

饮用水微生物的安全快速检测

余辉 马丽丽 毛冠男 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】为了更好地分析饮用水中的微生物含量。【方法】利用流式细胞术(Flow cytometry, FCM)、ATP 测定方法检测瓶装无气饮用水中的微生物数量、可同化有机碳(Assimilable organic carbon, AOC)含量以及微生物活性,并将检测结果与传统的饮用水微生物检测技术相对照。【结果】FCM 方法可快速区分水样中的活性细菌和非活性细菌,AOC 含量反映了水样中微生物再生能力;而 ATP 检测方法也能比异养细菌平板计数法(Heterotrophic plate count, HPC)更好地反映瓶装无气饮用水中的实际微生物含量。【结论】FCM、ATP 测定方法要明显优于依赖于培养的传统方法。

关键词: 饮用水, 流式细胞术, 微生物活性, 可同化有机碳, 细菌再生长能力

Fast and safety detection of drinking water in respect of microbial quality

YU Hui MA Li-Li MAO Guan-Nan WANG Ying-Ying*

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

Abstract: [Objective] The current study investigates the microbial quality of drinking water using various microbial detection methods. [Methods] We analyzed the microbial quality of still bottled drinking water using flow cytometric cell count, ATP assay, AOC (assimilable or-

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31000247); 高等学校博士学科点专项科研基金课题(No. 20100031120018)

*通讯作者: ✉: wangyy@nankai.edu.cn

收稿日期: 2011-12-28; 接受日期: 2012-05-03

ganic carbon) assay and cell viability test. **[Results]** We found that the flow cytometry allowed fast and accurate discrimination of the live/dead bacteria and detection of the micro-scale AOC. Our results also showed that ATP is a better indicator than the heterotrophic plate counts of the actual active microorganism content in still bottled drinking water. **[Conclusion]** The results suggested that the flow cytometric cell count and ATP assay are more suitable methods for assessing microbial quality in bottled drinking water than the conventional heterotrophic plate count method.

Keywords: Drinking water, Flow cytometry, Microbial viability, Assimilable organic carbon, Bacterial regrowth potential

饮用水源水、饮用水管网以及市售无气瓶装水中都发现过大量的微生物,有些水样中还包含致病性细菌、病毒、寄生虫(如原虫和蠕虫)等。这些与饮用水相关微生物的存在严重威胁人们的身体健康^[1],因此饮用水源水必须经过严格的杀菌消毒处理和微生物指标检测才能送抵终端用户。目前,饮用水中微生物的常规检测,主要依靠异养菌平板计数法(Heterotrophic plate count, HPC)、多管发酵法、滤膜法等来实现。但由于自然环境中的绝大部分细菌是无法培养的,这些方法会在很大程度上低估饮用水中的实际微生物数量,当外界压力、温度、营养等条件改变时,这些细菌会进入“活的不可培养状态”^[2]。此时,我们所检测到的细菌可能只占实际微生物数量的极少部分。另一方面,当饮用水中的微生物浓度过高时,检测过程中还容易出现菌落蔓延现象而影响对结果的观察,尽管我们可以利用梯度稀释避免菌落蔓延,但这反映的并不是饮用水中的真实微生物数量,所以其结果的准确性和真实性仍值得商榷。有些研究也指出,一些进入“活的不可培养状态”的致病菌在条件适宜的时候会恢复活性^[3-4],这些致病菌的自身保护机制使得它们有可能逃避检测人员的“眼睛”,同时也增加了我们所面临的风险。如何解决这一问题也成为常规饮用水微生物检测中一个不得不思考的问题。

传统的饮用水微生物检测方法一般需要 24-48 h 才能得到结果,耗时较长,不利于及时了解当天出水中的微生物状况,为人们的饮用水安全埋下了隐患。因此我们急需可以更加快速准确的检测手段来克服和避免传统饮用水微生物检测方法的弊端。

目前,流式细胞术(Flow cytometry, FCM)、ATP 检测法已经被广泛地应用于实验室范围的饮用水微生物研究。相比于传统的饮用水微生物检测法,这些方法更加方便快捷,测定结果更加准确。本文报道了采用 FCM、可同化有机碳(Assimilable organic carbon, AOC)测定、ATP 检测等方法对瓶装无气饮用水中的微生物状况进行的快速评估。与传统方法相比,我们建立的快速检测法不仅可以缩短检测时间,而且可以更准确地区分水中活性细菌和非活性细菌,并能估算这些微生物的再生能力^[5-6],从而有助于饮用水厂及时掌握各水处理工艺流程的即时微生物质量状况,更有效地保障饮用水的安全。

1 材料与方 法

1.1 采 样

为了更清楚地掌握目前市面上销售的瓶装无气饮用水的微生物质量,本研究选用了 18 个品牌的瓶装无气饮用水(在此我们对其编号 A-R),

每个品牌均选 3 瓶进行平行采样。为了保证实验的平行性, 选购的各品牌瓶装水均出自同一批次, 且同一品牌的瓶装水在同一天进行检测。

1.2 分析方法

1.2.1 荧光染色: 荧光染料选用 SYBR Green I, Propidium iodide (PI) (美国 Invitrogen 公司)。取适量 SYBR Green I, 用过 0.22 μm 尼龙膜过滤后的二甲亚砜(DMSO)将其稀释 100 倍, 作为标准工作溶液。再将其与 PI (30 mmol/L)按 50:1 混合, 混合后的染料置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。取各品牌瓶装水 1 mL, 加入 10 μL 混合染料进行荧光染色, 室温条件下避光孵化 25 min。

1.2.2 FCM 测定: 流式细胞仪(德国 Partec 公司, 型号 CyFlow Space), 光源功率 50 mW, 发射波长 488 nm, 采用绝对计数技术来测定 200 μL 内的颗粒数目, 其线性范围为 $2\times 10^2-1\times 10^5$ cells/mL, 检出限为 200 cells/mL, 绝对计数误差小于 5%^[7]。使用流式细胞仪进行测定时, 通过调节滤光片收集发射光信号, 信号收集软件为 FlowMax。绿色荧光(FL1)被设定为触发参数, 信号收集波长 520 ± 20 nm, 红色荧光(FL3)信号收集波长 > 615 nm; 所有信号均被收集在绿/红荧光二维散点图上。仪器增益设置为 FL1=350, FL3=650, Speed=3, 对数放大倍数为 log4。用鞘液稀释样品以保证测定过程中流式细胞仪计数小于 500 cells/s。若待测水样浊度较高, 则需预先过孔径为 20 μm 的滤膜, 以防堵塞进样口, 影响检测。各品牌瓶装水均取 3 个样作为平行, 进行测定。

1.2.3 AOC 测定: 实验采用的是简化后的 AOC 测定方法^[8-9], 将水样 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d, 每种品牌 3 瓶, 作为平行。测定培养前后的微生物变化, 用微生物净生长速率来评价饮用水中 AOC 含量, 其计算公式为

$$\text{AOC}[\mu\text{g C/L}] = \frac{(\text{net grown cells})/L}{1 \times \frac{10^7 \text{ cells}}{\mu\text{gC}}}$$

1.2.4 ATP 测定: 采用 Promega GLOMAX 单管发光检测仪及 BacTiter-GloTM 试剂盒来检测水样的发光值, 根据 ATP 标准曲线, 将发光值转换为 ATP 含量。采用经优化的 ATP 检测方法^[10], 即利用 0.22 μm 的无菌过滤膜(MilliPore)区分微生物 ATP 和环境 ATP, 每个品牌瓶装水取 3 个样, 作为平行。

1.2.5 微生物菌落数测定: 采用传统饮用水微生物检测方法, 依据国家标准^[11], 检测各品牌瓶装水中的菌落总数, 大肠菌群数量以及耐热大肠杆菌数量, 每个品牌瓶装水取 3 个样, 作为平行。

2 结果与分析

2.1 活性/非活性细菌含量测定

活性/非活性细菌含量: 使用 SYBR Green I/PI 混合染料对水样进行染色, 并结合 FCM 测定后, 发现除 D、R、H 水样外, 绝大部分水样的细菌含量都小于 10^3 cells/mL。其中 D、R 两种水样中存在着大量细菌, D 水样细菌总数为 1.49×10^5 cells/mL, 其中活性细菌数量占细菌总数的 74.8%, 数量为 1.11×10^5 cells/mL; R 水样细菌总数为 2.77×10^4 cells/mL, 其中活性细菌数量占细菌总数的 99.3%, 数量达到 2.75×10^4 cells/mL; 除此之外, 只有 H 水样的细菌总数超过 1.00×10^3 cells/mL, 但 H 水样中活性细菌数量只占总菌数的 4.90% (图 1)。

2.2 AOC 含量测定

AOC 含量: 各品牌瓶装水 AOC 含量从 0 到 1.20 $\mu\text{g/L}$ 不等, 水样 R 的 AOC 含量最高, 达到 1.20 $\mu\text{g/L}$, 其在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d 后微生物大量繁殖; 除 R 之外, 其他品牌瓶装水 AOC 含量均接近于 0, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d 后微生物数量并没有明显变化。包括图 1 中微生物数量很高的水样 D, 其实际 AOC 值也不高。

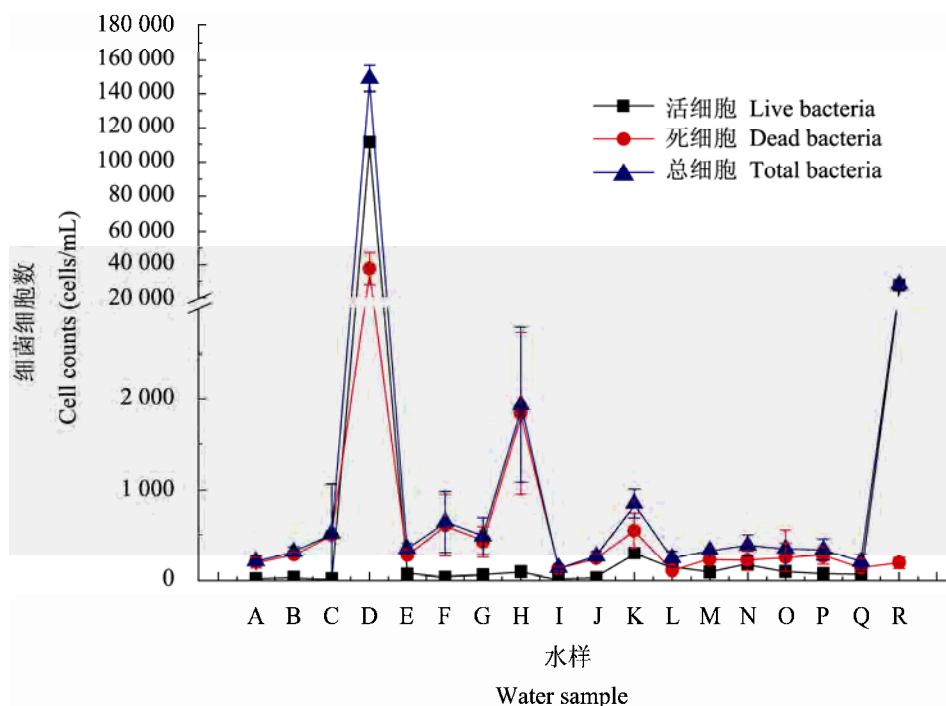


图1 各品牌瓶装水中微生物含量

Fig. 1 The microbial concentration in different brands of bottled drinking water

2.3 ATP含量测定

ATP 可以为虫荧光素-虫荧光素酶反应提供能量, 在反应中每消耗 1 分子 ATP, 便会产生 1 分子光子^[12], 因此通过测定此酶催化反应的发光值便可得到水样中的 ATP 含量。ATP 测定所依据的是荧光素酶反应, Promega GLOMAX 单管发光检测仪检测线性范围为 10^{-11} – 10^{-15} mol, 仪器检出限为 10^{-15} mol。在实际检测中, 只有 D、I、K、R 品牌的饮用水 ATP 含量在检出限以上; 进一步采用 $0.22\ \mu\text{m}$ 的无菌过滤膜来区分微生物 ATP 和环境 ATP。以水样 D 为例, 在过 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜之前水样中活性细菌占绝大部分(图 2), 而过 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜之后活性细菌则所剩无几(图 3), 从图中我们可以看出水样中绝大部分细菌已经被 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜截留下来, 此时测定过 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜之后的水样, 得到的是环境 ATP, 用总 ATP 减去环境 ATP 便是微生物体内所含 ATP。取 ATP 检出限以上的点 ($n=9$) 与相对应的细胞总数作线性

相关图(图 4), 可以发现 FCM 所测定的细胞总数与虫荧光素酶反应测定的水样总 ATP 具有较好的线性关系, $R^2=0.919$ 。这表明在水样微生物检测中, ATP 测定法与 FCM 测定法具有很好的相关

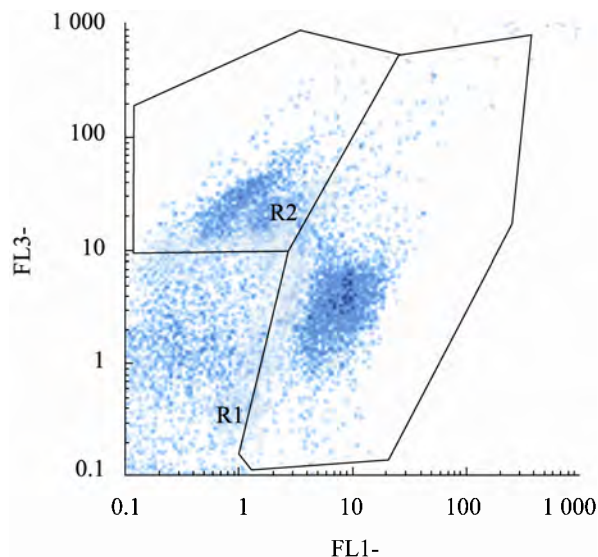


图2 D水样过 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜之前的细菌FCM示意图
Fig. 2 FCM dot-plot for the bacteria community of sample D before filtration through $0.22\ \mu\text{m}$ -filter

性。取各水样中活细胞数量与活细胞内 ATP 含量作线性关系图时, 其线性相关性更强, $R^2=0.95$ (图 5)。而 HPC 与水样总 ATP, 环境 ATP 与非活性细菌数之间均无线性关系。从各水样细菌 ATP 含量分布图中(图 6), 可以看出 D、R 水样中微生物所含 ATP 占其总 ATP 的绝大部分, 而 I、K 水

样中则主要是环境 ATP。表 1 显示, D、R 水样中环境 ATP 所占比例仅为 $(6.83\pm 2.16)\%$ 和 $(5.50\pm 0.84)\%$, 而 I、K 水样环境 ATP 所占比例则分别高达 $(85.3\pm 17.5)\%$ 和 $(60.7\pm 13.8)\%$, 当环境 ATP 占整个水样 ATP 比例较大时, 单细胞 ATP 含量变化较大, 这也说明当环境基质较为复杂时, 我们必须去除样品中的环境 ATP 才能较好地检测出样品中的微生物含量。

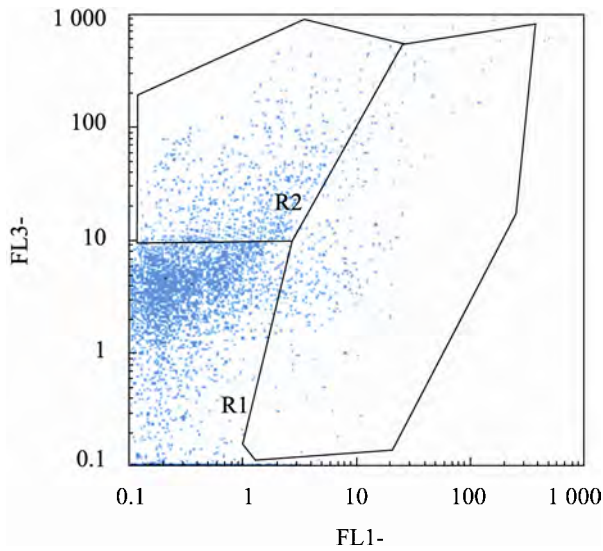


图 3 D 水样过 0.22 μm 滤膜之后的细菌 FCM 示意图
Fig. 3 FCM dot-plot for the bacteria community of sample D after filtration through 0.22 μm-filter

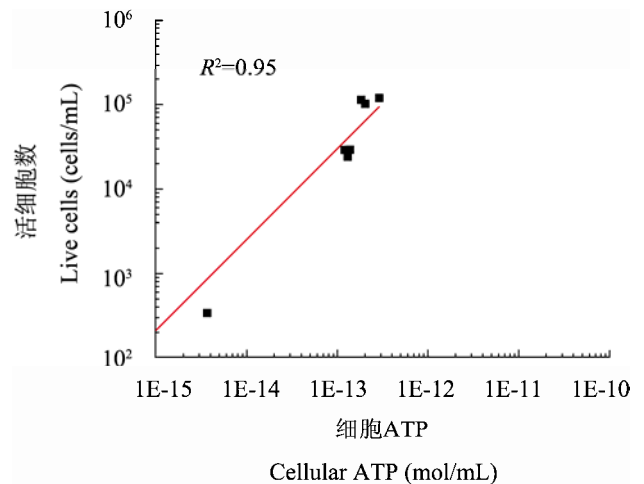


图 5 各水样中所含活性细菌数与细胞内 ATP 相关性
Fig. 5 The correlation between the quantity of live bacteria and the bacterial ATP content in different brands of bottled drinking water

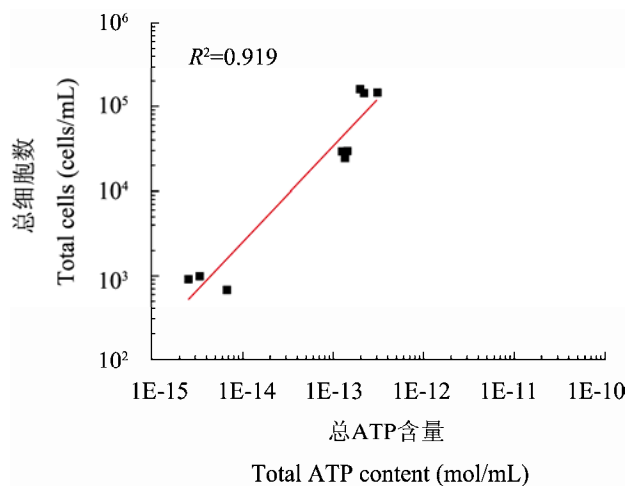


图 4 各水样细胞总数与相应的总 ATP 含量相关性
Fig. 4 The correlation between the total cell concentrations and the ATP content in different brands of bottled drinking water

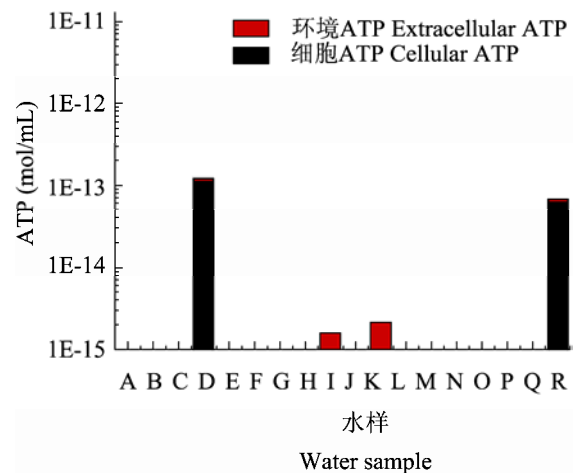


图 6 各瓶装水水样 ATP 含量
Fig. 6 The ATP content in different brands of bottled drinking water

表 1 各品牌瓶装饮用水 ATP 含量
Table 1 The ATP content in different brands of bottled drinking water

水样 Water sample	各水样环境 ATP 比例 The ratio of extracellular ATP in different brands of bottled drinking water	样品总 ATP 含量/总细胞数 Total ATP content of the samples/Total cells (nmol/cell)	细胞 ATP 总量/活细胞数 Total ATP content of the cells/Total live cells (nmol/cell)
A-C	U.D	U.D	U.D
D	6.83%±2.16%	$1.61 \times 10^{-9} \pm 0.37 \times 10^{-9}$	$2.0 \times 10^{-9} \pm 0.51 \times 10^{-9}$
E-J	I=85.3%±17.5% (其余均为 U.D)	U.D	U.D
K	60.7%±13.8%	$4.92 \times 10^{-9} \pm 2.68 \times 10^{-9}$	$6.16 \times 10^{-9} \pm 5.32 \times 10^{-9}$
L-Q	U.D	U.D	U.D
R	5.50%±0.84%	$4.91 \times 10^{-9} \pm 0.21 \times 10^{-9}$	$4.7 \times 10^{-9} \pm 0.22 \times 10^{-9}$

注: 每个值均被表示为平均数±标准差($n=3$); U.D: 低于检出限。

Note: Each value is expressed as mean±standard deviation ($n=3$); U.D: Under detection.

2.4 传统饮用水微生物指标检测

传统方法测得饮用水微生物含量: 按照国家标准^[11]中所指定的方法, 将水样接种于营养琼脂培养基, 有氧条件下 37 °C 培养 48 h, 计算瓶装水中细菌总数, 总大肠菌群以及耐热大肠杆菌。细菌总数测定采用 HPC, 通过计数可以发现在 A、D、K、Q 水样有少量菌落生长, 其中 D 水样中菌落最多, HPC 达到 43 CFU/mL, 其它水样无明显菌落生长, HPC 检测结果并没有真实地反映水中的微生物数量(图 7); 而采用多管发酵法检测大肠菌群时则发现所有瓶装水大肠菌群均显阴性,

即水样中无大肠菌群。各水样细菌总数, 总大肠菌群指标均符合国家标准^[11]。

3 讨论

相比于传统的 HPC, FCM 能更好地反映水中的微生物数量。SYBR Green I 一直被认为是一种理想的微生物荧光染料^[13], 它能穿透细胞膜, 从而与细胞核酸进行特异性结合; 而 PI 可以与那些膜结构不完整的细胞的核酸结合, PI 常被用来研究细胞膜的完整性^[14-15], 膜结构不完整的细胞被认为是死细胞^[16]。因此通过 SYBR Green I/PI 染色, 我们可以迅速检测饮用水中的活性细菌/非活性细菌数量, 其中活性细菌、非活性细菌的核酸先与 SYBR Green I 结合, 而后非活性细菌核酸又被 PI 覆盖^[5], 在 50 mW 蓝光激发下, 活性细菌产生绿色荧光, 非活性细菌产生红色荧光, 在 FlowMax FL1/FL3 二维散点图上可以清楚的将这两种细菌区分开。HPC 看到的只是水中极少数能在营养琼脂培养基上分裂生殖的细菌, 以水样 D 为例, FCM 显示 D 水样中细菌总数达到 1.49×10^5 cells/mL, 而 HPC 却只有 43 CFU/mL, HPC 所得到的结果不及 D 水样真实细菌数的 1%,

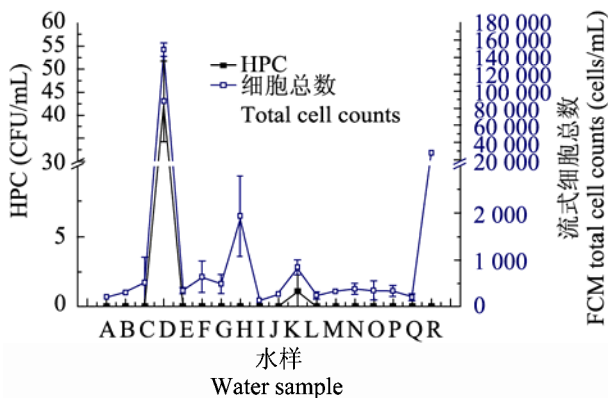


图 7 FCM 测得的细胞总数与 HPC 比较

Fig. 7 Microbial concentration in different brands bottled drinking water determined by FCM and HPC

同时 HPC 也无法向我们提供更多关于饮用水中细菌活性的信息。

同时, 我们还可以通过 FCM 了解水样中的 AOC 含量。在一些地方的饮用水中, AOC 是控制微生物生长的主要因素, 如果给水管网中 AOC 含量过高, 则会引起微生物大量繁殖, 影响出水水质。通常认为饮用水 AOC 生物稳定临界值为 $10 \mu\text{g/L}$, 超过该值微生物将呈几何级数增长^[17]。在饮用水处理过程中, 颗粒活性炭过滤可降低 AOC 含量; 臭氧、氯、氯胺消毒会破坏大分子有机物的结构, 使 AOC 含量增加; 紫外线则对 AOC 没有影响^[18-19]; 因此选用何种消毒剂以及如何控制饮用水消毒剂残余就显得十分重要。在本研究中, 通过测定 30°C 3 d 培养前后的细菌净增长率, 我们可以检测到水样中微量的 AOC。各品牌饮用水中 AOC 含量最多的是 R, R 中细菌在 30°C 培养 3 d 后细菌出现了少量生长, 其微生物增加量为 $(1.30 \pm 0.230) \times 10^4 \text{ cells/mL}$, AOC 浓度为 $1.20 \mu\text{g/L}$, 其它品牌瓶装无气饮用水 AOC 含量均小于 R, 这表明所检测的各品牌瓶装无气饮用水的细菌再生能力都不强, 即使在 30°C 培养 3 d, 各品牌瓶装无气饮用水中的细菌也不会出现爆发性的增长。

尽管目前饮用水微生物检测不包含细菌活性测定这一环节, 但是其重要性还是不容忽视, 通过研究细菌活性, 我们可以更好地了解水中细菌的生物降解, 有机物转化以及细菌毒性积累^[16]。膜完整性、膜电位、酯酶活性、呼吸作用、ATP 含量等都被用来表示细菌活性^[5,10,20-21]。本研究中主要采用 ATP 法来评价瓶装饮用水微生物活性, 但是 ATP 测定法所检测的 ATP 并不全是微生物体内的 ATP, 一些水样在经过臭氧消毒等工艺后, 其细胞中的 ATP 会释放到外界环境中, 影响微生物 ATP 的测定^[7], 本次研究也发现部分水样中的环境 ATP 占水样总 ATP 的很大一部分, 如果不

能排除环境 ATP 的干扰, 就无法正确地反映水样中的微生物含量。如果将所测定的总 ATP 按 $1.75 \times 10^{-10} \text{ mol ATP/cell}$ 换算成细菌细胞数量^[10], 也会较大程度地高估水样中的细菌细胞数, 因为细菌细胞所含的 ATP 与细菌种类以及细菌所处的生理状态密切相关。但是水样细胞总数与总 ATP 含量, 水样活细胞数与细胞内 ATP 含量的良好线性相关性也表明: 相比于 HPC, ATP 检测法能更真实、更方便快捷地反映饮用水中的微生物含量以及微生物活性。

综上所述, 本研究表明相比于传统的饮用水微生物检测法, FCM、ATP 检测法在饮用水微生物检测中显得更加方便快捷和准确高效。采用 FCM、ATP 检测法, 我们可以对饮用水处理的各个环节进行实时监控, 方便生产人员更好地控制各个环节的出水水质, 从而降低安全风险。目前我国饮用水水质检测常规指标包括菌落总数、总大肠菌群以及耐热大肠菌群。使用 FCM、ATP 检测法, 我们可以更加真实地了解饮用水中的菌落总数以及菌落中活性/非活性细菌含量。但是对于总大肠菌群以及耐热大肠菌群的检测方面, 我们还需要进一步探索, 以找到一种更加高效、准确的检测方法。

4 结论

(1) FCM 测定结果表明, HPC 大大地低估了水样中的细菌含量, 通过 FCM 并结合 SYBR Green I/PI 染色, 我们可以快速地分辨水样中的活性细菌/非活性细菌, 并且更准确地了解水样中的实际微生物含量、微生物活性以及 AOC 含量。

(2) AOC 测定表明, 各瓶装无气饮用水中 AOC 含量均不超过 $10 \mu\text{g/L}$, 在 30°C 培养 3 d 各水样中的微生物也不会出现爆发性的增长。

(3) 在检测水样中的微生物时, ATP 检测法要优于传统的 HPC 法, 但是对于不同的水样, 通过

单细胞所含 ATP 来计算水样中活性微生物数量时还是会出现一些偏差。

参 考 文 献

- [1] 世界卫生组织饮用水水质准则[S]. 2006.
- [2] Moreno Y, Piqueres PL, Alonso J, et al. Survival and viability of *Helicobacter pylori* after inoculation into chlorinated drinking water[J]. *Water Research*, 2007, 41(15): 3490–3496.
- [3] Du M, Chen JX, Zhang XH, et al. Retention of virulence in a viable but nonculturable *Escherichia coli* O157: H7: tarda isolate[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(4): 1349–1354.
- [4] Asakura H, Igimi V, Kawamoto K, et al. 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 Microbiology Letters*, 2005, 253(2): 243–249.
- [5] Berney M, Vitala M, Hülshoffa I, et al. Rapid, cultivation-independent assessment of microbial viability in drinking water[J]. *Water Research*, 2008, 42(14): 4010–4018.
- [6] Hammes FA, Egli T. New method for assimilable organic carbon determination using flow-cytometric enumeration and a natural microbial consortium as inoculum[J]. *Environmental Science and Technology*, 2005, 39(9): 3289–3294.
- [7] Hammes F, Berney M, Wang Y Y, 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.
- [8] Vital M, Fuchslin H, Hammes F, et al. Growth of *Vibrio cholerae* O1 Ogawa Eltor in freshwater[J]. *Microbiology-SGM*, 2007, 153(7): 1993–2001.
- [9] Lautenschlager K, Boon N, Wang YY, et al. Overnight stagnation of drinking water in household taps induces microbial growth and changes in community composition[J]. *Water Research*, 2010, 44(17): 4868–4877.
- [10] 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.
- [11] 中华人民共和国卫生部和国家标准化管理委员会生活饮用水标准检验方法微生物指标[S]. 2006.
- [12] Delahaye E, Welté B, Levi Y, et al. An ATP-based method for monitoring the microbiological drinking water quality in a distribution network[J]. *Water Research*, 2003, 37(15): 3689–3696.
- [13] Rinta-Kanto JM, Lehtolaa MJ, Vartiainen T, et al. Rapid enumeration of virus-like particles in drinking water samples using SYBR green I-staining[J]. *Water Research*, 2004, 38(10): 2614–2618.
- [14] Boulos L, Prévost M, Barbeau B, et al. LIVE/DEAD[®] BacLight[™]: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, 37(1): 77–86.
- [15] Hoefel D, Grooby WL, Monis PT, et al. Enumeration of water-borne bacteria using viability assays and flow cytometry: a comparison to culture-based techniques[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 55(3): 585–597.
- [16] Vives-Rego J, Lebaron P, Nebe-von Caron G. Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, 24(4): 429–448.
- [17] van der Kooij. Assimilable organic carbon as an indicator of bacterial regrowth[J]. *American Water Works Association*, 1992, 84(2): 57–65.
- [18] Liu W, Wu H, Wang Z, et al. Investigation of assimilable organic carbon (AOC) and bacterial regrowth in drinking water distribution system[J]. *Water Research*, 2002, 36(4): 891–898.
- [19] Polanska M, Huysman K, van Keer C. Investigation of assimilable organic carbon (AOC) in Flemish drinking water[J]. *Water Research*, 2005, 39(11): 2259–2266.
- [20] Hoefel D, Grooby WL, Monis PT, et al. A comparative study of carboxyfluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester as indicators of bacterial activity[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 52(3): 379–388.
- [21] Créach V, Baudoux AC, Bertru G, et al. Direct estimate of active bacteria: CTC use and limitations[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 52(1): 19–28.