

研究报告

余氯对河流水体微生物灭活效应的评价

毛冠男 宋宇昊 王莹莹*

(南开大学环境科学与工程学院 环境污染过程与基准教育部重点实验室 天津市城市生态环境修复与污染防治重点实验室 天津 300071)

摘要:【目的】研究不同余氯浓度和暴露时间对细菌的去除效果,分析不同余氯条件对细胞 ATP 的影响。【方法】以河水中微生物群落为试验对象,利用流式细胞术(Flow cytometry, FCM)评估不同余氯浓度和暴露时间的灭活效果,检测不同余氯浓度时细胞内(外) ATP 的变化情况。【结果】不同余氯浓度和暴露时间对细菌的去除效果产生不同的结果。在余氯浓度 <2 mg/L 情况下,延长氯暴露时间可以增加细菌的去除效果,在余氯浓度 ≥ 2 mg/L 条件下,较短氯暴露时间就可以灭活 90% 细菌。高核苷酸细菌(HNA)和低核苷酸细菌(LNA)表现出不同氯耐受能力,且 HNA 细菌相比 LNA 细菌更容易受到氯的损伤。细胞内 ATP 随余氯浓度增加而减少,在高浓度余氯条件下(≥ 2 mg/L)细胞外 ATP 才会增加。【结论】微生物活性随着余氯作用的增加而降低,FCM 法和 ATP 检测法可以用于评估加氯消毒对微生物稳定性的影响。

关键词: 流式细胞术, ATP, 余氯, 微生物稳定性

Disinfection effect of residue chlorine on riverine bacterial communities

MAO Guan-Nan SONG Yu-Hao WANG Ying-Ying*

(Key Laboratory of Pollution Processes and Environmental Criteria (Ministry of Education), Tianjin Key Laboratory of Environmental Remediation and Pollution Control, College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: [Objective] This study aimed to study the effect of different free chlorine concentration and exposure time on bacterial inactivation as well as cellular adenosine triphosphate (ATP). [Methods] Inactivation behaviors of autochthonous bacteria from river water were investigated with flow cytometry (FCM). Total cell counts (TCC), intact cell counts (ICC) and intracellular and extracellular (ATP) were analyzed during the chlorination process. [Results] The results showed that both chlorine concentration and exposure time influenced the removal efficiency of bacteria. At a low concentration of chlorine (<2 mg/L), a prolonged exposure time was needed to achieve a high removal efficiency of bacteria. In contrast, at a high concentration of chlorine (≥ 2 mg/L), inactivation

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31670498)

*Corresponding author: E-mail: wangyy@nankai.edu.cn

Received: December 28, 2016; **Accepted:** March 22, 2017; **Published online** (www.cnki.net): April 06, 2017
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31670498)

*通讯作者: E-mail: wangyy@nankai.edu.cn

收稿日期: 2016-12-28; 接受日期: 2017-03-22; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-04-06

of more than 90% of bacteria could be achieved within a short exposure time (i.e. 1 min). The results also indicated high nucleic acid (HNA) content bacteria were more vulnerable than low nucleic acid (LNA) content bacteria during the chlorination process. Furthermore, it was observed that concentration of intracellular ATP decreased with increasing chlorine doses. However, the increase of extracellular ATP was only recorded at high chlorine doses (≥ 2 mg/L). **[Conclusion]** Chlorination resulted in a decrease of ICC, and reduction of bacterial activity with increasing chlorine concentration. The results demonstrated that FCM and ATP measurements are useful and fast tools to assess inactivation kinetics of indigenous riverine bacteria during the chlorination treatment.

Keywords: Flow cytometry, ATP, Free chlorine, Microbiological stability

饮用水安全关系到人们的日常健康。在饮用水处理方法中,消毒的主要目的是灭活水中大部分微生物,使水中微生物指标符合饮用水标准^[1]。消毒不但是水处理工艺中重要的组成部分,也是保障城市输水管网中微生物稳定性的最后屏障。由于余氯消毒具有杀菌能力强、技术工艺成熟、运行费用低等优点,被大多数饮用水处理行业采用^[2]。我国饮用水卫生标准对饮用水管网中余氯浓度也有明确规定^[3],但对消毒过程中余氯的添加量和接触时间没有详细的规定。在我国为保证管网末端细菌指标达到饮用水标准,传统的余氯控制方法是提高出厂水的余氯浓度,但过多地提高余氯浓度不仅造成资源浪费,还会带来消毒副产物生成和嗅觉感官性影响^[4]。一般来讲 C_t 值(余氯浓度与接触时间的乘积)与消毒效率有关^[5],但相同的 C_t 值而余氯浓度和接触时间不同的组合,是否会产生不同的消毒效率还需进一步研究。

目前用于检测水中微生物的方法主要基于异养菌平板计数法(Heterotrophic plate counts, HPC)^[6]。然而越来越多的研究表明,HPC 法难以准确反映水体中微生物量的变化^[7-8]。基于流式细胞术(Flow cytometry, FCM)和 ATP 等检测方法具有快速、准确等优点,近年来被广泛应用于饮用水中微生物的测定^[9-11]。FCM 应用于饮用水的微生物检测越来越倾向于自动化,Besmer 等^[12]采用全自动线上 FCM (Online FCM)成功地监控水环境中微生物的变化;Arnoldini 等^[13]应用实时 FCM 方法(Real-time FCM)研究温度对细胞膜的破坏过程。目前 FCM 技术和细胞 ATP 检测在余氯消毒过程中的应用已有大量

报道,但这些研究主要集中在余氯消毒过程中活菌数量及细胞内 ATP 含量的变化,而且细胞内 ATP 含量随余氯浓度的升高而降低。但对于细胞内 ATP 降低的原因还不明确,主要有以下两种假设^[14-15]: (1) 余氯消毒抑制了细胞内 ATP 的合成过程;(2) 余氯消毒破坏了细胞膜,导致细胞内 ATP 溢出到细胞外。只有通过检测细胞外 ATP 含量的变化才能确定细胞内 ATP 降低的原因。溢出到细胞外的 ATP 可以被微生物利用威胁饮用水安全,因此,检测细胞外 ATP 的变化过程有重要的意义。

FCM 在检测环境中微生物群落时,FCM 的绿色荧光直方图可以明显区分高核苷酸(HNA)细菌和低核苷酸(LNA)细菌两大类^[16]。它们是根据 DNA 经过染色后荧光密度和侧向角散射信号不同而区分的。研究表明,HNA 细菌和 LNA 细菌不仅具有活性,同时也有重要的环境生态意义。LNA 细菌的活性与其生物量和生长速率要高于 HNA 细菌^[17],并且 LNA 细菌特殊的细胞膜结构和代谢抗性机制,使其能够适应外界环境压力,规避病毒感染^[18-19]。目前对于这两大类细菌的研究主要集中在细菌的环境分布及比重上^[20],而典型消毒剂余氯对这两类细菌的影响还缺乏报道。由于 HNA 和 LNA 细菌可以代表水体中微生物群落的大致分布^[21],采用 FCM 方法分析余氯对这两类细菌的研究,可以快速得到余氯对微生物群落的影响。有研究表明这两类细菌对氧化剂可以表现出不同的应对行为,LNA 细菌的细胞膜破坏速率要小于 HNA 细菌^[15]。瑞士等国家已经将 HNA 和 LNA 细菌作为日常饮用水的检测指标^[12]。常见的机会致病菌如 *Escherichia coli* 等都属

于 HNA 细菌^[15], 我国饮用水标准虽未引入 HNA 和 LNA 细菌作为饮用水消毒指标, 但对机会致病菌有严格的消毒标准。

本文以 FCM 为基本检测方法, 结合 ATP 检测方法, 评估不同余氯浓度与不同氯接触时间对河水中土著菌的去除效率。同时分析不同余氯浓度造成水中细胞内外 ATP 变化的规律, 为饮用水厂余氯消毒剂的添加量和暴露时间提供理论依据, 更有效地保障饮用水的安全。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器和试剂

C6 Accuri 流式细胞仪, 美国 BD 公司; Glomax 单管发光检测仪、BacTiter-Glo™ 试剂盒, 美国 Promega 公司; DP3900 分光光度计、LCK 310 余氯测定试剂盒, 德国 Hach-Lange 公司; 次氯酸钠(分析纯)、二甲基亚砜(分析纯), 国药集团; SYBY Green I 染料, 美国 Invitrogen 公司; Propidium Iodide, 美国 Sigma 公司; 0.22 μm 过滤器, 美国 MilliPore 公司。

1.2 试验流程

实验选取河流水中微生物群落作为研究对象, 依据氯的接触时间(1、2、4、8 min)^[22-23]不同分为 4 组, 每组分别取 20 mL 水样至 8 个 50 mL 的离心管中。取其中 7 个离心管分别加入次氯酸钠储备溶液 20 mL, 稀释后得到游离余氯浓度为 0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00 和 10.00 mg/L, 最后一个离心管作为空白对照。第一组的 8 个离心管于 1 min 后加入硫代硫酸钠溶液(最终浓度为 0.8 mmol/L)以中和水样中的余氯。后面三组依次于 2、4 和 8 min 后加入硫代硫酸钠溶液(终浓度为 0.8 mmol/L)以中和余氯。然后测定总菌数量、活菌数量, 并通过公式 $k = [(N_0 - N) / N_0] \times 100\%$ 计算灭活率 k 值, 其中 N 为余氯灭活过程中的活菌数量, N_0 为初始的活菌数量。

选取其中暴露时间为 4 min, 氯浓度为 0、0.25、0.50、2.00 和 10.00 mg/L 的样品, 测定总 ATP 含量和细胞外 ATP 含量及活菌数量。

1.3 次氯酸钠储备溶液的配制

将次氯酸钠溶液用超纯水分别稀释到余氯浓度

为 0.50、1.00、2.00、4.00、8.00、16.00 和 20.00 mg/L 7 个不同浓度的储备溶液, 通过 Hach 余氯测定仪测定余氯浓度。由于仪器的量程为 0.05–2.00 mg/L, 在测定较大浓度时, 先稀释到测定量程内, 然后再用仪器测定, 仪器的测量精度为 0.01 mg/L。

1.4 荧光染色

参照 Berney 等^[24]染色方法区分样品中的活菌数量和死菌数量。总菌数量荧光染色方法选用 SYBR Green I。用经 0.22 μm 尼龙膜过滤后的二甲基亚砜(DMSO)将 SYBR Green I 稀释 100 倍作为标准工作溶液。1 mL 样品中加入 10 μL 标准工作溶液, 37 °C 孵育 15 min。活菌数量荧光染色方法, 将 SYBR Green I 标准工作溶液与 Propidium Iodide (30 mmol/L)按 50:1 (体积比)混合, 作为 SYPI 标准工作溶液。1 mL 样品中加入 10 μL SYPI 标准工作溶液, 37 °C 孵育 15 min。

1.5 FCM 测定

流式细胞仪的激发光源功率为 50 mW, 发射波长为 488 nm。流式细胞仪的参数设定参照 Prest 等^[25]方法。检测时均设定绿色荧光为触发信号, 所有信号收集在绿色荧光 FL1=530±30 nm 和红色荧光 FL3>670 nm 二维散点图上。采用 Cflow 软件进行数据分析。通过流式细胞仪“Gate”设定方法区分样品中主要含有的两类细菌: HNA 细菌和 LNA 细菌。每个样品重复测定 3 次。

1.6 ATP 测定

ATP 测定参照 Hammes 等^[26]方法, 750 μL 样品加入 50 μL ATP 试剂, 38 °C 孵育 20 s, ATP 仪检测样品的发光值。根据 ATP 标准曲线, 将发光值转化为 ATP 含量。样品过 0.22 μm 的无菌滤膜得到细胞外 ATP 值, 总 ATP 值减去细胞外 ATP 值得到细胞内 ATP 值。每个样品重复测定 3 次。

2 结果与分析

2.1 不同余氯浓度和暴露时间对细菌灭活的影响

如图 1 所示, 未添加氯时, 活菌数量为 7.8×10^5 cells/mL; 当添加余氯时, 活菌数量总体呈明显下降趋势, 灭活效果也随之增加; 添加余氯浓度为

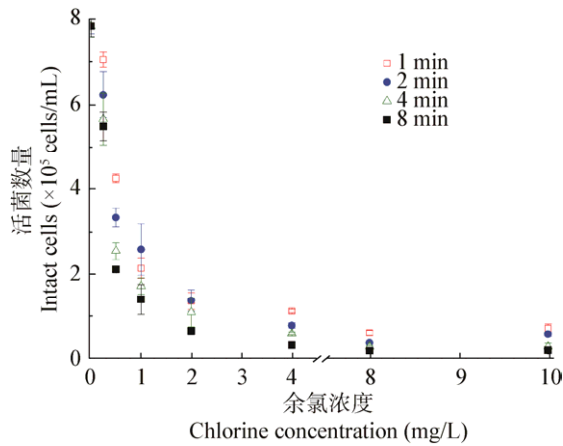


图1 活菌数量在不同氯暴露时间随余氯浓度变化过程
Figure 1 Change of intact cell counts with different chlorine doses and chlorine exposure time

0.25 mg/L 时,活菌数量下降到 $(5.5-7.0) \times 10^5$ cells/mL,不同暴露时间的灭活率都在 30% 以下;当添加余氯浓度为 8 mg/L 时,活菌数量已经下降到 $(0.2-0.5) \times 10^5$ cells/mL,不同暴露时间的灭活率都已经超过了 90%;当增加余氯浓度到 10 mg/L 时灭活率基本保持不变。图 1 结果表明,相同余氯浓度条件下延长氯暴露时间也会增加细菌的灭活率,当余氯浓度为 0.25-2.00 mg/L 时,暴露时间为 8 min 的细菌灭活率比暴露时间为 1 min 的要增加 10% 以上。细菌的灭活率随暴露时间的增加而显著增加。但随着余氯浓度的增加,暴露时间对细菌灭活的影响在逐渐减小。例如,余氯浓度为 8 mg/L 时,暴露时间 1 min 就可以灭活 93% 的细菌,暴露时间延长到 8 min,灭活率仅增加了 5%。

2.2 HNA 与 LNA 细菌的变化

通过流式细胞仪绿色荧光直方图可以明显地区分原水样中 HNA 细菌和 LNA 细菌(图 2)。当未添加氯时,HNA 细菌占总菌数的 34%,LNA 细菌占总菌数的 66% (图 3)。随着余氯浓度增加到 10 mg/L (暴露时间 1 min),HNA 细菌的比例呈现出下降趋势,从 34% 下降到 16%,而 LNA 细菌的比例从 66% 上升到 84% (图 3)。其它暴露时间表现出相似的结果。总体来看,HNA 细菌相比于 LNA 细菌更容易受到氯的损害。

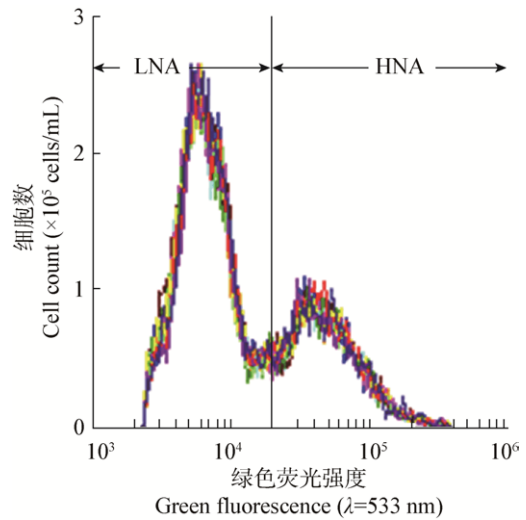


图2 LNA 细菌和 HNA 细菌流式细胞仪绿色荧光直方图

Figure 2 LNA and HNA on the FCM green fluorescence histogram

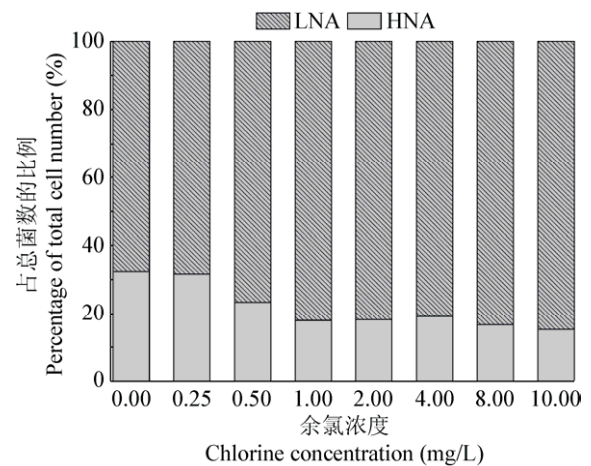


图3 不同余氯浓度(1 min)对 HNA (%)和 LNA (%)的影响

Figure 3 Effect of different chlorine doses (1 min) on HNA (%) and LNA (%)

2.3 ATP 的变化

如图 4 所示,当未添加氯时,样品中活菌数量为 7.8×10^5 cells/mL,细胞内 ATP 为 0.15 nmol/L,占总 ATP 的 52%;随着余氯浓度的升高,细胞内 ATP 和活菌数量都呈现出下降趋势。当余氯浓度为 10 mg/L 时,活菌数量下降到 0.2×10^5 cells/mL,细胞内 ATP 低于检测限(0.001 nmol/L),未检出。值得注意的是,细胞外 ATP 在整个余氯消毒过程中呈现

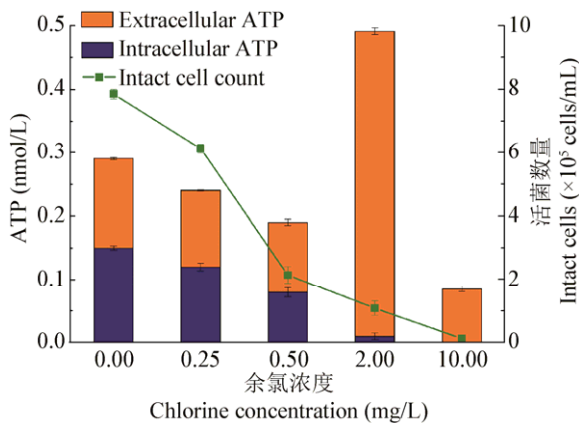


图4 细胞内ATP、细胞外ATP和活菌数随余氯浓度的变化

Figure 4 Change of intracellular ATP, extracellular ATP and intact cells with different chlorine doses

出不同的变化趋势。当未添加氯时,细胞外ATP为0.14 nmol/L,占总ATP的48%。当余氯的浓度在0.25–0.50 mg/L时,细胞外ATP并没有随细胞内ATP的减少而增加,而是基本稳定在0.12–0.13 nmol/L之间(图4),细胞外ATP占总ATP的比例也保持在52%。当余氯浓度增加到2 mg/L时,细胞外ATP显著上升到了0.41 nmol/L,同时细胞外ATP占总ATP比例也上升到了93%。余氯浓度为10 mg/L时,细胞外ATP又下降到0.15 nmol/L,并且检测到的ATP全部为细胞外ATP。对于总ATP而言,在余氯浓度为0.25–0.50 mg/L时,由于细胞内ATP下降,细胞外ATP保持不变,总ATP呈现出下降趋势,当余氯浓度上升到2 mg/L时,总ATP相比于未添加氯时增加了168%,当余氯浓度继续增加到10 mg/L时,总ATP又下降到0.15 nmol/L。

3 讨论

氯消毒是我国目前使用最为广泛的消毒技术^[27],微生物稳定性和安全性是影响消毒过程(消毒投放量和暴露接触时间)的重要因素。传统的微生物稳定性评价方法只能检测到占实际微生物数量很小的一部分,难以精确地反映消毒过程中微生物的变化趋势。相比于传统的HPC方法,FCM方法能更好地评估不同余氯消毒过程对微生物的去除效果^[28]。

本文采用的SYPI两种荧光染料,其中SYBR Green I发射出绿色荧光可以结合样品中全部细菌的DNA,即检测出总细菌数,而PI染料只能通过细胞膜受损的细菌,并且发射红色荧光,其信号可以覆盖在SYBR Green I上,即区分活性细菌和膜受损细菌^[7]。细胞膜的通透性被认为是区分活/死细胞的一个相对保守条件^[29]。本文通过比较不同余氯浓度和不同氯暴露时间,可以得出在余氯浓度<2 mg/L时,延长氯暴露时间可以增加细菌的去除效果,但细菌的灭活率都低于90%;当氯浓度高于2 mg/L时,暴露时间为1 min的细菌灭活率就可以达到90%。根据一阶灭活动力方程 $\ln(N/N_0) = -c[Ox]dt$, N 为余氯灭活过程中的活菌数量, N_0 为初始的活菌数量, $[Ox]$ 为余氯浓度, t 为暴露时间,计算灭活系数 c 值在0.14–0.68之间。这与Ramseier等^[15]FCM检测结果相似,说明增加氯浓度相比于延长暴露时间有更强的灭活效果。不同的生态系统中HNA细菌和LNA细菌浓度比例有较大的差异^[30],说明环境因子或环境压力会影响其分布。Prest等^[25]提出“水体微生物指纹图谱”的概念,即HNA(LNA)细菌所占总菌数的比例代表不同水体中微生物的特性或反映在环境压力下水体中微生物的变化。流式细胞仪根据绿色荧光强度可以明显区分HNA和LNA细菌(图2),因此可以根据绿色荧光强度这一参数分析HNA和LNA细菌在不同余氯浓度和氯接触时间的比例变化。在本研究中LNA细菌的初始比重(未添加氯)到达66%。随着余氯浓度的增加,LNA细菌的比例呈现出上升的趋势,HNA细菌比例相对逐渐下降。由于HNA细菌与LNA细菌细胞膜的组成成分不同,导致这两类细菌对氯有不同响应^[21]。研究表明LNA细菌由于核酸含量低可以应对不利环境,其生存竞争能力要高于HNA细菌^[16],LNA细菌成为加氯消毒后的优势菌,今后也可以依据HNA和LNA细菌的比例来评估加氯消毒的效果。Ramseier等^[15]研究表明,常用氧化剂对HNA细菌和LNA细菌的灭活系数不同,而且HNA细菌的灭活系数要高于LNA细菌,这与本研究的结果

相似。尽管加氯消毒后 LNA 细菌的比例明显上升, 但 LNA 细菌的绝对数量呈下降趋势, 并且 LNA 细菌不易携带病毒, 不会威胁饮用水安全。加氯消毒后含有一部分非致病细菌可以维持管网中可利用有机碳(AOC)含量的平衡, 不易造成其它致病菌的生长, 有利于维持供水管网中微生物的稳定性。

本研究中采用 ATP 方法来评价加余氯消毒对细胞能量代谢的影响。ATP 结果表明, 细胞内 ATP 与活菌数量的变化基本保持一致, 呈现出随余氯浓度增加而下降的趋势, 但影响细胞内 ATP 下降的原因是不同的。当余氯浓度在 0.25–0.50 mg/L 时, 细胞内 ATP 含量减少, 但细胞外 ATP 含量基本保持相对稳定, 说明此时细胞内 ATP 并没有大量释放到细胞外。造成细胞内 ATP 含量下降的原因是细胞内 ATP 合成过程受到抑制, 即细胞内更多的 ATP 将转化为细菌所需的能量。Nescerecka 等^[31]在评价加氯消毒对大肠杆菌 ATP 影响时, 发现在氯浓度 <0.35 mg/L 时细菌细胞外 ATP 含量占总 ATP 比例保持不变, 这与本研究的结果相似。但当余氯浓度提升到 2 mg/L, 细胞内 ATP 也下降, 此时细胞外 ATP 的含量却明显上升, 这是由于高浓度的氯使大部分细胞膜受损(通过流式细胞仪测定活菌数已经降低到起始的 15%), 细胞内 ATP 快速流失到细胞外, 造成细胞外 ATP 含量明显升高。此时总 ATP 含量与初始条件(未添加氯)相比也有较高的增加。造成总 ATP 含量明显上升的主要原因: (1) 高浓度的余氯可以抑制细胞 ATP 的水解功能, 这部分 ATP 并不能转化为能量, 相比无氯(低余氯)条件, 总 ATP 含量有所增加^[32]; (2) 在余氯的作用下可以增加 ATP 试剂的检测量^[14], 由于细胞膜的作用, 通常情况下 ATP 试剂并不能与全部细胞中的 ATP 相结合, 高浓度余氯可以增加细胞膜的通透性^[15], 使得更多细胞的 ATP 被检出, 造成总 ATP 检测量增加。有研究表明, 细胞外 ATP 可以作为磷源被微生物利用, 潜在造成饮用水中微生物的不稳定性^[31]。所以在消毒过程中, 评估细胞内和细胞外 ATP 含量的变化具有非常重要的意义。随着氯浓度进一步增

加(10 mg/L), 总 ATP 含量下降到初始的 28%, 这是由于 ATP 分子被高浓度的氯氧化。

FCM 技术和细胞 ATP 检测已经大量应用于饮用水中微生物的测定, 研究表明活菌数量与胞内 ATP 含量线性相关^[18,25,31]。但以往研究仅注重于检测加氯消毒过程中活菌数量及胞内 ATP 含量变化, 较少分析加氯消毒对微生物群落及细胞能量代谢的影响。本研究采用 FCM 技术评估不同余氯浓度和暴露时间对微生物群落的灭活效果, 同时分析了余氯浓度对细胞内和细胞外 ATP 的影响。研究结果表明不同余氯浓度会影响细胞内的能量代谢。FCM 技术和细胞 ATP 检测为研究氯消毒对微生物的灭活效果提供了一套有效手段。本研究仅对比了不同氯浓度和暴露时间的消毒效果, 还需进一步研究其它消毒工艺对微生物的去除效率。

4 结论

(1) 不同余氯浓度和暴露时间会对河水中细菌呈现出不同的去除效果, 较高氯浓度(>2 mg/L)在较短时间(1 min)内可以灭活河水中 90%的细菌。

(2) HNA 细菌和 LNA 细菌表现出不同的氯耐受能力, HNA 细菌更容易受到氯的损伤。

(3) 通过检测细胞内和细胞外 ATP 含量变化可知, 在氯浓度<0.5 mg/L 时, 细胞内 ATP 水解作用大于合成作用。当氯浓度>2 mg/L 时, 细胞膜损伤, 细胞内 ATP 释放到细胞外, 同时细胞内 ATP 的合成受到抑制。

参考文献

- [1] Vreeburg JHG, Boxall JB. Discolouration in potable water distribution systems: a review[J]. *Water Research*, 2007, 41(3): 519-529
- [2] Simões LC, Simões M, Vieira MJ. Influence of the diversity of bacterial isolates from drinking water on resistance of biofilms to disinfection[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(19): 6673-6679
- [3] Ministry of Health of the People's Republic of China, Standardization administration of the People's Republic of China. GB 5749-2006 Standards for drinking water quality[S]. Beijing: Standards Press of China, 2007 (in Chinese)
中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB 5749-2006 生活饮用水卫生标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007

- [4] Chen ZT. Study on chlorine residue concentration optimization assessment model for urban water supply network[D]. Chongqing: Master's Thesis of Chongqing University, 2014 (in Chinese)
陈正挺. 城市供水管网余氯浓度优化控制评估模型研究[D]. 重庆: 重庆大学硕士学位论文, 2014
- [5] Sadiq R, Rodriguez MJ. Disinfection by-products (DBPs) in drinking water and predictive models for their occurrence: a review[J]. Science of the Total Environment, 2004, 321(1/3): 21-46
- [6] Bartram J, Cotruvo J, Exner M, et al. Heterotrophic plate counts and drinking-water safety: the significance of HPCs for water quality and human health[R]. Geneva: World Health Organization, 2003
- [7] Berney M, Vital M, Hülshoff I, et al. Rapid, cultivation-independent assessment of microbial viability in drinking water[J]. Water Research, 2008, 42(14): 4010-4018
- [8] Douerelo I, Boxall JB, Deines P, et al. Methodological approaches for studying the microbial ecology of drinking water distribution systems[J]. Water Research, 2014, 65: 134-156
- [9] Hammes F, Egli T. Cytometric methods for measuring bacteria in water: advantages, pitfalls and applications[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010, 397(3): 1083-1095
- [10] Wang YY, Hammes F, de Roy K, et al. Past, present and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology[J]. Trends in Biotechnology, 2010, 28(8): 416-424
- [11] Yu H, Ma LL, Mao GN, et al. Fast and safety detection of drinking water in respect of microbial quality[J]. Microbiology China, 2012, 39(8): 1171-1178 (in Chinese)
余辉, 马丽丽, 毛冠男, 等. 饮用水微生物的安全快速检测[J]. 微生物学通报, 2012, 39(8): 1171-1178
- [12] Besmer MD, Weissbrodt DG, Kratochvil BE, et al. The feasibility of automated online flow cytometry for *in-situ* monitoring of microbial dynamics in aquatic ecosystems[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 265
- [13] Arnoldini M, Heck T, Blanco-Fernández A, et al. Monitoring of dynamic microbiological processes using real-time flow Cytometry[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e80117
- [14] Hammes F, Berney M, Wang YY, et al. Flow-cytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes[J]. Water Research, 2008, 42(1/2): 269-277
- [15] Ramseier MK, von Gunten U, Freihofer P, et al. Kinetics of membrane damage to high (HNA) and low (LNA) nucleic acid bacterial clusters in drinking water by ozone, chlorine, chlorine dioxide, monochloramine, ferrate (VI), and permanganate[J]. Water Research, 2011, 45(3): 1490-1500
- [16] Liu J, Song YH, Ma R, et al. Correlation of LNA and HNA bacteria based on flow cytometric characteristics[J]. China Environmental Science, 2016, 36(3): 865-874 (in Chinese)
刘杰, 宋宇昊, 马芮, 等. 基于流式细胞特性的 LNA 和 HNA 细菌相关性研究[J]. 中国环境科学, 2016, 36(3): 865-874
- [17] Zubkov MV, Sleigh MA, Burkill PH. Assaying picoplankton distribution by flow cytometry of underway samples collected along a meridional transect across the Atlantic Ocean[J]. Aquatic Microbial Ecology, 2000, 21(1): 13-20
- [18] Williams TJ, Ertan H, Ting L, et al. Carbon and nitrogen substrate utilization in the marine bacterium *Sphingopyxis alaskensis* strain RB2256[J]. The ISME Journal, 2009, 3(9): 1036-1052
- [19] Bouvier T, Maurice CF. A single-cell analysis of virioplankton adsorption, infection, and intracellular abundance in different bacterioplankton physiologic categories[J]. Microbial Ecology, 2011, 62(3): 669-678
- [20] Bouvier T, Del Giorgio PA, Gasol JM. A comparative study of the cytometric characteristics of High and Low nucleic-acid bacterioplankton cells from different aquatic ecosystems[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(8): 2050-2066
- [21] Wang Y, Hammes F, Boon N, et al. Isolation and characterization of low nucleic acid (LNA)-content bacteria[J]. The ISME Journal, 2009, 3(8): 889-902
- [22] Pereira VJ, Marques R, Marques M, et al. Free chlorine inactivation of fungi in drinking water sources[J]. Water Research, 2013, 47(2): 517-523
- [23] Huang JJ, Hu HY, Tang F, et al. Inactivation and reactivation of antibiotic-resistant bacteria by chlorination in secondary effluents of a municipal wastewater treatment plant[J]. Water Research, 2011, 45(9): 2775-2781
- [24] Berney M, Hammes F, Bosshard F, et al. Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight kit in combination with flow cytometry[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(10): 3282-3290
- [25] Prest EI, 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
- [26] Hammes F, Goldschmidt F, Vital M, et al. Measurement and interpretation of microbial adenosine tri-phosphate (ATP) in aquatic environments[J]. Water Research, 2010, 44(13): 3915-3923
- [27] Liu J. Studies on combined disinfection processes of chlorine and chloramines in drinking water[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Tsinghua University, 2009 (in Chinese)
刘静. 饮用水组合氯化消毒工艺研究[D]. 北京: 清华大学博士学位论文, 2009
- [28] Liu XX, Huo ZZ, Yun H, et al. Application of flow cytometry to rapid detection of bacteria[J]. Microbiology China, 2014, 41(1): 161-168 (in Chinese)
刘新星, 霍转转, 云慧, 等. 流式细胞术在细菌快速检测中的应用[J]. 微生物学通报, 2014, 41(1): 161-168
- [29] Virto R, Mañas P, Álvarez I, et al. Membrane damage and microbial inactivation by chlorine in the absence and presence of a chlorine-demanding substrate[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(9): 5022-5028
- [30] Liu J, Hao ZY, Ma LL, et al. Spatio-temporal variations of high and low nucleic acid content bacteria in an exorheic river[J]. PLoS One, 2016, 11(4): e0153678
- [31] Nescerecka A, Juhna T, Hammes F. Behavior and stability of adenosine triphosphate (ATP) during chlorine disinfection[J]. Water Research, 2016, 101: 490-497
- [32] Barrette Jr WC, Hannum DM, Wheeler WD, et al. General mechanism for the bacterial toxicity of hypochlorous acid: abolition of ATP production[J]. Biochemistry, 1989, 28(23): 9172-9178