

应用 FCM-qPCR 方法定量检测水中常见病原体

王明星^{1,2} 柏耀辉^{2*} 梁金松² 霍旻² 杨婷婷^{1,2} 袁林江¹

(1. 西安建筑科技大学环境与市政工程学院,西安 710055; 2. 中国科学院生态环境研究中心,中国科学院饮用水科学与技术重点实验室,北京 100085)

摘要: 以往对水体病原体的研究主要是通过监测粪大肠杆菌作为指示,然而研究表明粪大肠杆菌与水中病毒和细菌病原体呈现出较差的相关性。因此,选取水中典型病原体并对其进行定量检测是当前需要解决的技术问题。为此本研究建立了流式细胞术和定量 PCR 联合使用方法,用于快速获取水环境中总病毒、细菌以及几种典型病原体(大肠杆菌、军团菌、腺病毒、贾第虫和隐孢子虫等)的浓度水平,并将该方法应用到污水处理厂进出水及接纳河流上下游的病原体检测中。结果表明,该污水处理厂对总细菌和总病毒以及几种典型病原体都具有较高的去除率(>93%);污水处理厂排水对接纳水体病原体浓度水平基本没有负面影响。研究为评估污水处理厂处理效果及排水对接纳水体的生态影响提供了技术支持。

关键词: 流式细胞术(FCM); qPCR; 细菌; 病毒; 典型病原体

中图分类号: X172; X835 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2016)01-0384-07 DOI: 10.13227/j.hjcx.2016.01.049

Application of FCM-qPCR to Quantify the Common Water Pathogens

WANG Ming-xing^{1,2}, BAI Yao-hui^{2*}, LIANG Jin-song², HUO Yang², YANG Ting-ting^{1,2}, YUAN Lin-jiang¹

(1. School of Environmental and Municipal Engineering, Xi'an University of Architecture and Technology, Xi'an 710055, China; 2. Key Laboratory of Drinking Water Science and Technology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

Abstract: In the past, fecal *E. coli* was always regarded as the indicator organism for estimation of pathogens in water. However, a weak relation between fecal *E. coli* and water viruses or bacterial pathogens has been demonstrated by previous studies. Therefore, for water pathogen study, it is essential to select and quantify typical pathogens. In this study, a combination of quantitative PCR (qPCR) with flow cytometry (FCM) was established to detect the concentrations of viruses, bacteria and several typical pathogens (e.g. *E. coli*, *Legionella*, HAAdV, *Giardia*, *Cryptosporidium*) in water. The method was applied to measure the pathogen concentrations in the influent and effluent of a wastewater treatment plant (WWTP), as well as its receiving river. The results revealed that the WWTP treated the pathogens with high removal efficiency (>93%); the effluent of WWTP did not show a negative effect on pathogen concentration of the receiving river. The study provides a technical support for the evaluation of WWTP treatment effect and the ecological impact of WWTP effluent on receiving river.

Key words: flow cytometry (FCM); qPCR; bacteria; viruses; typical pathogens

病毒、细菌、真菌、原虫和蠕虫等病原体作为主要的致病介质,对全世界的公共健康构成威胁^[1]。虽然病原体是水质检测的一项重要指标,但是基于病原体检测费用高且检测手段复杂等原因,实际操作过程中对很多病原体(如病毒)几乎不定量分析。通常,大多数病原体仅通过粪源指示菌(fecal indicator bacteria, FIB)进行表征,或者通过 FIB 和病原体的简单关系预测目标病原体的真实浓度^[2]。然而,研究表明: FIB 和病毒并没有直接的相关性^[3]。

随着聚合酶链式反应(PCR)技术的不断发展,研究人员开始着手从分子水平探讨环境水体病原体的组成和浓度水平,如对大肠杆菌^[4]、军团菌^[5]、腺病毒^[2]和贾第虫^[6]等的研究。另外,随着各种核酸染料不断出现和新技术的不断发展,近些年来许多学者利用流式细胞术(flow cytometry, FCM)对

水体中细菌^[7]和病毒^[8]进行研究。表 1 概述了近 5 年来水体病原体研究的主要对象、内容及手段。从中可以看出,定量 PCR 和 FCM 是当前病原体研究中所采用的主要手段。

FCM 和定量 PCR (qPCR) 两种方法各有特点: FCM 可以高效灵敏地检测样品中细菌总数和病毒总数; qPCR 可以准确地对每一类病原体进行相对定量分析。前者从宏观角度判别病原体污染情况;后者从微观角度论证病原体污染水平。FCM 和 qPCR 的联用,不仅可以较为准确地检测水体中总

收稿日期: 2015-08-31; 修订日期: 2015-10-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(51578537); 国家水体污染控制与治理重大专项(2014ZX07405-003)

作者简介: 王明星(1989~),男,硕士研究生,主要研究方向为环境水体中病原体检测方法的建立和应用, E-mail: fengqiumingxing@163.com

* 通讯联系人, E-mail: yhbai@ceees.ac.cn

细菌和总病毒浓度水平,而且能对典型病原体进行定量,使得检测结果更加具有说服力。传统检测方法中,以粪源菌检测为主,而忽视其他原虫、病毒类病原体的检测,FCM-qPCR 方法兼顾三类病原体使得检测内容更加丰富;选择具有代表性的典型病原体,使得检测对象更加具有针对性,进而加快了检测的速度;与传统的细胞培养法检测细菌总数相比,FCM-qPCR 方法更加快捷也相对更加准确;传统方

法中,很难对病毒总数进行检测,FCM-qPCR 方法实现了对病毒总数的检测。

基于前人研究成果,本研究将建立流式细胞术和定量 PCR 联用方法,用于快速准确获取水环境中总细菌、总病毒及大肠杆菌、军团菌、腺病毒、贾第虫和隐孢子虫等病原体的浓度水平;并将该方法应用到北京市某污水处理厂进出水及接纳河流上下游病原体的检测中。

表 1 近 5 年环境水体中病原体研究概况

Table 1 Summary of water pathogen research in recent five years

| 环境水体 | 研究内容 | 研究手段 | 文献 |
|------------|---|-------------------------------|---------|
| 污水 | 贾第虫、隐孢子虫 | PMA-qPCR、qPCR | [9] |
| 污水 | 贾第虫和隐孢子虫 | qPCR | [10] |
| 含有病原微生物的水体 | 贾第虫和隐孢子虫 | 光学显微镜法 | [11] |
| 河水 | 贾第虫和隐孢子虫 | 流式细胞术、荧光显微镜法、PCR | [12] |
| 污水处理厂污水 | 军团菌 | 荧光显微镜、qPCR | [13] |
| 给水厂进出水、河水 | 腺病毒、多瘤病毒 | qPCR | [14] |
| 水源水 | 埃希氏大肠杆菌、鼠疫沙门氏菌、空腔弯曲杆菌、铜绿假单胞菌、福氏志贺菌 | qPCR | [15] |
| 农业灌溉用水 | 人类特异性拟杆菌、大肠杆菌、肠球菌、耐热型大肠杆菌、体细胞和 F ⁺ 噬菌体、腺病毒和诺瓦氏病毒 | 平板培养法、多管发酵法、细胞感染法、RT-PCR、qPCR | [2] |
| 城市洪水 | 空腔弯曲杆菌、贾第虫、隐孢子虫、诺瓦氏病毒、肠道病毒 | 平板培养法和 PCR、荧光显微镜法、培养法和 PCR | [16] |
| 湖水 | 大肠杆菌、弯曲杆菌、志贺氏菌、沙门氏菌 | qPCR | [17] |
| 活性污泥 | 病毒 | 流式细胞术 | [18] |
| 污水处理厂各阶段水 | 病毒和细菌 | 流式细胞术 | [19] |
| 饮用水 | 细菌 | 流式细胞术 | [20-21] |
| 受微生物污染的海岸 | 腺病毒、肠道病毒 | 细胞感染、qPCR、Nested-PCR、RT-PCR | [22] |

1 材料与方法

1.1 水样采集

水样采于北京市某污水处理厂进水、出水口以及排水的接纳河的上下游(以排水口为界)约 200 m 处的河道,采样时间为 2015 年 4 月 23 日。

取 1 mL 水样装入 1.5 mL 棕色样品瓶中,然后向样品瓶中加入戊二醛(终浓度为 0.5%)固定水样中微生物,用于测定水样中总细菌和总病毒浓度;取 4 L 水样装入 4 L 棕色玻璃瓶中,用于提取水中总 DNA。将容器中的水样低温保存并在 8 h 内运送到实验室。

将盛有水样的 1.5 mL 棕色样品瓶放进 -80℃ 冰箱内备用。从 4 L 棕色瓶中取出一定量水样,先使用真空抽滤装置对水样进行抽滤(过 0.45 μm 聚醚砜滤膜);然后,将滤过水样的滤膜收集在 MO-BIO PowerWater® Bead Tubes(研磨管)中;最后,按照试剂盒(PowerWater® DNA Isolation Kit,MO-BIO 公司)操作要求提取总 DNA。

1.2 常规水质指标检测

常规水质分析,包括总氮(TN)、氨氮(NH₄⁺-N)、硝态氮(NO₃⁻-N)、总磷(TP)、溶解性磷酸盐(SRP)、总有机碳(TOC)和化学需氧量(COD)的检测。

TN 测定采用碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法^[23]; NH₄⁺-N 测定采用水杨酸分光光度法^[23]; TP 和 SRP 测定采用钼酸铵分光光度法^[23]; COD 测定采用快速消解分光光度法; NO₃⁻-N 测定采用离子色谱法^[23]; TOC 测定采用干式氧化法。

TN、NH₄⁺-N、TP、SRP 和 COD 测定使用紫外/可见光分光光度计(U-3010,日立); NO₃⁻-N 测定使用离子色谱仪(ICS-2000,赛默飞); TOC 使用总有机碳分析仪(TOC-V_{CPH},岛津)。

1.3 生物指标检测

1.3.1 FCM

在使用 FCM 分析细菌和病毒时,样品稀释是较为关键的一步^[24]。鉴于当 FCM 检测速度为 100 ~ 1 000 particles·s⁻¹时,可以有效地减少检测误差^[8]。

使用 TE 溶液 (10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 1 mmol·L⁻¹ EDTA pH = 8.0; 30 × 10³ 超滤膜过滤) 作为稀释缓冲溶液, 对 4 类水样采用不同比例的稀释: 上游和下游河水采用 1:50 稀释; 总进水采用 1:200 稀释; 总出水采用 1:10 稀释. 根据不同的稀释比例, 上游水、进水、出水和下游水分别取 10、2.5、50 和 10 μL 加入各个上样管中(检测体系 500 μL).

使用染色剂 SYBR Green I (工作液浓度 100 ×, BD 公司) 体积 5 μL, 上样管中终浓度 1 ×. 细菌和病毒采用不同的染色方法: 细菌染色时, 混合样在常温下、避光条件下染色 15 min; 病毒染色时, 样品在避光、80℃ 水浴加热条件下染色 10 min, 然后自然降温 5 min. 最后, 使用流式细胞仪 (FACSCaliburTM, BD 公司) 检测.

在检测过程中, 使用 Milli-Q 超纯水作为鞘液. 检测病毒时, 设置空白对照: 将 10 μL 过 30 × 10³ 超滤膜的上游水加入到上样管, 稀释、染色同正常样品一样, 作为空白对照. 通过调节流式细胞仪的电压, 使得空白样中的荧光信号趋于零, 以消除背景荧光信号对病毒荧光信号的干扰.

1.3.2 qPCR

对于细菌、大肠杆菌、军团菌、贾第虫, 直接对

上游河水 DNA 样品进行 PCR 扩增; 然后将获取的 PCR 产物转到质粒上; 最后配制成不同浓度的标准样品. 根据已知的腺病毒基因序列^[22], 直接合成质粒标准品. 隐孢子虫质粒直接通过对隐孢子虫 DNA 进行扩增, 然后将 PCR 产物转到质粒上.

在进行 qPCR 时, 大肠杆菌、军团菌、腺病毒和 16S rRNA 基因检测采用染料法 (SYBR Green I Premix Plus, 天根). 反应体系: 2 × SuperReal PreMix Plus (with SYBR Green I) 10 μL, 50 × ROX Reference Dye 2 μL, Forward primer (10 μmol·L⁻¹) 0.6 μL, Reverse primer (10 μmol·L⁻¹) 0.6 μL, ddH₂O 4.8 μL, 模板 2 μL, 反应体系为 20 μL. 引物和扩增条件, 见表 2.

在进行 qPCR 时, 贾第虫和隐孢子虫基因检测采用探针法 (Premix Ex TaqTM, TaKaRa). 反应体系: Premix Ex Taq (2 × Conc.) 10 μL, ROX Reference Dye (50 × Conc.) 0.4 μL, Forward primer (10 μmol·L⁻¹) 0.4 μL, Reverse primer (10 μmol·L⁻¹) 0.4 μL, BSA (10 mg·L⁻¹) 0.4 μL, TaqMan Probe 0.4 μL, ddH₂O 6 μL, 模板 2 μL, 反应体系为 20 μL. 引物和扩增条件, 如表 2 所示. 病原体定量使用定量 PCR 仪 (ABI 7300, ABI 公司).

表 2 目标病原体对应的引物、探针和扩增条件

Table 2 Primers, probes, and thermocycling conditions of target pathogens

| 病原体 | 序列和探针 | 扩增条件 | 文献 |
|------|--|--|------|
| 大肠杆菌 | F: TGTTTCAGTGGCA AGAGTT R: TAATCGATATACCCGCTC | 95℃ 15 min; 95℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 40 s, 72℃ 10 s, 40 个循环 | [4] |
| 腺病毒 | F: GGACGCCTCGGAGTACCTGAG R: ACNGTGGGGTITCTGAACTTGTT | 95℃ 15 min; 95℃ 15 s, 55℃ 60 s, 45 个循环 | [22] |
| 细菌 | 341F: CCTACGGGAGGCAGCAG 534R: ATTACCCGCGCTGCTGGAC | 95℃ 15 min; 95℃ 8 s, 61℃ 8 s, 72℃ 10 s, 40 个循环 | [25] |
| 军团菌 | F: CCCATGAAGCCCGTTGAA R: ACAATCAGCCAATTAGTACGAGTTAGC | 95℃ 15 min; 95℃ 30 s, 60℃ 60 s, 72℃ 60 s, 40 个循环 | [26] |
| 隐孢子虫 | F: CAAATGATACCGTTTGTCTCTCTG R: GGCATGTCGATTCTAATTCAGCT P: HEX/TGCCATACATTGTTGCTCCTGACAAATTGAAT/BHQ-1 | 95℃ 2 min; 95℃ 10 s, 63℃ 1 min, 72℃ 1 min, 45 个循环 | [6] |
| 贾第虫 | F: CATCCGCGAGGAGGTCAA R: GCAGCCATGCTGTCGATCT P: FAM/AAGTCCGCGACAACATGTACTTAACGA/TAMRA | 95℃ 15 min; 95℃ 10 s, 58℃ 8 s, 72℃ 26 s, 45 个循环 | [6] |

2 结果与分析

2.1 常规水质分析

常规水质分析结果见表 3. 经过污水处理厂处理, 进水中 NH₄⁺-N、TP、COD 的去除率分别达到 83.80%、98.91% 和 88.79%, 呈现出较好的去除效果.

河道上下游对比分析: NH₄⁺-N 和 TP 指标, 上游水质满足 IV 类水, 下游满足 III 类水; 针对 COD 指标, 上游水质满足 V 类水, 下游满足 IV 类水.

2.2 生物指标分析

2.2.1 总细菌和总病毒

通过 FCM 检测 4 类水样中的细菌和病毒, 结果见图 1. FCM 检测 4 类水样中细菌浓度水平在 10⁵

表 3 不同水样的物化参数

Table 3 Physicochemical properties of different water samples

| 采样点 | TN/mg·L ⁻¹ | NH ₄ ⁺ /mg·L ⁻¹ | NO ₃ ⁻ /mg·L ⁻¹ | TP/mg·L ⁻¹ | SRP/mg·L ⁻¹ | TOC/mg·L ⁻¹ | COD/mg·L ⁻¹ |
|-----|-----------------------|--|--|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 上游 | 6.94 | 1.29 | 2.46 | 0.11 | 0.10 | 7.51 | 30.14 |
| 进水 | 29.05 | 12.16 | 12.88 | 10.53 | 2.67 | 16.70 | 135.77 |
| 出水 | 17.40 | 1.97 | 2.76 | 0.11 | 0.10 | 7.92 | 15.22 |
| 下游 | 11.22 | 0.62 | 1.63 | 0.06 | 0.05 | 7.23 | 27.80 |

counts·mL⁻¹ 以上, 而病毒浓度水平在 10⁷ counts·mL⁻¹ 以上. 同一水样中, 病毒浓度水平比细菌高出一个数量级以上. 通常水环境中细菌和病毒数目分别为 10⁵ ~ 10⁶ counts·mL⁻¹ 和 10⁷ counts·mL⁻¹ 数量级^[27], 与研究结果一致.

经过污水处理厂处理, 细菌浓度由 (5.77E + 07) counts·mL⁻¹ 降至 (2.28E + 05) counts·mL⁻¹; 病毒由 (4.68E + 08) counts·mL⁻¹ 降至 (1.12E + 07) counts·mL⁻¹, 去除效率分别达到 99.85% 和 97.61%. 由于进水中细菌和病毒的浓度较高, 所以即使在较高的去除效率之下, 出水中的病原体浓度水平依然很高.

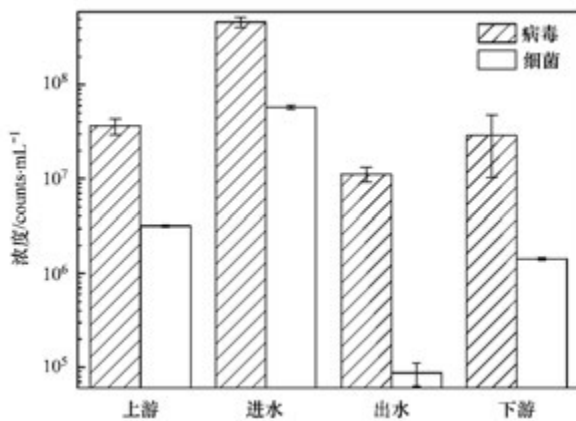


图 1 细菌和病毒浓度检测

Fig. 1 Concentration of bacteria and viruses in different samples

2.2.2 典型病原体

如图 2 所示, 同一水样中不同的病原体浓度差异较为明显. 例如, 军团菌浓度最高, 达 (5.81E + 04) copies·mL⁻¹; 而隐孢子虫浓度最低, 其最高浓度仅为 (1.29E + 01) copies·mL⁻¹, 军团菌基因浓度比隐孢子虫基因浓度高出 3 个数量级. 研究表明, 每个隐孢子卵囊中含有 4 个拷贝数的卵囊壁蛋白基因^[6]. 因此, 隐孢子虫卵囊的浓度相对更低.

16S rRNA 基因浓度在污水处理厂进水高达 (1.25E + 08) copies·mL⁻¹; 出水浓度降至 (2.83E + 05) copies·mL⁻¹, 基因拷贝数降低 3 个数量级, 去除效率达到 99.77%. 同时, 大肠杆菌、军团菌、腺病

毒、贾第虫和隐孢子虫基因的去除效率分别为 99.99%、98.95%、99.47%、97.38% 和 93.82%. 结果表明, 污水处理厂对病原体较高的去除效率使得进水、出水中病原体浓度水平有显著差异.

病原体较高的去除率, 与水厂所采用的深度处理工艺 (MBR + 紫外消毒) 有着密不可分的关系. 由于污水处理厂处理污水的主体是水中的污泥, 所以处理污水过程中进水中的病原体会大量吸附在污泥的颗粒表面. 通过滤膜的截留, 大量病原体滞留在污泥中, 进而使得出水中病原体浓度大幅度下降. 膜过滤之后的水经过消毒处理, 实现对水中残留病原体的杀灭; 同时, 促使一些胞外的 DNA 分解. MBR 工艺直接通过截留方式实现对病原体的去除, 被截留的病原体将不会被再次检出; 紫外消毒则是将病原体杀死, 杀死后的病原体依然有被检出的可能. 整体评判, 病原体被大量截留在污泥中, 以污泥形式被去除.

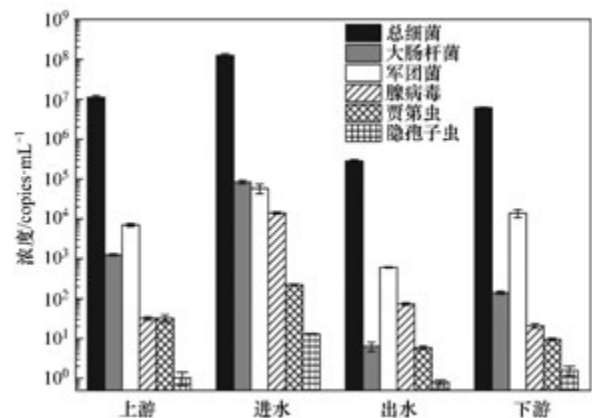


图 2 不同水样的病原体浓度

Fig. 2 Concentration of the water pathogens in different water samples

2.3 FCM-qPCR 方法联合

就细菌检测结果而言, qPCR 检测结果高于 FCM 检测结果. 基于各种原因 (见 3.2 节), qPCR 检测存在过高估计微生物真实浓度水平的可能. 因此, 考虑以 FCM 测得细菌及病毒结果作为基准值, 使用 FCM 结果对 qPCR 结果进行相应的校正. 假定 qPCR/FCM 系数与细菌浓度被高估倍数一致, 4 类

水样被高估倍数分别为: 3.49、2.16、3.25 和 4.34。另外,假定水样中原虫和病毒被高估程度同细菌一样。校正后结果,如图3所示,认为校正后的值为水样较为准确的浓度。

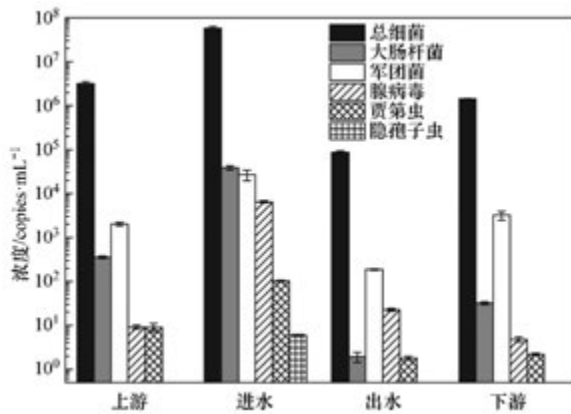


图3 FCM/16S rRNA 系数校正后病原体浓度

Fig. 3 Concentration of different pathogens after the correction by FCM/16S rRNA coefficient

3 讨论

3.1 典型病原体选择

对于水体病原体污染的研究,典型病原体的选择显得非常关键。因为在研究水体病原体污染过程中,对每一种病原体逐一检测是无法实现的;此外,一种能表征病原体真实浓度和多种病原体的万能指示微生物不存在^[15],所以必须选择具有代表性的病原体进行检测,以较为准确地表征病原体的污染水平。

研究发现:在几种常见病原指示物中,只有使用膜滤-mL 培养法检测出的大肠杆菌与肠道疾病的发生存在较为明显的相关性^[3]。隐孢子虫和蓝氏贾第虫作为世界范围内水体传播疾病的主要病因之一,其卵囊或孢囊在环境中具有较高的稳定性,对大部分的消毒剂都有抵抗能力,故不易去除。基于腺病毒在人群和环境普遍性,及其自然恢复力和人类宿主的特异性,许多学者推荐其作为人类污染物污染的指示物^[28]。研究表明,在河流和湖泊中,一旦有腺病毒检出说明该地区水体受到了人类粪便的污染^[29]。军团菌以嗜肺军团菌最易致病,且占病例的85%~90%;此外,军团菌属又是以庞蒂亚克热而为人所熟知的自限制性非肺炎疾病的主要病因^[26]。

基于对前人研究成果的对比和分析,本研究所采用的5种典型病原体(大肠杆菌、军团菌、腺病毒、贾第虫和隐孢子虫这5种病原体)具有典型代表意义,能较全面表明病原体在水体中的存在状况。

3.2 方法特异性、正确性、检测限

特异性,引物的特异性是PCR扩增检测结果正确性和实用性的基础。细菌基因扩增选择已报道的通用引物,而大肠杆菌、军团菌、腺病毒、贾第虫和隐孢子虫基因扩增选择已报道的特异性引物,对以上几种病原体进行了多次的PCR扩增。对PCR产物进行电泳,结果每次的电泳条带呈现出较好的一致性,扩增的条带大小与目标条带大小相一致。此外,对以上扩增的产物进行测序,将获取的序列通过NCBI进行验证,均符合检测的目标病原体。流式细胞术检测总细菌和总病毒的原理是基于核酸与核酸染料结合时产生荧光,使得流式细胞术对细菌和病毒的检测具有很强的特异性。

准确性,检测样品时取3个平行样,且多次进行检测。检测结果显示,细菌、大肠杆菌、军团菌、腺病毒、贾第虫和隐孢子虫相对标准偏差分别为1.5%~10%、6.3%~10.7%、3.4%~8.96%、5.7%~10.8%、4%~10.3%、3.8%~14.7%;总病毒和总细菌的相对标准偏差分别为12%~18%和1.5%~4.8%。检测结果呈现较好的平行性,且多次检测验证保证了方法的准确性。

检测限,经过多次检测和验证,结果表明该方法对细菌、大肠杆菌、军团菌、腺病毒、贾第虫和隐孢子虫目的基因的最低检测限分别为(1.48E+02)、(2.06E+01)、(4.62E+00)、(2.15E+00)、(6.01E+00)、(1.02E+00) copies·μL⁻¹。较低的检测极限使得该方法可以检测环境水体中微量的病原体,提高了病原体检测的精度。

3.3 适用范围和可能的影响因素

FCM-qPCR方法主要针对环境水体中病原体的检测。与环境水体相比,自来水中物质组成相对较为简单,因此也可以使用该方法检测自来水中病原体的存在水平。虽然没有使用该方法检测底泥和活性污泥,但是已有学者使用FCM方法检测底泥^[7]和活性污泥^[18,19]中细菌或病毒。所以,该方法的适用范围相对较广。

qPCR过程中,可能会受到模板质量的影响,如模板中含有杂蛋白质、Taq酶抑制剂、染色体中的组蛋白、酚类等,所以在DNA提取过程中要保证模板的质量。基于荧光染料与核酸结合的性质,该方法可能会受到水中藻类的影响,故不适宜检测含有高藻类的水体。

3.4 FCM和qPCR比较

虽然qPCR和FCM方法都可以检测样品中细

菌浓度,但是二者获取的数值却有一定的差异: qPCR 获取的数值均高于流式细胞术。

造成两种检测方法的检测结果差异的根本原因在于,两种检测方法的原理不同: qPCR 是用于测定特定基因,FCM 用于计数细菌本身。研究表明,胞外 DNA 可以吸附在固体颗粒表面,进而在水体中避免 DNA 酶对其降解^[30]。因此,环境样品中一些胞外 DNA 在进行抽滤过程中会随着颗粒物被截留在滤膜上,在提取总 DNA 时被重新获取,定量过程中胞外 DNA 同样被定量。研究表明,在某些细菌体内含有多个 16S rRNA 基因^[31],这就意味着一个细菌可能被计数为多个细菌。由于 16S rRNA 基因广泛存在于细菌体内,在进行操作过程也容易受到污染,导致检测结果偏高。而在使用 FCM 时,水中存在的胞外 DNA 不会被计数;对于含有多个 16S rRNA 基因的细菌也只能被计数一次。基于以上诸多原因,容易导致使用 qPCR 检测到的细菌浓度要高于流式细胞术的检测值。

两者分析比较,16S rRNA 基因在使用 qPCR 检测过程中容易受到样品质量和操作环境的影响,而使用 FCM 则可以有效避免此类事情的发生,故在测细菌数目时更适宜使用 FCM。

3.5 常规指标和生物指标相关性

水中颗粒物为病原体的生长提供了载体,有机物颗粒、氨氮和硝态氮等影响着细菌的增殖^[32]。研究表明,细菌的生长与 COD 和温度成正相关^[33]。实际生产中,也常常利用常规指标在一定程度上间接反映生物指标水平。因此,水体中的常规指标同病原体的关系十分重要。

污水处理厂对常规指标和生物指标都有较高的去除率,二者出现较高的一致性。对生物指标和常规指标使用 SPSS 软件进行相关性分析,结果显示:病原体与 COD 相关性非常显著($P < 0.01$);病原体与 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 相关性显著($P < 0.05$)。

3.6 病原体检测的意义

人类长期直接或间接暴露在城市水景和水环境中,一旦这些水中有病原体微生物存在,就有可能对人体健康造成危害^[29]。挪威地区暴发肺炎军团菌疾病,就是因为当地污水处理厂释放出来的肺炎军团菌造成的^[1]。因此,水体中病原体检测显得尤为重要。

在污水处理过程中,病毒与病原菌相比更加难去除和灭活,在污水处理厂的排水中依然发现有感染人的病毒存在^[34]。研究发现,在污水处理厂出水中仍然有较高浓度的腺病毒存在。因此,病原体检

测在整个污水处理过程中是很有必要的。通过对污水处理厂各工艺段病原体的检测研究,可以更好地指导生产、优化工艺以及指导工艺升级改造,提高病原体去除效率,减少病原体的排放量,进而降低病原体疾病的暴发率。另外,还可以为评估污水处理厂处理效果及排水对受纳水体的生态分析提供技术支持。

4 结论

(1) FCM 快速准确对细菌和病毒进行计数, qPCR 获取典型病原体浓度水平。前者从宏观角度判别病原体污染情况;后者从微观角度论证病原体污染水平。两种方法联用使得检测结果更加具有说服力。

(2) FCM 和 qPCR 联用应用到实际污水处理厂及受纳水体检测中,结果发现:该污水处理厂对病原体有较高的去除率($> 93\%$);该污水处理厂排水对受纳水体基本没有负面影响。

(3) 研究为评估污水处理厂处理效果及排水对受纳水体的生态影响提供技术支持,从而可以更好地指导生产和工艺的升级改造。

参考文献:

- [1] Cai L, Zhang T. Detecting human bacterial pathogens in wastewater treatment plants by a high-throughput shotgun sequencing technique[J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, **47**(10): 5433-5441.
- [2] Silverman A I, Akromong M O, Amoah P, et al. Quantification of human norovirus GI, human adenovirus, and fecal indicator organisms in wastewater used for irrigation in Accra, Ghana[J]. *Journal of Water and Health*, 2013, **11**(3): 473-488.
- [3] Levy K, Nelson K L, Hubbard A, et al. Rethinking indicators of microbial drinking water quality for health studies in tropical developing countries: case study in northern coastal Ecuador[J]. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2012, **86**(3): 499-507.
- [4] 张崇森,王晓昌,周进宏,等. 城市地表水中肠道病原微生物与粪便污染指示菌的关系研究[J]. *环境科学学报*, 2012, **32**(11): 2789-2794.
- [5] Wang H, Edwards M, Falkinham J O III, et al. Molecular survey of the occurrence of *Legionella* spp., *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, and amoeba hosts in two chloraminated drinking water distribution systems[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, **78**(17): 6285-6294.
- [6] Guy R A, Payment P, Krull U J, et al. Real-time PCR for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in environmental water samples and sewage[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**(9): 5178-5185.
- [7] Duhamel S, Jacquet S. Flow cytometric analysis of bacteria-and virus-like particles in lake sediments[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, **64**(3): 316-332.

- [8] Brussaard C P D , Payet J P , Winter C , *et al.* American Society of Limnology and Oceanography. Quantification of aquatic viruses by flow cytometry [A]. In: Wilhelm S W , Weinbauer M G , Suttle C A (Eds.) . Manual of Aquatic Viral Ecology [M]. ASLO , 2010. 102-109.
- [9] Alonso J L , Amorós I , Guy R A. Quantification of viable *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in wastewater using propidium monoazide quantitative real-time PCR [J]. Parasitology Research , 2014 , **113** (7) : 2671-2678.
- [10] Marangí M , Giangaspero A , Lacasella V , *et al.* Multiplex PCR for the detection and quantification of zoonotic taxa of *Giardia* , *Cryptosporidium* and *Toxoplasma* in wastewater and mussels [J]. Molecular and Cellular Probes , 2015 , **29** (2) : 122-125.
- [11] Ramadan Q , Christophe L , Teo W , *et al.* Flow-through immunomagnetic separation system for waterborne pathogen isolation and detection: Application to *Giardia* and *Cryptosporidium* cell isolation [J]. Analytica Chimica Acta , 2010 , **673** (1) : 101-108.
- [12] Keserue H A , Füchslin H P , Wittwer M , *et al.* Comparison of rapid methods for detection of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. (oo) cysts using transportable instrumentation in a field deployment [J]. Environmental Science & Technology , 2012 , **46** (16) : 8952-8959.
- [13] Fykse E M , Aarskaug T , Thrane I , *et al.* *Legionella* and non-*Legionella* bacteria in a biological treatment plant [J]. Canadian Journal of Microbiology , 2013 , **59** (2) : 102-109.
- [14] Haramoto E , Kitajima M , Katayama H , *et al.* Real-time PCR detection of adenoviruses , polyomaviruses , and torque teno viruses in river water in Japan [J]. Water Research , 2010 , **44** (6) : 1747-1752.
- [15] Clark S T , Gilbride K A , Mehrvar M , *et al.* Evaluation of low-copy genetic targets for waterborne bacterial pathogen detection via qPCR [J]. Water Research , 2011 , **45** (11) : 3378-3388.
- [16] de Man H , van den Berg H H J L , Leenen E J T M , *et al.* Quantitative assessment of infection risk from exposure to waterborne pathogens in urban floodwater [J]. Water Research , 2014 , **48** : 90-99.
- [17] Oster R J , Wijesinghe R U , Haack S K , *et al.* Bacterial pathogen gene abundance and relation to recreational water quality at seven Great Lakes beaches [J]. Environmental Science & Technology , 2014 , **48** (24) : 14148-14157.
- [18] Brown M R , Camézuli S , Davenport R J , *et al.* Flow cytometric quantification of viruses in activated sludge [J]. Water Research , 2015 , **68** : 414-422.
- [19] Ma L L , Mao G N , Liu J , *et al.* Rapid quantification of bacteria and viruses in influent , settled water , activated sludge and effluent from a wastewater treatment plant using flow cytometry [J]. Water Science & Technology , 2013 , **68** (8) : 1763-1769.
- [20] Prest E I , Hammes F , Köttsch S , *et al.* Monitoring microbiological changes in drinking water systems using a fast and reproducible flow cytometric method [J]. Water Research , 2013 , **47** (19) : 7131-7142.
- [21] Gillespie S , Lipphaus P , Green J , *et al.* Assessing microbiological water quality in drinking water distribution systems with disinfectant residual using flow cytometry [J]. Water Research , 2014 , **65** : 224-234.
- [22] Sassoubre L M , Love D C , Silverman A I , *et al.* Comparison of enterovirus and adenovirus concentration and enumeration methods in seawater from Southern California , USA and Baja Malibu , Mexico [J]. Journal of Water and Health , 2012 , **10** (3) : 419-430.
- [23] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法 [M]. (第四版) . 北京: 中国环境科学出版社, 2002. 243-282.
- [24] Marie D , Brussaard C P D , Thyraug R , *et al.* Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry [J]. Applied and Environmental Microbiology , 1999 , **65** (1) : 45-52.
- [25] Koike S , Krapac I G , Oliver H D , *et al.* Monitoring and source tracking of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater adjacent to swine production facilities over a 3-year period [J]. Applied and Environmental Microbiology , 2007 , **73** (15) : 4813-4823.
- [26] Nazarian E J , Bopp D J , Saylor A , *et al.* Design and implementation of a protocol for the detection of *Legionella* in clinical and environmental samples [J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease , 2008 , **62** (2) : 125-132.
- [27] Suttle C A. Marine viruses-major players in the global ecosystem [J]. Nature Reviews Microbiology , 2007 , **5** (10) : 801-812.
- [28] Hewitt J , Greening G E , Leonard M , *et al.* Evaluation of human adenovirus and human polyomavirus as indicators of human sewage contamination in the aquatic environment [J]. Water Research , 2013 , **47** (17) : 6750-6761.
- [29] Sales-Ortells H , Agostini G , Medema G. Quantification of waterborne pathogens and associated health risks in urban water [J]. Environmental Science & Technology , 2015 , **49** (11) : 6943-6952.
- [30] Stewart G J , Sinigalliano C D. Detection of horizontal gene transfer by natural transformation in native and introduced species of bacteria in marine and synthetic sediments [J]. Applied and Environmental Microbiology , 1990 , **56** (6) : 1818-1824.
- [31] Lee C M , Sico C C , Abdullah N , *et al.* Estimation of 16S rRNA gene copy number in several probiotic *Lactobacillus* strains isolated from the gastrointestinal tract of chicken [J]. FEMS Microbiology Letters , 2008 , **287** (1) : 136-141.
- [32] Karimi B , Ehrampoush M H , Jabary H. Indicator pathogens , organic matter and LAS detergent removal from wastewater by constructed subsurface wetlands [J]. Journal of Environmental Health Science & Engineering , 2014 , **12** : 52.
- [33] 申玉春 , 刘国才 , 包文仲 , 等. 池塘细菌生长与 pH、COD、水温以及浮游生物的关系 [J]. 河北渔业 , 1996 , (5) : 8-10.
- [34] Sedmak G , Bina D , MacDonald J , *et al.* Nine-year study of the occurrence of culturable viruses in source water for two drinking water treatment plants and the influent and effluent of a Wastewater Treatment Plant in Milwaukee , Wisconsin (August 1994 through July 2003) [J]. Applied and Environmental Microbiology , 2005 , **71** (2) : 1042-1050.