野中为纯净的细菌, 主要有细长、短粗、椭圆形三种形态(图4); 2\* 晶体等杂质消失, 可见大量形态比 1\* 单一的杆菌。

**2.1.4 样品中铁细菌的定性检测:** 1\*、2\* 样品均有普鲁士蓝的沉淀产生, 证明附着物主要为铁细菌氧化和沉积铁引起的粘泥。

## 2.2 微生物分离培养

从样品初步分析的结果可知, 1\*、2\* 取水管内壁附着物是以铁细菌污染为主形成的生物粘泥, 因此进行铁细菌、硫细菌等化能自养菌和普通霉菌、细菌、单细胞藻类的分离培养(表1、表2), 培养结果显示 1\*、2\* 样中微生物主要为铁细菌。

表 1 1<sup>#</sup> 样微生物培养结果

培养基	培养温度和时间	结 果
柠檬酸铁铵液体培养基	30℃培养 14d	棕色培养液表层有赭黄色絮花，上部有明显的无色透明层，下部有褐色或黑色沉淀，铁细菌检出阳性。
柠檬酸铁铵琼脂培养基	划线接种，30℃培养 2~5d	菌落红褐色，光滑，湿润，镜检为细长、短粗、椭圆形三种形态的细菌。挑取菌苔滴加 10g/L 的亚铁氰化钾和 2mol/L 的 HCl，有普鲁士蓝的沉淀产生，铁细菌检出阳性。
Leathen 液体培养基	30℃培养 14d	未检出氧化亚铁硫杆菌
Leathen 琼脂培养基	划线接种，30℃培养 14d	未检出氧化亚铁硫杆菌
硫化细菌液体培养基	30℃培养 14d	未检出硫化细菌
虎红琼脂培养基	30℃培养 7d	未检出霉菌、酵母菌
营养琼脂培养基	30℃、37℃分别培养 3~7d	无细菌生长
藻类液体培养基	25℃~30℃室温光照培养 15d	未检出藻类

表 2 2<sup>#</sup> 样微生物培养结果

培养基	培养温度和时间	结 果
柠檬酸铁铵液体培养基	30℃培养 14d	棕色培养液表层有赭黄色絮花，上部有明显的无色透明层，下部有褐色或黑色沉淀，铁细菌检出阳性。
柠檬酸铁铵琼脂培养基	划线接种，30℃培养 2~5d	菌落红褐色，光滑，湿润，镜检为细杆菌。挑取菌苔滴加 10g/L 的亚铁氰化钾和 2mol/L 的 HCl，有普鲁士蓝的沉淀产生，铁细菌检出阳性。
Leathen 液体培养基	30℃培养 14d	未检出氧化亚铁硫杆菌
Leathen 琼脂培养基	划线接种，30℃培养 14d	未检出氧化亚铁硫杆菌
硫化细菌液体培养基	30℃培养 14d	未检出硫化细菌
虎红琼脂培养基	30℃培养 7d	未检出霉菌、酵母菌
营养琼脂培养基	30℃、37℃分别培养 3~7d	无细菌生长
藻类液体培养基	25℃~30℃室温光照培养 15d	未检出藻类

3 讨论

从样品显微形态观察发现，1<sup>#</sup>、2<sup>#</sup>井水管内壁附着物主要为细菌污染大量繁殖形成的生物膜。样品经 HCl 处理后，其中黄褐色晶体、霉菌样丝状体消失，显示晶体和丝状体为金属沉积物；样品滴加亚铁氰化钾和 HCl，出现普鲁士蓝沉淀，证明了样品中的金属沉积物是含铁物质，从而推断 1<sup>#</sup>、2<sup>#</sup>井水管内壁附着物主要为铁细菌大量繁殖，氧化铁、沉积铁而形成的生物膜。实验室进行的微生物分离培养显示，铁细菌检出阳性，固体培养物同样与亚铁氰化钾反应出现普鲁士蓝沉淀，且显微形态与样品中微生物一致，进一步证明水管内壁附着物中污染微生物主要为铁细菌。

凡在菌体外鞘沉积有黄褐色 Fe (OH)<sub>3</sub> 或原生质内含铁粒或铁离子的细菌通称为铁细菌。铁的氧化细菌分布于含铁水体、稻田、沼泽等地的淤泥中，常见的有鞘铁菌、锈色嘉利翁氏菌、多孢泉发菌、氧化亚铁亚铁杆菌及赭色纤发菌等<sup>[1,2]</sup>。按照常规的细菌分类法，这些微生物属于不同的目、科和属<sup>[6]</sup>。样品直接镜检和实验室分离培养结果显示：1<sup>#</sup>井水管内壁铁细菌主要属于单细胞无鞭毛的鞘铁菌属和细枝发菌属；2<sup>#</sup>井

水管内壁铁细菌主要属于单细胞的鞘铁菌属<sup>[2,6]</sup>。

铁细菌可以利用溶解性  $\text{Fe}^{2+}$ ，氧化成不溶性的  $\text{Fe}^{3+}$ ，沉积在菌体外形成一层鞘或形成铁粒留在原生质内，水中沉积的铁和锰与不断增生的菌体粘合在一起而形成生物膜<sup>[1]</sup>。另外，由于铁细菌吸收水中  $\text{Fe}^{2+}$ ，从而促使管道的铁溶于水中，加速管道系统的腐蚀。在矿泉水生产中，由于铁细菌的存在，直接影响到水质，使之易产生 Fe、Mn 沉淀；水中的铁细菌进入过滤系统，日积月累，形成生物膜，造成过滤器堵塞，增大了水处理的难度和生产成本，其危害对矿泉水生产不容忽视<sup>[7]</sup>。

### 参 考 文 献

- [1] 俞毓馨, 吴国庆, 孟宪庭主编. 环境工程微生物检验手册. 北京: 中国环境科学出版社, 1990.
- [2] ASTM D932-85. Standard Test Method for Iron Bacteria in Water and Water-Formed Deposits. Annual Book of ASTM Standards V11.02, ASTM International, USA, 1997.
- [3] GB4789-94. 食品卫生检验方法微生物学部分. 北京: 中国标准出版社, 1995.
- [4] GB8538-95. 饮用天然矿泉水检验方法. 北京: 中国标准出版社, 1996.
- [5] 华汝成. 单细胞藻类的培养与利用. 北京: 农业出版社, 1986.
- [6] 伯杰细菌鉴定手册(第八版). 北京: 科学出版社, 1984.
- [7] 李正明, 吴寒编. 矿泉水和纯净水工业手册. 北京: 中国轻工业出版社, 2000.