

基于流式细胞术研究管网水中细菌的稳定性*

刘婷婷 陈南 孔维文 王敬琦 何晓青**

北京林业大学生物科学与技术学院 北京 100083

摘要 为了更准确地研究管网水中细菌的稳定性,利用流式细胞术(Flow cytometry, FCM)和异养菌平板计数法(Heterotrophic plate count, HPC)检测北京市12处管网末梢水中细菌数量,并将两种方法的检测结果进行对比。进一步将FCM应用于细菌的再生长潜能和一天中细菌稳定性的研究中。结果显示, HPC对12处管网水中细菌的检测结果显示在0-23 CFU/mL间,而FCM测得活细菌数为 $2.2 \times 10^3 - 1.6 \times 10^4$ cells/mL,细菌总数在22 °C下培养7 d能生长到 $10^6 - 10^7$ cells/mL。一天中不同时间用水量不同,细菌总数也不同。本研究表明,FCM测定方法明显优于HPC法,且能够快速准确地反映细菌的再生长潜能及短时间内细菌的稳定性特征。(图5 参29)

关键词 管网水;流式细胞术;再生长潜能;生物稳定性

CLC X832 : Q93-3

Monitoring the bacterial stability in drinking water distribution systems by flow cytometry*

LIU Tingting, CHEN Nan, KONG Weiwen, WANG Jingqi & HE Xiaoqing**

College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract This research investigated the drinking water distribution system of Beijing for the bacterial stability in chlorinated drinking water. Flow cytometry (FCM) and heterotrophic plate counts (HPC) methods were used to evaluate the drinking water quality and stability of 12 water samples throughout the distribution network. The samples were incubated at 22 °C without shaking; total cell counts and percentages of intact cells measurements were done by FCM daily during 7 consecutive days. Another detailed assessment of dynamic changes was done at 1-hour intervals at 8 am – 8 pm in each day. The results showed FCM intact cell concentrations varying from 2.2×10^3 cells/mL to 1.6×10^4 cells/mL in the network, while HPC results varying from 0 CFU/mL to 23 CFU/mL. The average total cell counts at the end of the 7-day cultivation for all samples were approximately $10^6 - 10^7$ cells/mL. High frequency monitoring of a single sampling point demonstrated temporal instability in the network. This research obtained some data by FCM that was not detectable by HPC. We understand it as that FCM is suitable for monitoring the biological stability and regrowth potential of bacteria in drinking water systems.

Keywords pipe network water; flow cytometry; regrowth potential; biological stability

与人类生活密切相关的饮用水主要通过水厂的取水泵汲取江河湖泊及地下水、地表水,经过混凝、沉淀、过滤、消毒等的常规处理和臭氧生物活性炭深度处理,最后经管网系统输送到千家万户。为了保证管网水的质量安全,在出厂时加氯抑制细菌的生长,GB5479-2006《生活饮用水卫生标准》明确规定:管网末梢水中游离余氯 ≥ 0.05 mg/L,细菌总数不得超过100 CFU/mL。但是,余氯在管道中与含氨基的有机物氯化形成伪氯胺,其弱氧化性,杀菌能力弱,能和DPD试剂显色,作为总氯的一部分被检出^[1],导致实际总氯的杀菌效果

被高估。另外,水流在管道中的滞留时间,用户管道温度的变化都会导致氯减少^[2-3],使得细菌在管网中增生。

目前饮用水中微生物的常规检测主要依靠HPC法、滤膜法、多管发酵法等来实现^[4],但自然环境中只有不到1%的微生物是可培养的^[5]。此外,部分细菌在外界压力、温度、营养等条件改变时,会进入“活的不可培养状态”^[6],传统方法无法检测。有些研究表明,一些进入“活的不可培养状态”的致病菌在条件适宜时会恢复活性^[7-9],这对医学健康和环境科学等领域产生巨大影响。FCM是一种测量液相中悬浮细胞或微粒的物理和化学性质的现代分析系统。在国外,FCM成功应用于饮用水中的细菌计数^[10-12]。相比传统方法,它耗时少(样品处理15 min)、操作简单、重复性好、敏感性强,能够检测到原始数值不到3%的改变^[13],并能区分活性和非活性细菌。瑞士已将FCM作为检测饮用水微生物指标的标准方法,瑞士食品纲要No.333.1对该方法的使用进行了详细说明^[14]。另外,E.I. Prest等人对样品处理条件进行了详细的探

收稿日期 Received: 2015-06-08 接受日期 Accepted: 2015-09-14

*中央高校基本科研业务费专项(TD2012-03)、水利部行业公益性行业科研专项(201201032)和国家自然科学基金青年科学基金项目(51108029)资助 Supported by the Central Universities Fundamental Research Projects (TD2012-03), the Research Projects of MWR Industry Public Service Sectors (201201032), and the Youth Science of National Natural Science Foundation of China (51108029)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: lenahe@bjfu.edu.cn)

究^[15],使其在细菌计数上更加准确。

目前对管网水中的细菌计数局限于培养的方法,无法对细菌的稳定性进行准确具体的研究。本研究利用FCM和传统的HPC法对北京市城区12处管网水中活细菌数进行对比。针对一些在氯作用下处于亚致死或休眠状态^[16],环境适宜时恢复活性给人类健康带来潜在威胁的细菌,通过测定细菌的再生长潜能,利用细菌总数和活细菌的百分比描述细菌的存在状态。另外,一天中不同时间人们对水量需求的不同导致水流的快慢,这对饮用水中细菌的稳定性有一定的影响^[17]。因此选取3种不同用户类型测定细菌在一天中的动态变化。本文研究旨在通过FCM在细菌计数上的应用,为管网水中细菌的稳定性研究提供理论基础和技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 水样 本研究选取北京市12处城区用户端管网水(对其编号A-L),具体位置如图1所示。

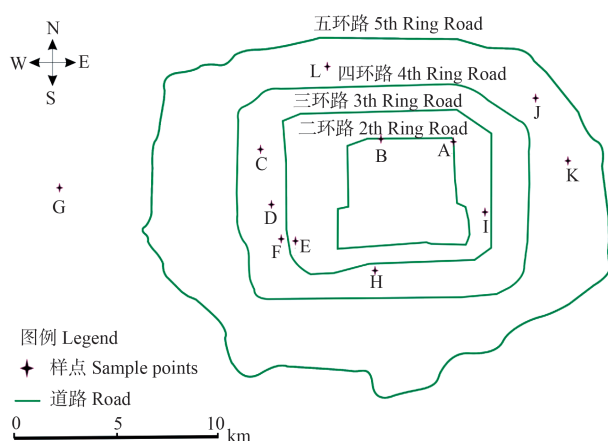


图1 北京市12处城区管网水采样点。

Fig. 1 Sampling sites of drinking water from Beijing distribution.

1.1.2 主要仪器 Accuri C6 流式细胞仪,美国BD公司; H2O³-H加热型金属浴,金银杏公司; 马弗炉, Sigma公司, 中国

1.1.3 主要试剂和耗材 硫代硫酸钠,分析纯, Sigma公司, 中国; R2A固体培养基, 青岛高科园海博生物技术有限公司; 二甲基亚砜, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; SYBR Green I染料, 美国Invitrogen公司; 碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI), 美国Sigma公司; 0.2 μm 孔径PTFE过滤器, 美国Merck Millipore; 0.22 μm 孔径改良聚醚砜过滤器, 美国Merck Millipore。

1.2 方法

1.2.1 采样步骤 采样前, 打开水龙头, 冲洗3 min, 灼烧30 s, 再冲30 s, 采样进入无菌的100 mL玻璃瓶中, 加入硫代硫酸钠, 使其终浓度为0.8 g/L (GB/T 5750.2-2006), 去除余氯, 送回实验室, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 24 h内检测^[18]。

1.2.2 实验流程 北京市12处城区用户端管网水入户采样, 分别用FCM和HPC两种方法检测, 每个采样点取3个样作

为平行。FCM法, 染色、35 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育10 min、上机检测、数据分析^[15]; HPC法, R2A固体培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$, 倒置培养7 d, 菌落计数^[19]。

测定细菌再生长潜能: 12个水样, 去除余氯, 放入无碳处理的锥形瓶中, 封口膜封口, 具体处理见1.2.3, 22 $^{\circ}\text{C}$ 静止培养7 d, 每天进行FCM测定^[18]。

选取3种用户类型, 实验室(中科院生态环境研究中心)、宿舍(北京林业大学2号楼)、食堂(北京林业大学第三食堂), 研究一天中不同时间细菌的稳定性。对工作日(周一到周五)和休息日(周六、周日)两种情况各取3 d作为平行。一天中的检测时间段为8:00-20:00, 每隔一小时取一次样, FCM测定。

1.2.3 耗材无碳化处理 玻璃器皿用洗涤剂清洗, 用蒸馏水、超纯水分别润洗3次, 风干, 锡纸封口, 马弗炉550 $^{\circ}\text{C}$ 处理6 h除去痕量碳^[20-21]。样品管、瓶盖用洗涤剂清洗, 用蒸馏水、超纯水分别润洗3次, 10%过硫酸钠溶液60 $^{\circ}\text{C}$ 浸泡超过1 h, 再用超纯水润洗3次, 风干^[4]。

2 结果与分析

2.1 FCM和HPC法检测北京市12处管网水中的活细菌数量

采用FCM测得的活细菌浓度与HPC测得的菌落形成单位(CFU)对比(图2)显示, HPC的检测结果显示在0-23 CFU/mL间, 根据GB5479-2006《生活饮用水卫生标准》规定, 微生物的菌落总数不得超过100 CFU/mL, 12个水样均合格。而FCM测得水中活细菌数在 $2.2 \times 10^3 - 1.6 \times 10^4$ cells/mL。可见, 即使满足国标的水样也含有很多被忽略的细菌, HPC法在一定程度上低估了微生物的数量, FCM能检测到HPC无法检测到的细菌。

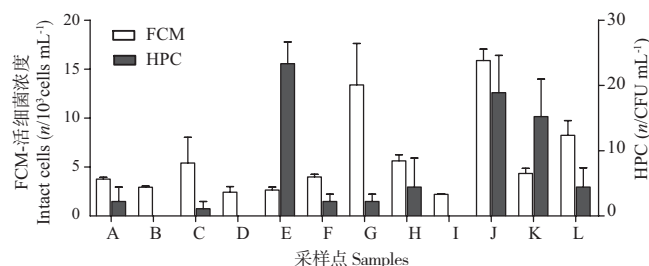


图2 两种方法检测北京市12处管网水中活细菌数量。

Fig. 2 Intact cells concentrations of 12 drinking water samples by two different detecting methods.

HPC法检测E点细菌数最高, 可见E点具有最多的适应R2A培养基的细菌; 而FCM检测到J点最高, 表明J点有最高的活细菌数。李文明等对细菌数影响因素的研究中发现温度、浊度与菌落总数呈正相关^[22]。赵洪宾指出管网末梢余氯的减少导致细菌增生, 水流过大生物膜冲刷, 使得细菌检测值偏高^[23]。而两种方法的检测结果不一致, 说明不同水厂、不同管网等导致细菌群落结构发生变化。

2.2 细菌的再生长潜能

如图3所示, 管网水在22 $^{\circ}\text{C}$ 下静置7 d, 细菌出现了再生

长现象. 细菌总数从最初的 $7.3 \times 10^3 - 2.59 \times 10^5$ cells/mL 生长到最终的 $9.4 \times 10^5 - 4.84 \times 10^6$ cells/mL, 可见氯消毒并不能彻底消灭细菌, 且水中有细菌可利用的“营养物质”, 从第5天开始保持相对稳定, 这可能是受到水中“营养物质”的限制^[24]. 在活细菌的百分比中, 12个采样点呈现出3种不同的趋势. 如图4所示, I中活细菌百分比呈不断上升的趋势, 且到第5天达到相对稳定状态. 可见, 去除余氯后, 细菌能利用水中的“营养物质”生长繁殖, 甚至在余氯作用下亚致死或休眠状态的细菌恢复活性, 继续生长^[7-8]. II中先上升后下降最终维持稳定, 在这4个水样中, 当总数达到相对稳定不变时, 出生率大于死亡率. 这可能由于寡营养环境细菌之间相互竞争, 一些饥饿生长适应能力较差的群体在整个菌群生长消耗大部分“营养物质”后大量死亡^[25]. III中先下降后上升最终达到平稳状态, 余国忠在研究管网水中细菌的生存机制中提出管道的化学腐蚀、颗粒物质、管壁上的生物膜等“有利”条件使细菌在管网中很好的生存^[26]. 而再生长潜能的研究将管网水由管道环境转移到玻璃瓶中, 破坏了原有的生态环境, 细菌由于暂时的不适应性导致死亡. 这些变化在某种程度上也说明了12处管网水中细菌的群落结构不同.

2.3 细菌总数在一天中不同时间的变化特征

如图5-I所示, 实验室水样品中细菌数在工作日和休息日呈现出不同的变化趋势. 两种情况下, 上午8、9时细菌的数量在一天中都达到最高, 约为 $5.07 \times 10^4 - 6.0 \times 10^4$ cells/mL. Frederik Hammes的研究表明, 家庭水龙头的过夜滞留会导致细菌的大量增生^[24]. 工作日, 13和19时细菌数量呈下降趋势, 分别降低到 2.64×10^4 和 4.47×10^4 cells/mL, 据调查这两个时

间点一般是饭后休息时间, 用水量少, 水流较慢. 而14、17和18时细菌数呈上升趋势, 达到 $3.53 \times 10^4 - 5.42 \times 10^4$ cells/mL, 这是做实验及实验后洗刷器材比较集中的时间, 用水量过大, 水流较快, 使得管壁上生物膜及疏松沉积物重悬, 从而导致细菌数量较高^[17]. 休息日呈现上午多下午少的趋势, 无明显起伏变化. 可见, 同一地点不同采样时间, 检测结果是不同的, 实验室用水在一天中存在 $2.64 \times 10^4 - 6.0 \times 10^4$ cells/mL范围的波动. 同样, 在宿舍、食堂这两种用户类型中, 细菌总数随用水量的变化表现出相应的起伏变化. 如图5-II所示, 宿舍水样品中细菌数在休息日比工作日变化更平缓, 且与其他两种用户类型相比, 宿舍用水主要集中在早(8、9时)晚(22时以后), 因此除早上细菌数 (5.23×10^4 cells/mL) 较高外, 其余时间段较低, 且无明显变化. 食堂由于周一到周日都处于工作状态, 两种情况表现出类似的变化趋势, 因其烹饪、洗刷餐具具有明显的用水高峰期, 因此细菌数在这些时间点也达到 $4.7 \times 10^4 - 5.33 \times 10^4$ cells/mL的高值(图5-III).

3 讨论

本研究将FCM应用于北京市12处管网水的细菌计数, 进一步探讨细菌的再生长潜能和一天中不同时间细菌的稳定性. 研究表明, FCM不仅能快速准确进行细菌计数, 而且灵敏地检测出不同时间、不同地点的较小改变. 例如HPC对B、D和I采样点的检出为0, 对A、F、G采样点的检出均为2 CFU/mL(图2), 但管网水不可能无菌, 且不同采样点不可能有相同细菌数. 可见, HPC作为检测方法有明显弊端, 而FCM

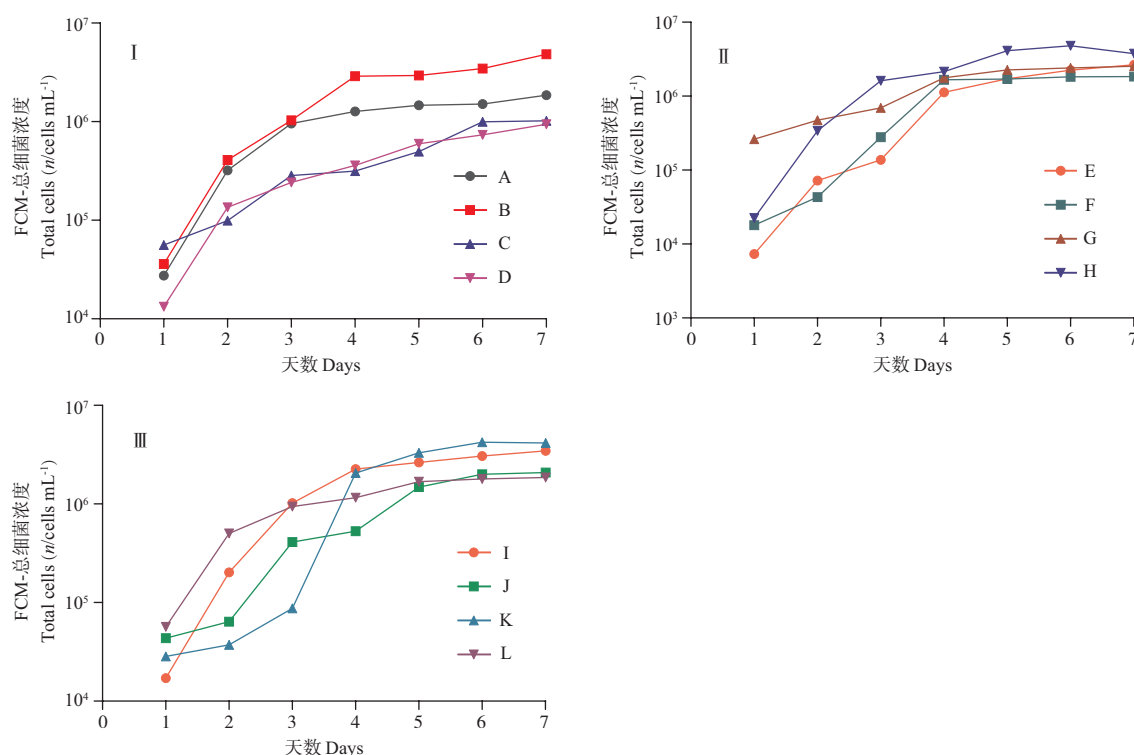


图3 FCM测定细菌再生长中细菌总数的变化.

Fig. 3 Growth of natural microbial community during 7 days at 22 °C. Total cell number change was recorded on a daily basis.

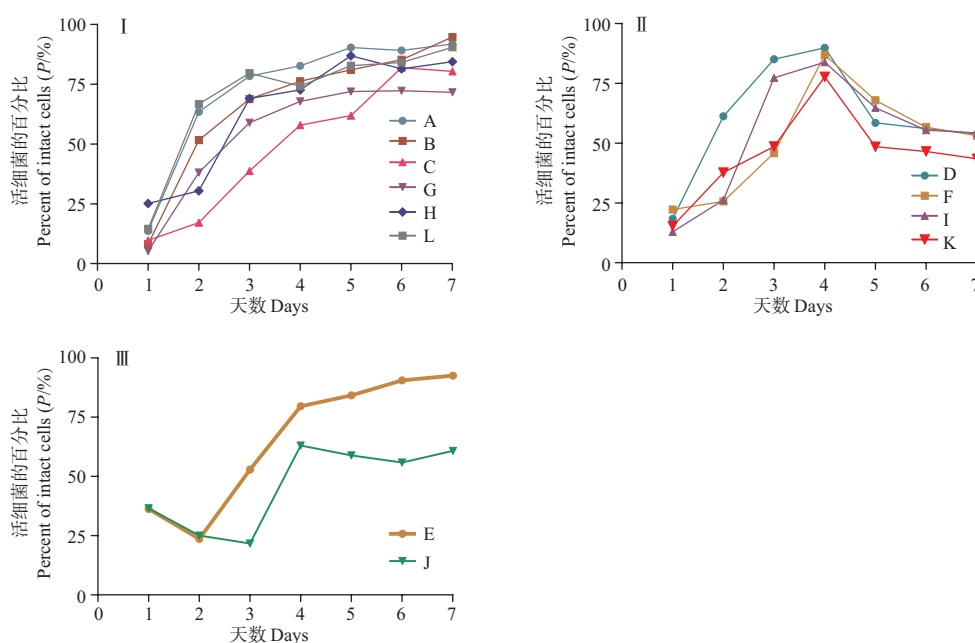


图4 FCM测定细菌再生中活细菌百分比的变化。

Fig. 4 Growth of natural microbial community during 7 days at 22 °C. Percentage change of intact bacteria was recorded on a daily basis.

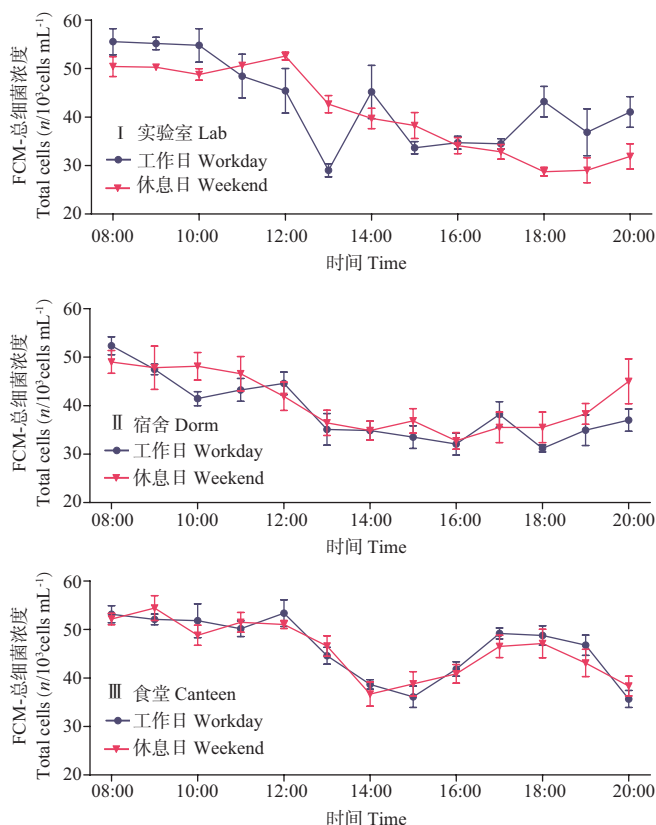


图5 FCM法测定一天中细菌数量的动态变化。

Fig. 5 Diurnal changes of bacterial community determined by FCM.

恰恰能消除这一弊端。

在研究一天中不同时间细菌稳定性时, 3种用户类型表现出不同的变化特征, 但都与自身用水量的特点相对应。实验表明, 用水量与细菌数量具有正相关性。可见, 用水量影

响水质量的稳定性, 这与Alina Nescerecka的研究^[17]一致。而本实验除了对工作日用水进行检测外, 还考虑到休息日用水, 将两者进行对比, 并且选取3种典型的用户类型作比较, 对Alina Nescerecka的研究进行补充, 充分证明实验结论。

去除余氯的管网水在22 °C无碳化处理的锥形瓶中出现再生长现象。可见, 氯消毒过的管网水中细菌并不稳定, 提供适宜的环境能够再生长, 且总数达到 10^6 cells/mL, 处于相对稳定状态, 与Simon Gillespie的研究^[18]基本一致。但12个采样点的活细菌百分比表现出3种不同的状态, 这为细菌稳定性研究提供更多信息, 水样的不同变化与其群落组成密不可分。

饮用水生物稳定性是指饮用水中可生物降解有机物支持异养细菌生长的潜力。目前, 国际上普遍以AOC作为饮用水生物稳定性的评价指标^[27-28]。但部分细菌如氢氧化细菌、反硝化细菌能自养生长^[13], 使得这一指标在一定程度上具有局限性。另外测定AOC的传统方法是HPC法^[29], 随着检测方法的不断提高, 生物稳定性也应重新定义。

4 结论

(1) FCM能快速准确地进行细菌计数, 并能灵敏地检测到细菌再生长变化和短时间动态变化, 相比于HPC法有明显优势, 可应用于影响细菌稳定性因素的探究中。

(2) 细菌再生长潜能表明, 管网水并不呈稳定状态, 氯消毒也不能彻底杀死细菌。细菌总数代表每个样品的最大生长潜能, 而活细菌百分比反映细菌的稳定性。

(3) 同一地点不同采样时间, 其检测结果不同, 水的过夜滞留和流过快会导致细菌增多。

(4) FCM只能对总细菌和活细菌进行计数, 不能计算某一特定细菌的数量, 下一步研究中, 我们拟将FCM检测法和

16S RNA测序结合, 定性定量研究管网水中可能存在的致病菌, 以为为饮用水安全及流行病学的研究提供数据支持。

致谢 感谢中国科学院生态环境研究中心水生生态毒理组和公共仪器组对本文的支持。

参考文献 [References]

- 徐斌, 张天阳. 饮用水氯(胺)化消毒过程中伪氯胺的定量与产生特定[R]. 饮用水生物安全评价与控制研讨会, 2014
- Van der Wielen PW, van der Kooij D. Effect of water composition, distance and season on the adenosine triphosphate concentration in unchlorinated drinking water in the Netherlands [J]. *Water Res*, 2010, **44** (17): 4860-4867
- Jemba P, Weinrich L, Cheng W, Giraldo E, LeChevallier M. Guidance Document on the Microbiological Quality and Biostability of Reclaimed Water Following Storage And Distribution [M]. Alexandria: Water Reuse Foundation, 2010: 112-114
- 刘晓露, 王敬琦, 张柏林, 何晓青. 可同化有机碳和余氯对饮用水中细菌活性的共同影响[J]. 安全与环境学报, 2014, **14** (3): 198-201 [Liu XL, Wang JQ, Zhang BL, He XQ. Combined effect of the assimilable organic carbon and residual chlorine on the bacterium activities in drinking water [J]. *J Safety Environ*, 2014, **14** (3): 198-201]
- Van der Kooij D. Managing Regrowth in Drinking Water Distribution Systems [M]. London: Heterotrophic Plate Counts and Drinking-Water Safety IWA Publishing, 2003: 199-232
- Moreno Y, Piqueres P, Alonso JL, Jiménez A, González A, Ferrús MA. Survival and viability of *Helicobacter pylori* after inoculation into chlorinated drinking water [J]. *Water Res*, 2007, **41** (15): 3490-3496
- Du M, Chen J, Zhang X, Li A, Li Y, Wang Y. Retention of virulence in a viable but nonculturable *Edwardsiella tarda* isolate [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73** (4): 1349-1354
- Asakura H, Igimi S, Kawamoto K, Yamamoto S, Makino S-i. Role of *in vivo* passage on the environmental adaptation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7: cross-induction of the viable but nonculturable state by osmotic and oxidative stresses [J]. *Fems Microbiol Lett*, 2005, **253** (2): 243-249
- 王秀娟, 朱琳, 陈中智, 李宇. 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 XJ, Zhu L, Chen ZZ, Li Y. Ecological significance and processes in research of the viable but nonculturable state in bacteria [J]. *Microbiology*, 2008, **35** (12): 1938-1942]
- Hill VR, Polaczyk AL, Hahn D, Narayanan J, Cromeans TL, Roberts JM, Amburgey JE. Development of a rapid method for simultaneous recovery of diverse microbes in drinking water by ultrafiltration with sodium polyphosphate and surfactants [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71** (11): 6878-6884
- Luo C, Tsementzi D, Kyrpides N, Read T, Konstantinidis KT. Direct comparisons of Illumina vs. Roche 454 sequencing technologies on the same microbial community DNA sample [J]. *PLoS ONE*, 2012, **7** (2): e30087
- Prest E, El-Chakhtoura J, Hammes F, Saikaly P, van Loosdrecht M, Vrouwenvelder J. Combining flow cytometry and 16S rRNA gene pyrosequencing: a promising approach for drinking water monitoring and characterization [J]. *Water Res*, 2014, **63**: 179-189
- Lautenschlager K, Hwang C, Liu W-T, Boon N, Köster O, Vrouwenvelder H, Egli T, Hammes F. A microbiology-based multi-parametric approach towards assessing biological stability in drinking water distribution networks [J]. *Water Res*, 2013, **47** (9): 3015-3025
- SLMB. Determining the Total Cell Count and Ratios of High and Low Nucleic Acid Content Cells in Freshwater Using Flow Cytometry [M]. Switzerland: Federal Office of Public Health, 2012
- Prest EI, Hammes F, Kotzsch S, van Loosdrecht MCM, Vrouwenvelder JS. Monitoring microbiological changes in drinking water systems using a fast and reproducible flow cytometric method [J]. *Water Res*, 2013, **47** (19): 7131-7142
- Mull B, Hill VR. Recovery of diverse microbes in high turbidity surface water samples using dead-end ultrafiltration [J]. *J Microbiol Meth*, 2012, **91** (3): 429-433
- Nescerecka A, Rubulis J, Vital M, Juhna T, Hammes F. Biological instability in a chlorinated drinking water distribution network [J]. *PLoS ONE*, 2014, **9** (5): e96354
- Gillespie S, Lipphaus P, Green J, Parsons S, Weir P, Juskowiak K, Jefferson B, Jarvis P, Nocker A. Assessing microbiological water quality in drinking water distribution systems with disinfectant residual using flow cytometry [J]. *Water Res*, 2014, **65**: 224-234
- Uhl W, Schaule G. Establishment of HPC (R2A) for regrowth control in non-chlorinated distribution systems [J]. *Int J Food Microbiol*, 2004, **92** (3): 317-325
- Vital M, Hammes F, Egli T. Competition of *Escherichia coli* O157 with a drinking water bacterial community at low nutrient concentrations [J]. *Water Res*, 2012, **46** (19): 6279-6290
- Vital M, Fuchslin HP, Hammes F, Egli T. Growth of *Vibrio cholerae* O1 Ogawa Eltor in freshwater [J]. *Microbio-Sgm*, 2007, **153** (7): 1993-2001
- 李文明, 李伟英, 陆辉, 乔羽, 王峰. 供水管网水样R2A培养基细菌总数测定及其影响因素探究[J]. 净水技术, 2014, **33** (6): 66-70 [Li WM, Li WY, Lu H, Qiao Y, Wang F. Influencing factors and determination of total bacterial count of water samples on R2A medium in water supply distribution system [J]. *Water Pur Technol*, 2014, **33** (6): 66-70]
- 赵洪宾. 给水管道卫生学[M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 2008
- Lautenschlager K, Boon N, Wang Y, Egli T, Hammes F. Overnight stagnation of drinking water in household taps induces microbial growth and changes in community composition [J]. *Water Res*, 2010, **44** (17): 4868-4877
- Lautenschlager K, Hwang C, Ling F, Liu W-T, Boon N, Koester O, Egli T, Hammes F. Abundance and composition of indigenous bacterial communities in a multi-step biofiltration-based drinking water treatment plant [J]. *Water Res*, 2014, **62**: 40-52
- 余国忠, 王根凤, 龙小庆, 吴红伟, 王占生. 给水管网的细菌生长可能机制与防治对策[J]. 中国给水排水, 2000, **16** (8): 18-20
- 王蓉, 宋淑玲. 饮用水生物稳定性的研究[J]. 广东化工, 2013, **40** (14): 148-149 [Wang R, Song SL. Researches on biological stability of drinking water [J]. *Guangdong Chem Ind*, 2013, **40** (14): 148-149]
- 张领国, 张克峰, 李梅, 张秀红. 饮用水水质生物稳定性研究进展[J]. 净水技术, 2013, **32** (6): 1-5 [Zhang LG, Zhang KF, Li M, Zhang XH. Advances in research of biological stability for drinking water quality [J]. *Water Pur Technol*, 2013, **6**: 1-5]
- 刘文君, 王亚娟, 张丽萍, 王占生. 饮用水中可同化有机碳(AOC)的测定方法研究[J]. 给水排水, 2000, **26** (11): 1-5