

基于 PMA-定量 PCR 选择性检测技术的病原菌消毒特性研究

全铁铮, 吴舒旭, 李丹, 何苗*, 杨天, 施汉昌

(清华大学环境科学与工程系, 环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 北京 100084)

摘要:建立了一种核酸染料 propidium monoazide(PMA)与定量 PCR 技术联合选择性检测活性病原菌的技术(PMA-qPCR),以大肠杆菌作为模式菌,研究了氯和一氯胺消毒对病原菌的灭活特性.结果表明,PMA 染料能够分别去除 99.94% 和 99.99% 的来自非活性大肠杆菌和沙门氏菌的 DNA,PMA-qPCR 技术能够有效区分活性菌与非活性菌;PMA-qPCR 技术得到的氯和一氯胺消毒对大肠杆菌的灭活曲线符合一级动力学方程,灭活速率常数分别为 $2.24 \text{ L} \cdot (\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$ 和 $0.0175 \text{ L} \cdot (\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$,低于平板培养法得到的灭活速率常数;当大肠杆菌的去除率达到 99% 时,采用 PMA-qPCR 技术检测需要的 *ct* 值相比于平板培养法从 $0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}$ 上升到 $0.9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}$ (氯消毒)和从 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}$ 上升到超过 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}$ (一氯胺消毒);随着 *ct* 值的升高,常规 qPCR 的检测结果基本不变,因此常规 qPCR 不能够反映氯和一氯胺消毒对病原菌的灭活效果.作为一种新的表征消毒特性的检测技术,PMA-qPCR 技术有助于更为准确地评价氯和一氯胺消毒对病原菌的灭活效果.

关键词: PMA 染料; 定量 PCR; 活性菌; 氯消毒; 一氯胺消毒; 灭活特性

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2011)04-1120-07

Evaluation of Pathogen Disinfection Efficacy by Chlorine and Monochloramine Disinfection Based on Quantitative PCR Combined with Propidium Monoazide (PMA-qPCR)

TONG Tie-zheng, WU Shu-xu, LI Dan, HE Miao, YANG Tian, SHI Han-chang

(State Key Joint Laboratory of Environment Simulation and Pollution Control, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: A novel detection method of quantitative PCR combined with a DNA intercalating dye propidium monoazide (PMA-qPCR) was developed and then applied to analyze inactivation efficacy of chlorine and monochloramine on *E. coli* as a representative organism. The results shows that PMA removed 99.94% and 99.99% DNA from non-viable *E. coli* and *Salmonella* cells respectively and PMA-qPCR could effectively differentiate viable bacteria from non-viable bacteria; According to the first-order kinetic model, the inactivation coefficients on *E. coli* obtained by PMA-qPCR were $2.24 \text{ L} \cdot (\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$ and $0.0175 \text{ L} \cdot (\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$ for chlorine and monochloramine respectively, both of which were lower than those obtained by traditional plating counting method. In order to inactivate 99% of *E. coli*, the *ct* values by PMA-qPCR were $0.9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}$ and more than $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}$ for chlorine and monochloramine while those by plating counting method were only $0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}$ and $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}$, respectively; *E. coli* concentration detected by conventional qPCR kept almost the same when *ct* value increased, indicating that conventional qPCR was unable to evaluate inactivation efficacy of both chlorine and monochloramine disinfection. In summary, PMA-qPCR shows to be a promising method for evaluating disinfection efficacy by chlorine and monochloramine more accurately.

Key words: propidium monoazide (PMA); quantitative PCR; viable bacteria; chlorine disinfection; monochloramine disinfection; inactivation efficacy

消毒技术是饮用水供给、污水处理以及再生水回用中灭活病原菌的核心环节,而对活性病原菌消毒效果的准确评价是保障水质卫生安全的重要基础.传统的消毒效果的评价主要基于培养法,该方法以细菌的可培养性作为细菌活性的判断标准.但细菌在消毒剂存在的不利条件下可能进入“具有活性但无法培养”(viable but not culturable, VBNC)的状态,致使某些病原菌无法在平板培养基上形成菌落但仍然保持一定代谢能力,能够在适宜条件下恢复

其感染性^[1-4],因此基于该分析技术不能够准确反映消毒技术对活性病原菌的灭活效果.

目前国际上对细菌活性尚没有统一的定义. Nebe-von-Caron 等^[5]的研究表明,细胞膜受损的细

收稿日期: 2010-04-16; 修订日期: 2010-05-15

基金项目: 国家重点实验室专项基金项目(10Y04ESPCT); 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2008ZX07313-007); 国家自然科学基金项目(50878113)

作者简介: 全铁铮(1985~),男,硕士研究生,主要研究方向为环境病原微生物的检测, E-mail: ttz08@mails.tsinghua.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: hemiao@mail.tsinghua.edu.cn

菌不具有代谢活性,不能在适宜的条件下恢复生长,因此采用细胞膜的完整性作为细菌活性的判断标准为许多研究者所接受^[6,7]. PMA (propidium monoazide)是一种能够选择性进入细胞膜破损的非活性菌细胞内部的核酸染料,其能够与非活性菌的 DNA 共价结合并抑制其 PCR 反应,使得定量 PCR (qPCR) 只能检测到细胞膜完整的活性菌,而无法检测到细胞外 DNA 和细胞膜破损的非活性菌^[8,9]. 因此, PMA 染料与 qPCR 结合的检测技术 (PMA-qPCR) 既可以实现对进入 VBNC 状态病原菌的检测,又在一定程度上解决了常规 qPCR 无法区分活性菌和非活性菌的不足. 目前, PMA-qPCR 技术已开始用于选择性检测大肠杆菌等多种病原菌的活性菌^[8-16],但采用该技术针对不同消毒剂消毒特性的研究却鲜有报道.

鉴于此,本研究首先考察了 PMA-qPCR 技术针对水环境中 2 种典型病原菌大肠杆菌和沙门氏菌选择性检测活性菌的效果,然后采用 PMA-qPCR 技术研究了氯消毒和一氯胺消毒 2 种常见消毒方式对病原菌的灭活特性,综合比较了 PMA-qPCR、平板培养法以及常规 qPCR 等不同检测技术评价消毒效果的差异,探讨了基于 PMA-qPCR 分析技术的消毒机制,以期为更准确地评价不同消毒工艺对病原菌的灭活效果提供新的数据支持. 由于大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 被广泛用于消毒特性的研究^[17-19],因此本研究采用大肠杆菌作为研究消毒特性的模式菌.

1 材料与方 法

1.1 主要试剂与仪器

本研究中使用标准菌株购自中国普通微生物菌种保藏中心:大肠杆菌 (*Escherichia coli*, CGMCC 1.2385)、沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*, CGMCC 1.1859).

PMA-qPCR 所需试剂及仪器:PMA 染料购自美国 Biotium 公司;二甲基亚砷购自美国 Ameresco 公司;荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Code: DRR041A) 和 Premix Ex Taq[™] (Code: DRR039A) 购自日本 Takara 公司;iCycler iQ5 荧光定量 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司;650 W 卤素灯购自美国 GE 公司.

其它试剂与仪器:全基因组 DNA 提取试剂盒 QIAamp DNA Mini Kit 购自德国 Qiagen 公司;高速离心机购自德国 Eppendorf 公司;Biosep-mini 核酸蛋白仪购自日本岛津公司;总氯自由氯测定仪

(Catalog No.: 58700-00) 购自美国哈希公司;电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司;Gel Doc[™] XR 凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad 公司.

1.2 实验方法

1.2.1 PMA-qPCR 技术的检测原理及流程

PMA-qPCR 技术以细胞膜的完整性作为活性菌的判断标准,其检测原理在于:PMA 染料能够嵌入细胞外 DNA 或穿过非活性菌受损的细胞膜进入其细胞内进而嵌入其 DNA 内,但被阻隔在活性菌的完整细胞膜之外. 嵌入非活性菌 DNA 的 PMA 染料能够在强光的照射下通过叠氮基团与 DNA 进一步形成牢固的共价结合. 一旦 DNA 与 PMA 染料共价结合,便不能在后续的 PCR 反应中扩增,从而在 qPCR 中消除来自于非活性菌的 DNA 对检测结果的影响. 以上过程均在 DNA 的提取之前完成,未与 DNA 结合的游离性 PMA 染料在强光的照射下与水分子反应被去除,不会影响后续的 PCR 反应和 DNA 测定. PMA-qPCR 的检测流程如图 1 所示,即在 DNA 提取前向样品中加入核酸染料 PMA,样品经过 PMA 预处理之后,再进行 DNA 的提取,最后利用 qPCR 检测细胞膜完整的活性菌.

1.2.2 PMA 预处理过程及 DNA 的提取

将 PMA 染料溶解于 20% 的二甲基亚砷制备成 20 mmol·L⁻¹ 的储备液,放置于 -20℃ 下避光保存. 在 1.5 mL 透明离心管中加入 500 μL 待测样品,然后再加入 1.25 μL PMA 储备液,使得 PMA 的最终浓度为 50 μmol·L⁻¹,上下晃动 3~4 次,避光反应 5 min. 反应过程中不时振荡离心管,使样品与 PMA 充分接触反应. 然后,将离心管平放于冰上,用 650 W 卤素灯照射 2 min,离心管与卤素灯灯泡的距离为 20 cm. 反应结束后将离心管在 8 000 r/min 下离心 10 min,收集菌体用于后续的 DNA 提取.

采用 QIAamp DNA Mini Kit 试剂盒提取细菌的 DNA,按照生产厂家提供的说明书进行,获得的 DNA 采用 100 μL AE 洗脱液洗脱,立即进行 qPCR 或者保存于 -20℃ 待用.

1.2.3 qPCR 引物和探针的选择

本研究中大肠杆菌和沙门氏菌的 qPCR 检测采用 SYBR[®] Green qPCR,所采用的目的基因和相应引物序列见表 1.

1.2.4 qPCR 标准品的制备

大肠杆菌的标准品采用本实验室已制备的质粒标准品,制作方法参见文献[22],制备含有 *uidA* 基因的质粒 DNA. 大肠杆菌标准品构建过程中改用大

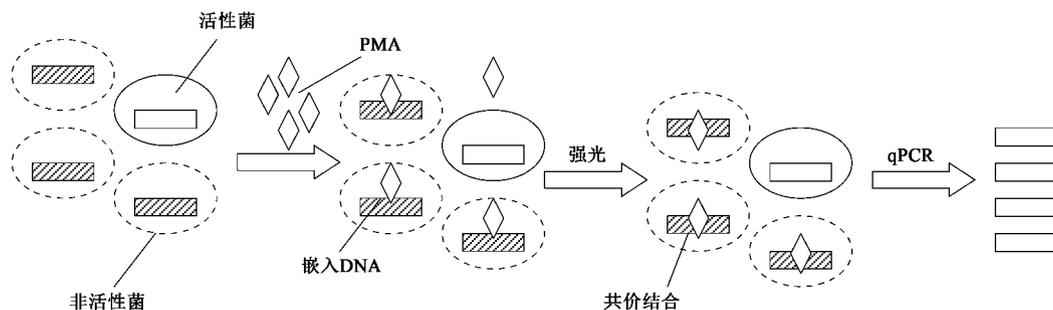


图1 PMA-qPCR 选择性检测活性菌的流程

Fig. 1 Process of PMA-qPCR in selectively detecting viable bacterial cells

表1 定量 PCR 采用的目的基因和相应引物序列

Table 1 Gene targets and primers used for qPCR detection

引物名称	目的基因	序列(5'-3')	PCR 产物长度/bp	文献
<i>E. coli</i> UAL1939b UAL2105b	<i>uidA</i>	ATGGAATTCGCCGATTTTGC ATTGTTTGCCTCCCTGCTGC	167	[20]
<i>Salmonella</i> spp. invA2-F invA2-R	<i>invA</i>	ATTCTGGTACTAATGGTGATGATC GCCAGGCTATCGCCAATAAC	287	[21]

肠杆菌种和与 *uidA* 基因相应的引物,目标基因经 PCR 扩增之后将特异性产物接入 pCR® 2.1-TOPO 载体 (Invitrogen) 中,经过酶切鉴定、测序分析和质粒提取等步骤获得大肠杆菌 DNA 标准品。

沙门氏菌的 qPCR 标准品的制备方法如下:菌种在营养肉汤培养基,37℃ 条件下培养 24 h;取 500 μL 菌悬液以 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,按照 1.2.2 节的方法提取细菌的全基因组 DNA,采用核酸蛋白仪测量 DNA 的浓度,按照以下公式换算成基因拷贝数:

$$\text{基因拷贝数} = \frac{\text{DNA 的浓度}}{\text{细菌全基因组的大小} \times 660} \times \text{NA}$$

式中,沙门氏菌全基因组大小采用 4.7 Mb^[23],660 为双链 DNA 一个碱基对的相对分子质量;NA 为阿佛加德罗常数 6.02×10^{23} 。

将提取到的 DNA 按 10 倍梯度稀释便得到 qPCR 的标准品。本研究中制备的大肠杆菌标准品浓度为 $6.60 \times 10^0 \sim 6.60 \times 10^6 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,沙门氏菌标准品浓度为 $1.18 \times 10^0 \sim 1.18 \times 10^6 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

1.2.5 qPCR

大肠杆菌 qPCR 的反应体系为 (20 μL): SYBR® Premix Ex Taq™ 10 μL,上下游引物各 0.8 μL(终浓度 $0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),DNA(标准品或样品)2

μL,双蒸水 6.4 μL 补足体积至 20 μL。定量 PCR 反应程序如下:1 个循环:95℃,30 s;40 个循环:95℃,5 s,60℃,20 s,72℃,15 s(收集荧光);熔解曲线的过程为:95℃,1 min,从 60℃ 开始每 30 s 温度升高 0.5℃,总共进行 71 个循环,结束温度为 95℃,反应结束之后 4℃ 保存。沙门氏菌 qPCR 的反应体系为 (20 μL):SYBR® Premix Ex Taq™ 10 μL,上下游引物各 0.5 μL(终浓度 $0.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),DNA(标准品或样品)4 μL,双蒸水 5 μL 补足体积至 20 μL。定量 PCR 反应程序如下:1 个循环:95℃,9 min;40 个循环:95℃,20 s,60℃,30 s,72℃,25 s(收集荧光);熔解曲线的过程同大肠杆菌。每次 qPCR 反应都设空白对照(以相同体积的双蒸水取代 DNA),每次测定设 2 个平行样。

2 结果与讨论

2.1 qPCR 的线性检测区间与特异性

本研究中 qPCR 的线性检测区间如下:大肠杆菌为 $1.20 \times 10^1 \sim 1.20 \times 10^7 \text{ copies} \cdot \text{reaction}^{-1}$;沙门氏菌为 $4.72 \times 10^0 \sim 4.72 \times 10^6 \text{ copies} \cdot \text{reaction}^{-1}$ 。以标准品浓度的对数值为横坐标,以临界循环数(threshold cycle)为纵坐标建立 qPCR 的标准曲线(图 2)。大肠杆菌和沙门氏菌标准曲线的线性相关系数均 > 0.99 ,PCR 扩增效率在 90% ~ 110% 之间。

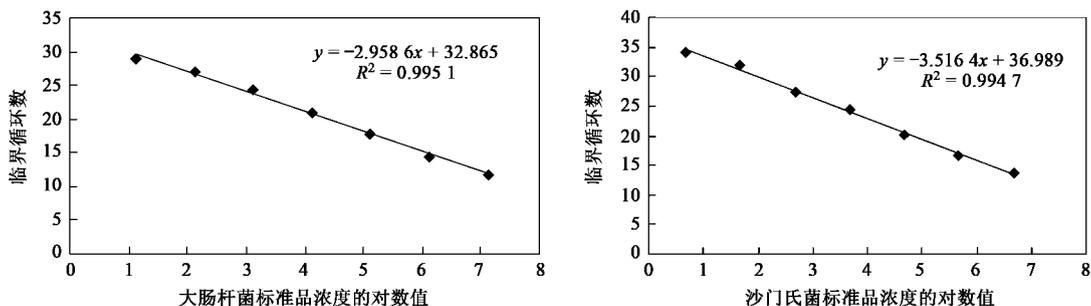


图2 大肠杆菌和沙门氏菌的 qPCR 标准曲线

Fig. 2 qPCR standard curve for *E. coli* and *Salmonella* spp.

经过熔解曲线(图略)分析,2种熔解曲线均呈现单一的熔点峰,大肠杆菌和沙门氏菌的熔解曲线峰值分别为 $(87 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 和 $(84 \pm 0.5)^\circ\text{C}$.这表明本实验采用的 qPCR 的标准曲线线性关系良好,扩增效率高,对相应的目标菌具有很强的特异性.

2.2 PMA-qPCR 对不同病原菌活性菌的选择性检测

将大肠杆菌、沙门氏菌分别在 37°C 下培养 24 h,取 125 μL 菌悬液在 95°C 下加热 10 min 以充分灭活菌体,制备非活性菌.取 10 μL 活性菌或非活性菌的菌悬液加入 500 μL PBS 中,同时采用 PMA-qPCR 和常规 qPCR 进行检测,检测结果见图 3. qPCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,选用 DNA marker DL2000 (Takara),采用 0.01% 的 GoldView™ 染料(赛百盛)染色经凝胶成像获得 qPCR 产物的电泳图(图 4).

图 3 表明,常规 qPCR 和 PMA-qPCR 对于大肠杆菌和沙门氏菌的检测规律基本一致:常规 qPCR 对非活性菌的检测结果相比于活性菌没有明显下降,说明病原菌被加热灭活后其 DNA 仍然存在,能够被常规 qPCR 检测到,使得常规 qPCR 的检测结果

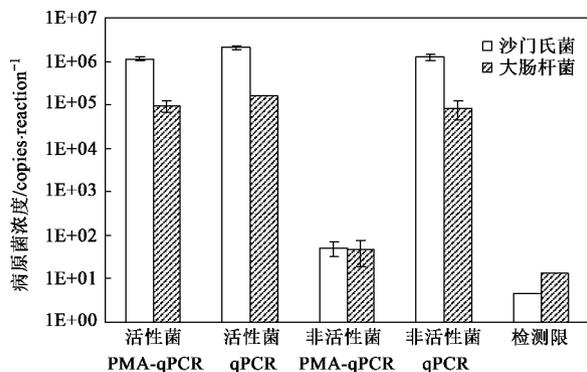
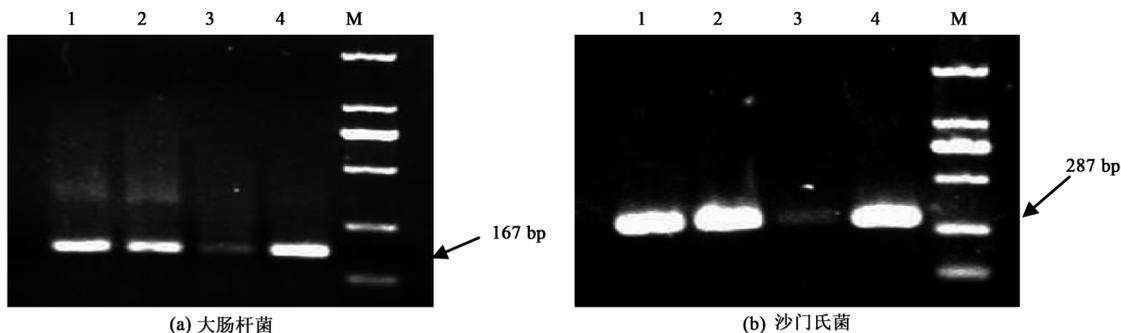


图3 PMA-qPCR 和 qPCR 对不同病原菌的检测结果

Fig. 3 PMA-qPCR and qPCR detection results for different bacterial stains

包含了已经被灭活的病原菌,高估了样品中活性菌的数量;PMA-qPCR 对非活性菌的检测结果接近于 qPCR 的检测限,相比于常规 qPCR 分别下降 3.24 lg(大肠杆菌)和 4.38 lg(沙门氏菌),即 PMA 染料有效地去除了 99.94% (大肠杆菌)和 99.99% (沙门氏菌)的非活性菌 DNA;PMA-qPCR 对活性菌的检测结果与常规 qPCR 基本相当,说明 PMA 染料不



(a) 大肠杆菌

(b) 沙门氏菌

Lane 1: PMA-qPCR 检测活性菌; Lane 2: 常规 qPCR 检测活性菌;
Lane 3: PMA-qPCR 检测非活性菌; Lane 4: 常规 qPCR 检测非活性菌, M: DNA ladder

图4 大肠杆菌和沙门氏菌的 qPCR 产物电泳图

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis profile of qPCR products for *E. coli* and *Salmonella* spp.

会去除活性菌的 DNA. 琼脂糖凝胶电泳的结果与 qPCR 的检测结果一致(图 4): 常规 qPCR 对活性菌和非活性菌的 DNA 均能够扩增出较高亮度的条带且亮度没有明显差异, 而 PMA-qPCR 对非活性菌 DNA 的扩增产物的条带亮度明显减弱. 综上所述, PMA-qPCR 检测技术能够有效区分活性菌与非活性菌.

2.3 PMA-qPCR 研究氯对大肠杆菌的消毒特性

向 10 mL $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PBS 缓冲溶液加入 10 μL 大肠杆菌菌悬液, 使其初始浓度约为 $10^6 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$, 然后加入不同体积的次氯酸钠储备液 ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), 采用 *N, N*-二乙基对苯二胺-硫酸亚铁铵滴定法 (DPD) 测定, 确定溶液中自由氯浓度分别为 0、0.15、0.6、0.9、1.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 接触反应 1 min 后分别向各溶液中加入 $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硫代硫酸钠溶液终止反应. 然后用营养肉汤培养基测定消毒后大肠杆菌的浓度, 同时取 1 mL 溶液收集菌体, 进行 PMA-qPCR 和常规 qPCR 检测. 利用上述方法得到的氯消毒过程中大肠杆菌的灭活曲线见图 5, 其中 *ct* 值代表初始氯浓度 *c* 与反应时间 *t* 的乘积; 灭活效率 = $\lg(N/N_0)$, 式中, *N* 代表 *t* 时刻的大肠杆菌浓度, *N*₀ 代表 *t* 等于 0 时的大肠杆菌浓度, 即大肠杆菌的初始浓度.

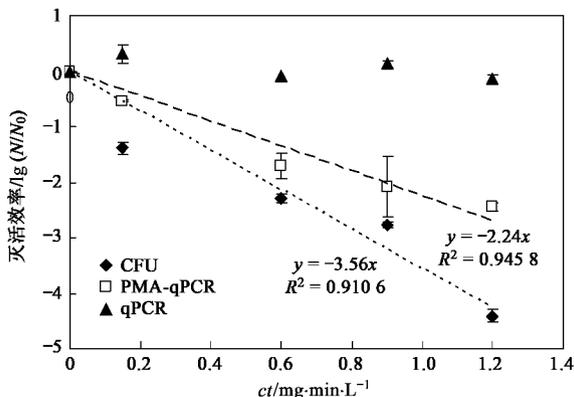


图 5 氯消毒过程大肠杆菌的灭活曲线

Fig. 5 Inactivation kinetics of chlorine disinfection on *E. coli*

从图 5 可以看出, 采用 PMA-qPCR 技术检测时, 氯消毒过程中大肠杆菌的灭活曲线呈现明显的下降趋势, 符合一级动力学方程, 线性相关系数 (R^2) 达到 0.945 8, 与平板培养法得到的灭活曲线趋势一致. PMA-qPCR 技术得到的灭活速率常数为 $2.24 \text{ L}\cdot(\text{mg}\cdot\text{min})^{-1}$, 低于平板培养法得到的 $3.56 \text{ L}\cdot(\text{mg}\cdot\text{min})^{-1}$. 当大肠杆菌的灭活率达到 2 lg (99%) 时, 采用 PMA-qPCR 检测需要的 *ct* 值相比于

平板培养法从 $0.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}$ 上升到 $0.9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}$. 类似地, Sawaya 等^[24] 也发现采用 BacLight™ 试剂盒 (同样以细胞膜完整性作为活性菌判断标准) 获得的氯消毒灭活速率低于平板培养法. 目前氯消毒对病原菌的灭活机制被认为主要通过破坏病原菌的细胞膜^[25], 本研究说明氯在消毒过程中的确破坏了病原菌的细胞膜, 但氯对病原菌细胞膜的破坏速率低于其对病原菌可培养性的破坏速率.

采用常规 qPCR 评估氯消毒对大肠杆菌的灭活效果时, 随着 *ct* 值的增大, 大肠杆菌的浓度基本不变, 不符合“氯消毒对大肠杆菌有灭活作用”这一客观规律. 这表明常规 qPCR 能够检测到被氯灭活的大肠杆菌的 DNA, 常规 qPCR 无法评价氯消毒对病原菌的灭活效果.

2.4 PMA-qPCR 研究一氯胺对大肠杆菌的消毒特性

向 10 mL $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PBS 缓冲溶液加入 10 μL 大肠杆菌菌悬液, 然后加入不同体积的一氯胺储备液 ($500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 采用 DPD 法分别测定溶液中自由氯和化合氯的浓度, 确定溶液中一氯胺的浓度分别为 0、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 接触反应 10 min 后向各溶液中加入 $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硫代硫酸钠溶液终止反应. 然后采用平板培养法、PMA-qPCR 和常规 qPCR 对消毒后的大肠杆菌浓度进行检测. 利用上述方法得到的一氯胺消毒过程中大肠杆菌的灭活曲线见图 6.

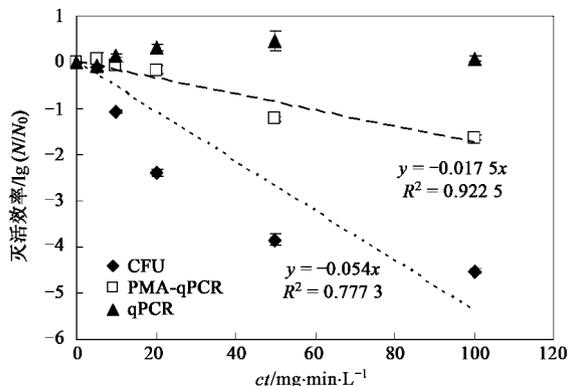


图 6 一氯胺消毒过程大肠杆菌的灭活曲线

Fig. 6 Inactivation kinetics of monochloramine disinfection on *E. coli*

从图 6 可以看出, 采用 PMA-qPCR 技术检测时, 一氯胺消毒过程中大肠杆菌的灭活曲线呈现明显的下降趋势, 符合一级动力学方程, 线性相关系数

(R^2) 达到 0.922 5, PMA-qPCR 技术得到的灭活速率常数为 $0.0175 \text{ L} \cdot (\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$, 低于平板培养法得到的 $0.054 \text{ L} \cdot (\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$. 这说明与氯消毒一样, 一氯胺对病原菌的细胞膜也具有破坏作用, 且一氯胺对细胞膜的破坏能力低于其对病原菌可培养性的破坏能力. 当大肠杆菌灭活率达到 99% (2 lg) 时, 采用 PMA-qPCR 检测需要的 ct 值相比于平板培养法从 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}$ 上升到超过 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}$. 2.3 和 2.4 节的研究结果共同表明, 采用 PMA-qPCR 技术检测得到的消毒效果低于平板培养法, 许多在消毒剂的作用下失去培养性的病原菌仍然具有完整的细胞膜, 可能在适宜的条件下恢复生长能力, 因此传统的平板培养法高估了氯和一氯胺对病原菌的消毒效果, 使得现有的基于平板培养法检测结果的消毒剂量可能不能够达到完全灭活病原菌的作用. PMA-qPCR 检测技术能够选择性检测细胞膜完整的活性菌, 从而为更准确地评价氯和一氯胺的消毒效果, 改进消毒工艺提供了新的数据支持.

此外, 采用 PMA-qPCR 得到的大肠杆菌的灭活曲线出现一个“延迟”现象, 即在 ct 值 $< 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}$ 时, 大肠杆菌的浓度没有明显的下降. Wahman 等^[26] 在研究 *Nitrosomonas europaea* 的消毒动力学时也发现了这一现象, 作者认为这一现象产生的原因可能是在细菌被灭活之前一氯胺需要对细菌的多个作用位点进行攻击, 因此减缓了消毒的速度.

随着 ct 值的增加, 采用常规 qPCR 检测得到的大肠杆菌浓度基本没有变化, 说明常规 qPCR 也能够检测到被一氯胺灭活的大肠杆菌的 DNA, 无法评价一氯胺消毒对病原菌的灭活效果.

3 结论

(1) 对于水环境中 2 种典型病原菌大肠杆菌和沙门氏菌, PMA 染料能够分别去除 99.94% 和 99.99% 的来自于非活性菌的 DNA, 但不会对活性菌的 DNA 产生明显影响, 因此 PMA-qPCR 选择性检测技术能够有效区分活性菌与非活性菌.

(2) 采用 PMA-qPCR 技术得到的氯和一氯胺消毒对大肠杆菌的灭活曲线符合一级动力学方程, 灭活速率常数分别为 $2.24 \text{ L} \cdot (\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$ 和 $0.0175 \text{ L} \cdot (\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$, 低于平板培养法得到的 $3.56 \text{ L} \cdot (\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$ 和 $0.054 \text{ L} \cdot (\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$, 说明以上 2 种消毒剂在消毒过程中破坏了病原菌的细胞膜, 但其对病原菌细胞膜的破坏速率低于对病原菌

可培养性的破坏速率.

(3) 达到相同灭活效果时, 采用 PMA-qPCR 技术检测需要的 ct 值显著高于平板培养法, 说明平板培养法高估了氯和一氯胺消毒对病原菌的灭活效果, PMA-qPCR 技术有助于更为准确地评估这 2 种消毒技术对病原菌的灭活效果.

(4) 随着 ct 值的升高, 常规 qPCR 的检测结果基本不变, 说明常规 qPCR 技术无法评估氯消毒和一氯胺消毒对病原菌的灭活效果.

致谢: 感谢美国蒙塔那州立大学生物膜工程中心的 Nocker 博士在实验操作方面给予的指导与帮助.

参考文献:

- [1] Lemarchand K, Masson L, Brousseau R. Molecular biology and DNA microarray technology for microbial quality monitoring of water[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2004, **30**(3): 145-172.
- [2] Shannon K E, Lee D Y, Trevors J T, *et al.* Application of real-time quantitative PCR for the detection of selected bacterial pathogens during municipal wastewater treatment[J]. *Science of the Total Environment*, 2007, **382**(1): 121-129.
- [3] Oliver J D. The viable but nonculturable state in bacteria[J]. *Journal of Microbiology*, 2005, **43**(5): 93-100.
- [4] Colwell R R, Brayton P R, Grimes D J, *et al.* Viable, but nonculturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implication for release of genetically engineered microorganisms[J]. *Nature Biotechnology*, 1985, **3**: 817-820.
- [5] Nebe-von-Caron G, Stephens P J, Hewitt C J, *et al.* Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2000, **42**(1): 97-114.
- [6] Grégori G, Citterio S, Ghiani A, *et al.* Resolution of viable and membrane-compromised bacteria in freshwater and marine waters based on analytical flow cytometry and nucleic acid double staining[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(10): 4662-4670.
- [7] Nocker A, Sossa K E, Camper A K. Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, **70**(2): 252-260.
- [8] Nocker A, Mazza A, Masson L, *et al.* Selective detection of live bacteria combining propidium monoazide sample treatment with microarray technology[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2009, **76**(3): 253-261.
- [9] Nocker A, Cheung C Y, Camper A K. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, **67**(2): 310-320.
- [10] Pan Y, Breidt F Jr. Enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells by real-time PCR with propidium monoazide and ethidium

- monoazide in the presence of dead cells [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, **73**(24): 8028-8031.
- [11] Rawsthorne H, Dock C N, Jaykus L A. PCR-based method using propidium monoazide to distinguish viable from nonviable *Bacillus subtilis* spores [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, **75**(9): 2936-2939.
- [12] Bae S, Wuertz S. Discrimination of viable and dead fecal *Bacteroidales* bacteria by quantitative PCR with propidium monoazide [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, **75**(9): 2940-2944.
- [13] Bae S, Wuertz S. Rapid decay of host-specific fecal *Bacteroidales* cells in seawater as measured by quantitative PCR with propidium monoazide [J]. *Water Research*, 2009, **43**(19): 4850-4859.
- [14] Kobayashi H, Oethinger M, Tuohy M J, *et al.* Improving clinical significance of PCR: use of propidium monoazide to distinguish viable from dead *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* [J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 2009, **27**(9): 1243-1247.
- [15] Cawthorn D M, Witthuhn R C. Selective PCR detection of viable *Enterobacter sakazakii* cells utilizing propidium monoazide or ethidium bromide monoazide [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, **105**(4): 1178-1185.
- [16] Varma M, Field R, Stinson M, *et al.* Quantitative real-time PCR analysis of total and propidium monoazide-resistant fecal indicator bacteria in wastewater [J]. *Water Research*, 2009, **43**(19): 4790-4801.
- [17] Cho M, Kim J, Kim J Y, *et al.* Mechanisms of *Escherichia coli* inactivation by several disinfectants [J]. *Water Research*, 2010, **44**(11): 3410-3418.
- [18] 王云, 鲁巍, 张晓健. 氯及氯胺灭活大肠杆菌的消毒动力学模型 [J]. *环境科学*, 2005, **26**(5): 100-104.
- [19] Berry D, Xi C, Raskin L. Effect of growth conditions on inactivation of *Escherichia coli* with monochloramine [J]. *Environmental Science and Technology*, 2009, **43**(3): 884-889.
- [20] Heijnen L, Medema G. Quantitative detection of *E. coli*, *E. coli* O157 and other shiga toxin producing *E. coli* in water samples using a culture method combined with real-time PCR [J]. *Journal of Water and Health*, 2006, **4**(4): 487-498.
- [21] Fey A, Eichler S, Flavier S, *et al.* Establishment of a real-time PCR based approach for accurate quantification of bacterial RNA targets in water, using *Salmonella* as a model organism [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **70**(6): 3618-3623.
- [22] Ahmed W, Goonetilleke A, Powell D, *et al.* Prevalence and occurrence of zoonotic bacterial pathogens in surface waters determined by quantitative PCR [J]. *Water Research*, 2009, **43**(19): 4918-4928.
- [23] 胡秀华, 何苗, 刘丽, 等. 水中轮状病毒实时定量 PCR 外标准品的构建 [J]. *环境科学*, 2008, **29**(2): 380-385.
- [24] Sawaya K, Kaneko N, Fukushi K, *et al.* Behaviors of physiologically active bacteria in water environment and chlorine disinfection [J]. *Water Science and Technology*, 2008, **58**(7): 1343-1348.
- [25] Venkobachar C, Lyengar L, Rao A. Mechanism of disinfection: effect of chlorine on cell membrane functions [J]. *Water Research*, 1977, **11**(8): 727-729.
- [26] Wahman D G, Wulfeck-Kleier K A, Pressman J G. Monochloramine disinfection kinetics of *Nitrosomonas europaea* using propidium monoazide quantitative PCR (PMA-qPCR) and LIVE/DEAD® -BacLight™ [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, **75**(17): 5555-5562.