

PET瓶装无气天然矿泉水中污染菌及其系统进化分析

高 雯¹, 胡晓敏², 周帼萍^{1,*}

(1. 武汉轻工大学生物与制药工程学院, 湖北 武汉 430023; 2. 中国科学院武汉病毒研究所, 湖北 武汉 430071)

摘 要: 目的: 了解某一批次聚对苯二甲酸乙二醇酯 (polyethylene terephthalate, PET) 瓶装无气天然矿泉水产生异味的缘由。方法: 首先采用膜过滤结合平板菌落计数法分离和计数污染菌, 16S rRNA序列分析鉴定其为假单胞菌属 (*Pseudomonas* spp.), 再采用假单胞菌属特异性 *rpoB* 引物进行梯度聚合酶链式反应优化扩增条件, 产物进行测序和序列分析将污染菌鉴定到种。结果: 这批产品的主要污染菌是一种2009年从南极分离鉴定的假单胞菌属新种 *P. extremaustralis*。反接实验证实该菌能在天然矿泉水中生长繁殖, 并产生刺激性异味。结论: *P. extremaustralis* 部分细菌能够透过两级串联0.2 μm 过滤器, 耐受中、低压紫外杀菌工艺, 耐低温和低氧压, 能在无任何添加的PET瓶装无气天然矿泉水中生长并产生异味。

关键词: PET瓶装无气天然矿泉水; *Pseudomonas extremaustralis*; 异味; 紫外杀菌; 两级串联0.2 μm 过滤器

Case Analysis of Contaminated Bottled Natural Mineral Water: Isolation and Phylogenetic Analysis of Contaminant Bacteria

GAO Wen¹, HU Xiaomin², ZHOU Guoping^{1,*}

(1. School of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China;

2. Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

Abstract: Objective: To figure out the cause of the occurrence of unpleasant odor in one batch of polyethylene terephthalate (PET) bottled natural mineral water. Methods: Firstly, we counted and isolated strains from the samples by membrane filtration and culture on plate count agar (PCA). Secondly, the main spoilage bacteria were identified as *Pseudomonas* spp. by 16S rRNA analysis. Then gradient PCR was used to optimize the PCR conditions for amplification of *rpoB* gene. The PCR amplified *rpoB* sequence was analyzed. Results: The main pollutant bacteria in this batch of bottled drinking water was found to belong to a new species of *P. extremaustralis*, which was firstly isolated from a temporary pond in Antarctica in 2009. The *rpoB* sequence analysis showed that *P. extremaustralis* spp. was responsible for the occurrence of off-flavor in natural mineral water. When being inoculated back into normal products, it grew well and stink. Conclusion: Some strains of *P. extremaustralis* spp. have the capability of passing through double 0.2 μm -pore-size filters, tolerating ultraviolet sterilization, growing in PET bottled natural mineral water at low temperature and low oxygen content, and giving out an unpleasant odor.

Key words: PET bottled natural mineral water; *Pseudomonas extremaustralis*; odor; ultraviolet sterilization; two-step tandem filtration through 0.2 μm -pore-size filters

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201608035

中图分类号: Q939.97

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2016) 08-0196-05

引文格式:

高雯, 胡晓敏, 周帼萍. PET瓶装无气天然矿泉水中污染菌及其系统进化分析[J]. 食品科学, 2016, 37(8): 196-200.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201608035. <http://www.spkx.net.cn>

GAO Wen, HU Xiaomin, ZHOU Guoping. Case analysis of contaminated bottled natural mineral water: isolation and phylogenetic analysis of contaminant bacteria[J]. Food Science, 2016, 37(8): 196-200. (in Chinese with English abstract)

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201608035. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2015-07-17

基金项目: 中国科学院农业与环境微生物学重点实验室开放研究项目 (2015AEM001)

作者简介: 高雯 (1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为微生物。E-mail: 954215297@qq.com

*通信作者: 周帼萍 (1971—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为食品微生物安全。E-mail: wjczgp@163.com

2009年10月1日实施的GB 8537—2008《饮用天然矿泉水》中关于微生物指标增加了3项,粪链球菌、铜绿假单胞菌和产气荚膜梭菌,删除了1项菌落总数^[1-2]。之前的《饮用天然矿泉水》国家标准要求灌装产品菌落总数低于50 CFU/mL^[2]。为达到这个标准,矿泉水企业普遍采用了臭氧杀菌工艺,但该工艺极易产生溴酸盐,而国际癌症研究中心认为溴酸钾对实验动物有致癌作用,但溴酸盐对人的致癌作用还不能肯定,为此将其列为可能对人致癌的物质。因此,新国标和国际接轨,限定溴酸盐含量不得超过0.01 mg/L,而不再限定菌落总数^[3]。为响应新国标要求,一些新建生产线普遍采用紫外杀菌或无菌过滤工艺替代臭氧杀菌工艺,但是新工艺新设备的推广过程中会遭遇新问题。天然矿泉水中存在着极微细胞ultramicrocells能透过0.2 μm或0.45 μm无菌细菌滤器。曾报道在水源地存在并具有极微细胞形态的有假单胞菌属、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、弧菌属(*Vibrio*)、螺菌属(*Spirillum*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)和鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)。其中某些细菌,如假单胞菌、黄杆菌和鞘氨醇单胞菌,还是某些天然矿泉水源地地方性独特种群之一。在低营养物环境或饥饿状态,饥饿的细胞会形成球形或细长杆菌的极微细胞,它们不仅能透过无菌细菌过滤器还能在极低营养环境中繁殖。矿泉水企业必须认识到“无菌”细菌过滤器不能100%截留矿泉水中的细胞,更值得注意的是极微细胞生长缓慢,检验时容易被忽视或低估。目前没有一种滤器能够截留所有细胞,所以单纯过滤除菌是不足以保证产品的长期稳定性^[4]。

2015年1月,某企业生产的水源地为吉林长白山地区的某一批次聚对苯二甲酸乙二醇酯(polyethylene terephthalate, PET)无气天然矿泉水遭消费者投诉产品有异味。企业召回产品后检验发现该批次有近1/3产品有刺激性异味,有人将其描述为类似臭鸡蛋味,且细菌总数很高(不低于10³ CFU/250 mL)。为分析污染原因,本实验室对变质产品和正常产品进行了比对分析。以期通过本次实验确定污染菌种及其特性,为企业及时采取相应的控制和防治措施,也为行业提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

送检的样品为2015年1月异常批次的5瓶样品编号1~5和膜过滤后培养编号为24、27、28和34的平板计数琼脂(plate count agar, PCA)平板,以及12瓶正常批次样品和膜过滤后培养的编号22的PCA平板。

某矿泉水生产企业生产的PET瓶装天然矿泉水的主要工艺流程为:水源→50 μm过滤→50 μm过滤→超滤

膜超滤→活性炭过滤→1 μm过滤→紫外杀菌→0.45 μm过滤→0.2 μm过滤→紫外杀菌→0.2 μm过滤→成品。

Premix Taq聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)预混试剂、DL2000 DNA Marker、Goldview核酸染料 日本TaKaRa公司;琼脂糖 西班牙Biowest公司;PCA、伊红美蓝琼脂(eosin-methylene blue medium, EMB)、马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA) 北京陆桥技术股份有限公司;Salmonella-Shigella(SS)琼脂 英国Oxoid公司;Lysogeny broth(LB)培养基自制。PCR引物合成和产物测序均由苏州金唯智科技有限公司完成。

1.2 仪器与设备

无菌过滤器(配套0.2 μm滤膜) 德国密理博公司;T100 Thermal Cycler PCR仪 美国Bio-Rad公司;电子舌TS-5000Z(配有DBMS数据库管理系统和APACHE2网络服务器) 日本Insent公司;GeneGenius凝胶图像分析系统 英国Syngene公司。

1.3 方法

1.3.1 样品中微生物的检测、计数、染色观察

采用0.2 μm膜过滤250 mL水样,然后取下滤膜分别贴在PCA/EMB/PDA 3种平板上进行细菌总数/大肠杆菌/霉菌酵母总数计数;分离株在LB培养基上划线分离单菌落用于提取DNA模板;纯化后菌株在EMB和SS平板上划线观察菌落形态。荚膜染色参见文献[5]的方法。

1.3.2 菌裂解液的制备

LB平板划线分离待测菌株,30℃培养24 h。挑取单菌落,加入装有50 μL无菌去离子水的PCR管中,混匀,94℃ 10 min裂解,12 000 r/min离心5 min,收集上清液即菌裂解液,4℃保存。

1.3.3 分离株的16S rRNA和rpoB序列分析

表1 PCR所用引物
Table 1 Primers used for PCR

基因	引物	序列	产物/bp	参考文献
16S rRNA	27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	1 465	[6]
	1492R	5'-ACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'		
rpoB	LAPS	5'-TGGCCGAGAACCAGTTCGCGT-3'	1 247	[7]
	LAPS27	5'-CGGCTTCGTCCAGCTGTGTCAG-3'		

表2 PCR反应体系和条件
Table 2 PCR systems and conditions

基因	反应体系	PCR反应条件
16S rRNA	2×Taq PCR MasterMix 12.5 μL, 引物各2 μL (10 nmol/mL), DNA模板5 μL,加水至50 μL	94℃ 10 min, (94℃ 45 s, 50℃ 45 s, 72℃ 90 s) × 35, 72℃ 7 min
rpoB		94℃ 5 min, (94℃ 20 s, 64~54℃ 5个温度梯度20 s, 72℃ 75 s) ×35, 72℃ 7 min

PCR引物、体系和条件参见表1、2,产物用1%的琼脂糖凝胶电泳分离,Goldenvue染色,凝胶成像分析仪观察PCR扩增结果,产物送苏州金唯智公司测序。序列比对:在<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>进行比对。

1.3.4 反接种验证实验

将污染菌反接种到正常无菌水样中，30℃培养30 d，做嗅觉和电子舌测试。

1.3.5 电子舌测试

水样未做任何处理，直接倒入电子舌专用杯子后，静止3 min，常温检测，采用了酸味、鲜味、咸味、涩味和苦味5种传感器，每个样品重复测定3次。

1.3.6 亚硝酸盐含量测定

依据GB/T 8538—2008《饮用天然矿泉水检验方法》^[8]。

1.3.7 易挥发性成分分析

样品外送采取顶空气相色谱法分析。

2 结果与分析

2.1 样品检测

正常样品平均亚硝酸含量为2 μg/L，而细菌总数异常的样品亚硝酸含量大幅上升，平均达90 μg/L，但尚未超过GB 8537—2008《饮用天然矿泉水》要求，亚硝酸盐含量要低于0.1 mg/L^[1]。顶空气相色谱法分析结果显示硫醚类化合物含量大幅升高。

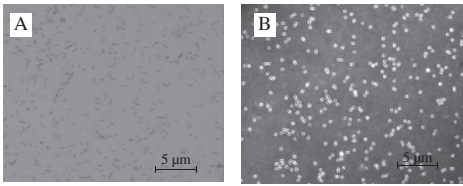
肉眼观察5瓶异常批次样品与正常水样外观无差异，未出现混浊、沉淀、变色等异常，其中4瓶有难以描述的刺激性气味。EMB培养基上有菌落出现，但并非典型的大肠菌群形态，所以大肠杆菌群值和霉菌酵母数未检出，细菌总数和风味见表3。

表3 送检样品的细菌总数和风味
Table 3 Total bacterial counts and flavor of samples

编号	样品	批次	风味	细菌总数	分离株
22	PCA平板	正常批次	正常	560 CFU/250 mL	NMW22
24	PCA平板	异常批次	有异味	>1 000 CFU/250 mL	NMW24
27	PCA平板	异常批次	有异味	>1 000 CFU/250 mL	NMW27
28	PCA平板	异常批次	有异味	>1 000 CFU/250 mL	NMW28
34	PCA平板	异常批次	有异味	>1 000 CFU/250 mL	NMW34
1	瓶装水	异常批次	有异味	>10 000 CFU/mL	NMW1
2	瓶装水	异常批次	有异味	>10 000 CFU/mL	NMW2
3	瓶装水	异常批次	有异味	>10 000 CFU/mL	NMW3
4	瓶装水	异常批次	正常	<5 CFU/mL	
5	瓶装水	异常批次	有异味	>10 000 CFU/mL	NMW5

22号样品是异常批次之前的正常批次中偶然发现个别细菌总数偏高的计数平板，其分离株NMW22与异常批次的分离株明显不同，在PCA平板上菌落形态为白色不透明小菌落，圆而边缘整齐，老熟后微泛黄。显微形态为革兰氏阴性短杆菌，宽约0.2 μm，长0.2~1 μm。初始菌体均一，老熟后细胞内部出现着色不均一的特点（图1A）。虽然不具备产荚膜细菌的光滑型菌落典型特征，但是荚膜染色结果类似NMW27，也是产荚膜菌。

从1、2、3、5号成品水样中分离的菌株和24、27、28、34号PCA平板中的分离株菌落形态和显微形态很相似初步判断为同类菌株。以NMW27为例，革兰氏阴性短杆菌，宽约0.2~0.5 μm，长1.5~2 μm。PCA上菌落圆整、细小、扁平而半透明；SS培养基上近乎无色，边缘圆整而透明，中心有乳头样凸起，直径仅为1 mm的细小菌落；EMB上为紫色直径为2~3 mm小菌落，不湿润不透明，边缘不规整，表面发干，轻微发皱。菌落在PCA平板上有光滑型菌落的特征（表面光滑发黏），经荚膜染色证实为产荚膜菌（图1B）。

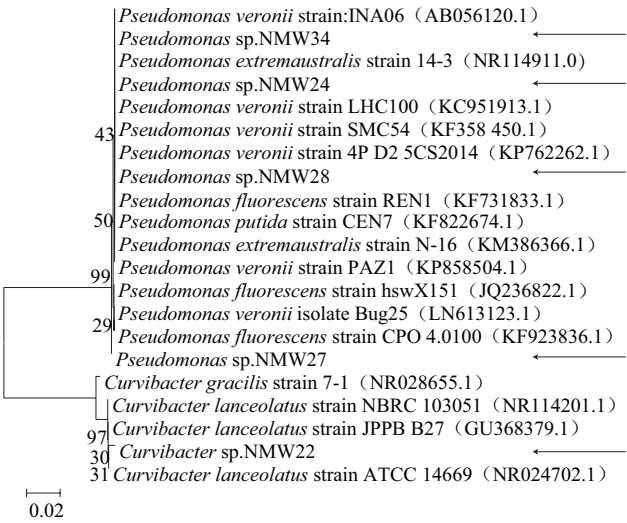


A. NMW22单染色；B. NMW27荚膜染色。

图1 2个分离株的显微照片

Fig.1 Micrographs of two isolates

2.2 16S rRNA序列分析



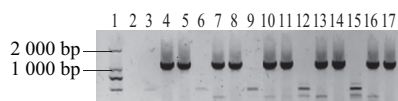
显示异常批次分离株NMW24、NMW27、NMW28和NMW34均属于假单胞菌属Pseudomonas spp.，而正常批次分离株NMW22则属于Curvibacter sp. Bootstrap为1 000，表示经过1 000次数值分析；图下标尺表示每50个碱基序列中有一个碱基替换。

图2 MEGA 6.0用邻近法基于16S rRNA基因序列构建的系统进化树
Fig.2 Phylogenetic tree inferred by neighbor-joining method based on 16S rRNA gene sequences

如图2所示，这次的污染菌是假单胞菌属细菌（Pseudomonas spp.），与其相似度最高的主要有4种：P. veroni、P. extemaustralis、P. putida和P. flurescens。但是因为16S rRNA序列的高度保守性，一般认为16S rRNA序列分析只能准确鉴定到属，不适合鉴定到种。而假单胞菌属是一个庞大的类群，广泛分布于环境中，包括土壤、水、植物和动物组织中。其中大部分是普通环境

微生物,但也有条件致病菌如饮用天然矿泉水国标中严禁检出的铜绿假单胞菌,还有食品中常见的腐败菌荧光假单胞菌,为评估其安全性,需要对该污染菌准确鉴定到种。

2.3 *rpoB*梯度PCR条件优化



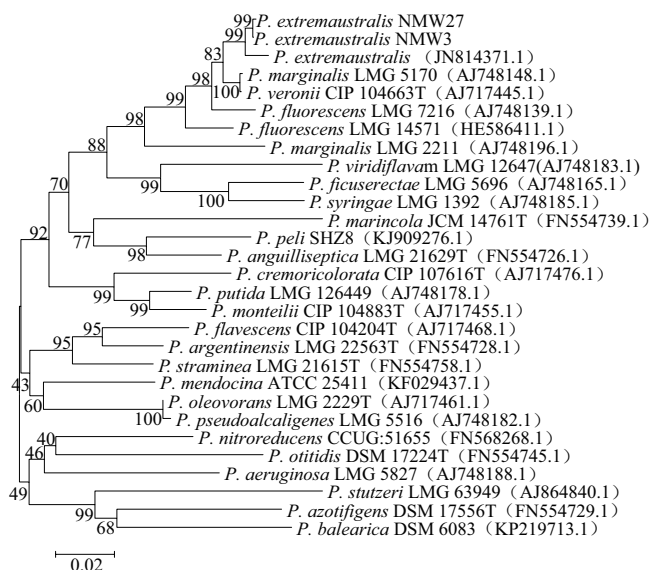
1. Marker DL 2 000; 2.空白对照; 3~5.退火温度为64 °C; 6~8.退火温度为62 °C; 9~11.退火温度为60.1 °C; 12~14.退火温度为55.9 °C; 15~17.退火温度为54 °C。每组加样顺序从左往右依次为: NMW22、NMW27、NMW28。

图3 假单胞菌属*rpoB*引物的梯度PCR结果

Fig.3 Gradient PCR analysis with *rpoB* primers for *Pseudomonas*

为准确鉴定到种,选用了*rpoB*序列作为靶序列,首先进行了梯度PCR以优化PCR条件。由图3可知,假单胞菌属的*rpoB*引物特异性很高,只有NMW27和NMW28两株假单胞菌分离株出现了大小正确的产物,而*Curbibacter*属的NMW22就没有对应大小的扩增产物。此外,为获得高质量的扩增产物进行测序,退火温度应该取64 °C。

2.4 *rpoB*序列分析



显示分离株NMW3和NMW27均属于假单胞菌属*P. extremaustralis*细菌,Bootstrap为1 000,表示经过1 000次数值分析;图下标尺表示每50个碱基序列中有一个碱基替换。

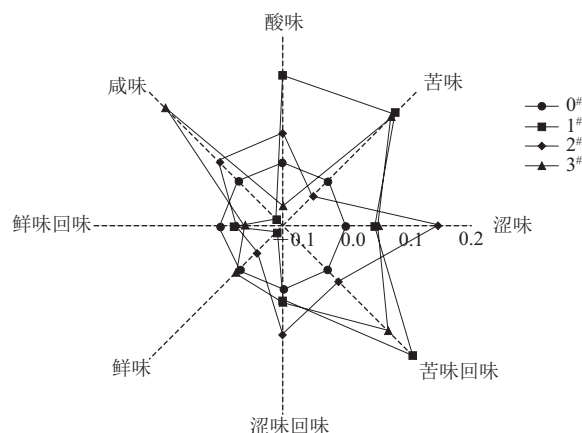
图4 MEGA 6.0用邻接法基于*rpoB*基因序列构建的系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree inferred by neighbor-joining method based on *rpoB* gene sequences

研究表明目前假单胞菌属中至少有202个种^[9],它们大体可以分为*P. fluorescens*、*P. yringae*、*P. anguilliseptica*、*P. putida*、*P. straminea*、*P. oleovorans*、*P. aeruginosa*和*P. stutzeri* 8大群^[10]。由图4可知,分离株NMW3、

NMW27是*P. extremaustralis*种的细菌,在进化树上与条件致病菌铜绿假单胞群(*P. aeruginosa*)距离比较远,而与常见的耐低温食品腐败菌-荧光假单胞菌属于同一个群*P. fluorescens* group。

2.5 反接验证实验结果



0#:正常水样;1#、2#、3#为接种NMW27 30 °C培养30 d的水样。

图5 接种验证实验的味觉雷达图

Fig.5 Radar chart of taste analysis for inoculation test

将污染菌分离株NMW27反接到3瓶正常水样中,空白实验验证该批次水样的细菌总数未检出,30 °C放置30 d,选5个人做嗅觉评价,有4人觉得反接的3个样有难描述的刺激性异味,1人未觉得有任何异常,做平板菌落计数发现细菌总数不小于 10^3 CFU/mL。取这3瓶反接样品做电子舌检测,观察污染菌对水样味觉的影响。从图5可知,污染菌给水样带来的很细微的味觉变化,总体来说水中涩味、苦回味和涩回味都有所上升。

3 讨论

正常批次检出污染菌NMW22为*Curbibacter*属,该属为革兰氏阴性类弧菌或微弯曲的杆菌,($0.3\sim0.9$) $\mu\text{m}\times(1.1\sim1.8)$ μm ,是2004年新建的属^[11]。目前有4个种*C. gracilis*、*C. lanceolatu*、*C. delicatus*和*C. fontanus*。*C. lanceolatu*是从*Pseudomonas lanceolatu* Leifson 1962变更而来,其模式株最初就分离自日本和温哥华的蒸馏水。*C. gracilis*和*C. delicatus*的模式株都从井水中分离^[11]。而*C. fontana*模式株也是从井水中分离的微需氧菌^[12]。Silbaq^[13]采用免培养的FISH技术证实 β 变形菌亚纲目伯克霍尔德目细菌是无气天然矿泉水中能活跃繁殖的优势细菌种群。而*Curbibacter*属正是隶属于伯克霍尔德目。由此可推测该属细菌是水(水源地)中细菌种群之一。NMW22可以推测污染源是水源地,而且该菌也能在天然矿泉水中生长,但未造成嗅觉或味觉的异常。

*P. extremaustralis*是2009年第1次报道的从南极短暂形

成的湖泊中64°09'S、60°57'W分离出的一种非致病性新菌种,能产荧光色素,4~37℃生长,42℃不生长。菌落光滑、圆整、无色。以辛酸钠为碳源时细胞内会积累聚三羟基丁酸酯(polyhydroxybutyrate, PHB)^[14-15]。其抗逆能力和环境适应性强,目前研究已发现其能降解多种复杂化合物,厌氧生长、耐氧化和渗透压压力,耐低温、耐热等独特能力,而且这些抗逆性推测与PHB的积累和生物膜形成能力有关联^[16-19]。我国兰州大学团队也曾从乌鲁木齐河源区高寒冰缘植物中分离到一株内生适冷菌假单胞菌*P. extremaustralis* PF^[20]。

从本次污染案例来看,该批次产品1月出厂检测时细菌总数几乎未检出,可是1~2个月召回后发现近1/3产品细菌总数超标,甚至达到 $10^3 \sim 10^5$ CFU/mL;另外2/3产品细菌总数正常基本未检出,可以推测该批次产品出厂时只偶然有微量污染菌存在,但是该污染菌能在1~2个月内快速增殖 10^4 以上,推测:经检测矿泉水瓶子密封性完好,仅有少量顶空空气存在,可推测污染菌能厌氧或在极低氧压的环境中生长繁殖;两级串联0.2 μm无菌过滤器的滤膜完整性测试结果正常,推测有少数极微细胞可以透过两级串联0.2 μm无菌过滤器;生产线紫外杀菌设备各项参数和运行记录正常,推测该菌可能具有耐紫外能力;产品无任何添加,且经过8道过滤,其有机营养物质含量极其低微,推测污染菌营养要求非常简单;企业位于长白山地区,1月批次中出现该菌株污染,而且能在我国北方地区1~2个月内就能大幅增殖并导致产品变质,推测污染菌能耐低温。

该批次与之前和之后批次的不同是启用了活性炭过滤器,启用之前用RO水反复冲洗活性炭滤器长达36 h以达到活性炭滤器运行的pH值的要求,而事后活性炭滤器出口水样确实出现大量类似*P. extremaustralis*的菌落,说明该细菌可能在活性炭滤器中富集增殖,给后续滤器和紫外杀菌机增加工作负荷。之前的研究^[21-25]也多次证实活性炭多孔材料容易吸附多种微生物,有的甚至能在活性炭中繁殖。之所以该批次出现严重污染即可能是活性炭过滤器使用不当,导致该细菌有机会在活性炭过滤器中吸附、大量富集和繁殖所致。

该企业污染的*P. extremaustralis*具有很强的抗逆性,有荚膜,具备生物膜形成能力,耐低温、耐紫外杀菌,耐低氧压,具有极微细胞能透过“无菌”过滤器,营养要求简单,在瓶装天然矿泉水中能生长,代谢产生亚硝酸盐和硫醚类异味物质,产生轻微涩味、苦回味和涩回味,对矿泉水企业危害很大。随着我国矿泉水工业的发展,新技术和新工艺采用和改良,食品安全性得到重视和提高,但是也必须注意某些特殊微生物可能突破多种除菌屏障导致产品质量问题,甚至是安全问题。

参考文献:

[1] 郭新光,曹赵进,田延山,等. GB 8537—2008 饮用天然矿泉水[S]. 北京:中国标准出版社,2008.

- [2] 包大跃,林升清,穆源浦,等. GB 16330—1996 饮用天然矿泉水厂卫生规范[S]. 北京:中国标准出版社,2003.
- [3] 揭开矿泉水行业公开秘密 企业难打新国标擦边球[J]. 饮料工业, 2009, 12(9): 45.
- [4] JONES C R, CHAMBERLAIN A H L, ADAMS M R. An investigation of the presence of ultramicrocells in natural mineral water[J]. Letters in Applied Microbiology, 1999, 28(4): 275-279. DOI:10.1046/j.1365-2672.1999.00526.x
- [5] 范秀荣,李广武,沈萍. 微生物学实验[M]. 2版. 北京:高等教育出版社,1989: 60.
- [6] LANE D J. 16S-23S rRNA sequencing. In nucleic acid techniques in bacterial systematics[M]. Chichester: Wiley, 1991: 125-175.
- [7] AIT T L, AGERON E, GRIMONT F, et al. Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on *rpoB* sequences and application for the identification of isolates[J]. Research in Microbiology, 2005, 156(5/6): 763-773. DOI:10.1016/j.resmic.2005.02.009.
- [8] 卫生部. GB/T 8538—2008 饮用天然矿泉水检验方法[S]. 北京:中国标准出版社,2008.
- [9] ASLI I Ö, DAVID W U. Defining the “pseudomonas” genus: where do we draw the line with *Azotobacter*?[J]. Microbial Ecology, 2012, 63(2): 239-248. DOI:10.1007/s00248-011-9914-8.
- [10] MULET M, LALUCAT J, GARCÍA-VALDÉS E. DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species[J]. Environmental Microbiology, 2010, 12(6): 1513-1530. DOI:10.1111/j.1462-2920.2010.02181.x.
- [11] DING L, YOKOTA A. Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of *Pseudomonas huttiensis*, *Pseudomonas lanceolata*, *Aquaspirillum delicatum* and *Aquaspirillum autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54(6): 2223-2230. DOI:10.1099/ijs.0.02975-0.
- [12] DING L, YOKOTA A. *Curvibacter fontana* sp. nov., a microaerobic bacteria isolated from well water[J]. Journal of General and Applied Microbiology, 2010, 56(3): 267-271. DOI:10.2323/jgam.56.267.
- [13] SILBAQ F S. Viable ultramicrocells in drinking water[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 106(1): 106-117. DOI:10.1111/j.1365-2672.2008.03981.x.
- [14] AYUB N D, PETTINARI M J, RUIZ J A, et al. A polyhydroxybutyrate-producing *Pseudomonas* sp. isolated from Antarctic environments with high stress resistance[J]. Current Microbiology, 2004, 49(3): 170-174. DOI:10.1007/s00284-004-4254-2.
- [15] LÓPEZ N I, PETTINARI M J, STACKEBRANDT E, et al. *Pseudomonas extremaustralis* sp. nov., a poly(3-hydroxybutyrate) producer isolated from an antarctic environment[J]. Current Microbiology, 2009, 59(5): 514-519. DOI:10.1007/s00284-009-9469-9.
- [16] TRIBELLI P M. Oxygen-sensitive global regulator, Anr, is involved in the biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) in *Pseudomonas extremaustralis*[J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2010, 19(4): 180-188. DOI:10.1159/000320261.
- [17] TRIBELLI P M, HAY A G N I L. The global anaerobic regulator Anr, is involved in cell attachment and aggregation influencing the first stages of biofilm development in *Pseudomonas extremaustralis*[J]. PLoS ONE, 2013, 8(10): 271-272. DOI:10.1371/journal.pone.0145353.
- [18] TRIBELLI P M, MARTINO C D, LÓPEZ N I, et al. Biofilm lifestyle enhances diesel bioremediation and biosurfactant production in the Antarctic polyhydroxyalkanoate producer *Pseudomonas extremaustralis*[J]. Biodegradation, 2012, 23(5): 645-651. DOI:10.1007/s10532-012-9540-2.
- [19] IUSTMAN L J R, TRIBELLI P M, IBARRA J G, et al. Genome sequence analysis of *Pseudomonas extremaustralis* provides new insights into environmental adaptability and extreme conditions resistance[J]. Extremophiles, 2015, 19(1): 207-220. DOI:10.1007/s00792-014-0700-7.
- [20] 龙凤,李洁,王光鹏,等. 适冷菌*Pseudomonas extremaustralis* PF中海藻糖的合成途径及*TreS*基因的克隆[J]. 兰州大学学报(自然科学版), 2009, 45(6): 87-93. DOI:10.3321/j.issn:0455-2059.2009.06.015.
- [21] 王敏,尚海涛,顾军农,等. 饮用水处理中活性炭池微生物风险评估[J]. 给水排水, 2014(5): 120-124. DOI:10.3969/j.issn.1002-8471.2014.05.030.
- [22] 潘涌璋,金腊华,张娜,等. 消毒装置对家用反渗透纯水机出水的消毒效果[J]. 环境与健康杂志, 2005, 22(2): 128-129. DOI:10.3969/j.issn.1001-5914.2005.02.017.
- [23] 徐京君,戴鑫,全晓明,等. 某锅炉补给水处理系统保安过滤器滤芯频繁堵塞原因分析及处理[J]. 热力发电, 2013, 42(11): 174-176. DOI:10.3969/j.issn.1002-3364.2013.11.174.
- [24] 张晓平,李文浩,朱斌,等. 不同构型活性炭滤池微生物分布特征与运行效能[J]. 中国给水排水, 2013, 29(5): 24-27. DOI:10.3969/j.issn.1000-4602.2013.05.006.
- [25] 杨四娥,林建清. 活性炭的改性技术及其应用研究进展[J]. 安徽农业科学, 2014(9): 2712-2715. DOI:10.3969/j.issn.0517-6611.2014.09.072.