

饮用水中病原微生物检测方法与评价标准

何晓青¹,程 莉^{1,2},朱 轶^{1,2},王东红²,饶凯峰²

(1. 北京林业大学 生物科学与技术学院,北京 100083;2. 中国科学院 生态环境研究中心 环境水质学国家重点实验室,北京 100085)

摘要:不断出现的饮用水中病原微生物对公众健康是一种严重的威胁,随着人类活动的发展、科学技术的进步,饮用水中病原微生物种类和数目不断被发现和认识。对健康危害较大的以及新近出现的水源传播病原微生物进行了综述,并讨论了其适用检测方法及安全评价标准研究进展。

关键词:饮用水;病原微生物;检测;标准

中图分类号:TU991.25;R123.1

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2010)07-0111-03

20 世纪以来,饮用水生物污染问题日益严重,几次大的疾病暴发流行,特别是 2003 年 SARS 在全球的暴发,使公众对影响健康的病原微生物更加关注^[1]。据统计,在不发达国家,有 400 多万儿童死于水传播性疾病,约有 15% 的儿童 5 岁前死于腹泻。在饮用水中不断发现新的对人类造成重大危害的病原微生物,如大肠杆菌 O157:H7、军团菌、隐孢子虫、柯萨奇病毒等,常规饮用水处理技术难以有效地去除。由于环境污染加剧,还会产生一些新的病原微生物,危害人类健康。

1 饮用水中病原微生物类型

1.1 细菌

1.1.1 军团菌(*Legionella*) 军团菌在自然界可长期存活,喜好生存于水源附近。据估计医院中有 3%~6% 的肺炎是由嗜肺军团菌引起的。

1.1.2 病原性大肠杆菌 O157:H7(*Enteropathogenic Escherichia coli*) 1999 年我国部分地区发生了肠出血性大肠杆菌 O157:H7 感染性腹泻的暴发^[2]。2000 年在加拿大安大略省,大肠杆菌 O157:H7 暴发导致 2 300 例感染,6 人死亡^[1]。美国卡布尔暴发的大肠杆菌疾病,使仅有 2 090 人口的地区 243 人患病,4 人死亡^[3]。

1.1.3 鸟分枝杆菌复合群(MAC) 鸟分枝杆菌复合群可感染肺部并会扩散到全身,易于在铜管、塑料管和镀锌管的壁面聚积菌落,形成生物膜。

饮用水中其它常见的细菌包括螺杆菌(*Helicobacter*)、弯曲杆菌(*Campylobacter*)等^[3]。

1.2 病毒

1.2.1 肠道病毒(*Enteroviruses*) 肠道病毒存在于自然水体、经过处理的饮用水、废水和污泥中。在发展中国家每年 1 000 名新生儿中有 4 例会感染上脊髓灰质炎病毒。一岁以下的婴儿由柯萨奇病毒和艾柯病毒引起的中枢神经系统感染,常导致神经后遗症和智力障碍。

1.2.2 肝炎病毒(*Hepatitis viruses*) 戊型肝炎感染通常与被粪便污染的饮用水有关。对于怀孕 3 个月的妇女,其造成的死亡率达 20% 以上。1986~1988 年,曾发生水源污染造成大流行,发病者达 10 多万,是世界最大一次暴发流行。

1.2.3 轮状病毒(*Rotaviruses*)和其它急性肠胃炎病毒 轮状病毒呈世界性分布,A 组轮状病毒是引起 6 个月到 5 岁婴幼儿严重胃肠炎的主要病原体,是导致婴幼儿死亡的主要原因之一。北京地区儿童秋季腹泻发病达高峰,主要由轮状病毒引起。

饮用水中其它常见的急性胃肠炎病毒包括杯状病毒和星状病毒。

1.3 原生动物

1.3.1 贾第虫(*Giardia*) 贾第虫引起多次水传染病(贾第虫病)的暴发,是美国、英国和澳大利亚报道最普遍的肠道寄生虫。兰伯贾第虫(*Giardia lamblia*)在世界各地都有分布。

1.3.2 隐孢子虫(*Cryptosporidium*) 在亚洲、非洲及拉丁美洲,估计每年有 2.5~5.0 亿人次受到隐孢子虫感染^[4]。1993 年小隐孢子虫(*Cryptosporidium parvum*)污染水源引起美国威斯康星州密尔沃市 400 000 人严重腹泻,超过 4 000 人住院治疗,至少造成 50 人死亡,这是美国历史上公认的水传播疾病最大的一次暴发^[1]。我国 1987 年在江苏和安徽发现病例,其后在北京、云南、内蒙古等地陆续有病例报道。

饮用水中其它常见的原生动物包括环孢子虫(*Cyclospora*)和微孢子虫(*Microsporidia*)。

1.4 藻类

目前已发现的蓝藻毒素约 60 余种。我国一

收稿日期:2010-03-30

基金项目:国家水体污染控制与治理科技重大专项资助项目(2009ZX07527-005,2008ZX07314-003);国家“863”资助项目(2008AA062501,2008AA06A414);国家科技支撑资助项目(2006BAD01B06-03,2006BAJ08B02);中国科学院生态环境研究中心环境水质学国家重点实验室开放基金资助项目(2009-001)

第一作者简介:何晓青(1977-),女,湖北省随州市人,博士,副教授,从事水环境中病原微生物的研究及健康风险研究。E-mail: lenahe@bjfu.edu.cn。

些地方的饮用水水源水及出厂水中均有微囊藻毒素检出的报道,研究表明经常饮用含微囊藻毒素的水与肝癌发病率之间存在相关性。

2 饮用水中微生物的检测方法

2.1 细菌的检测

2.1.1 常规培养方法 用培养方法来检测指示菌已有 100 年的历史。主要有膜过滤法、多管发酵/MPN 法和选择性底物试验。

2.1.2 分子生物学方法 近年来许多研究者发表了基于 PCR 技术的检测水中大肠杆菌的实验方法,结合 PCR 技术和基因探针,能特异性地检测大肠杆菌、沙门氏菌和志贺氏菌。测定水环境样品中热激蛋白 hsp70 的 mRNA 可以检测活的肺炎军团菌和霍乱弧菌。Yolanda 等^[5]采用 PCR 和 FISH 技术可快速和灵敏地检测弯曲杆菌。Farnleitner 等^[6]用 DGGE 技术得到异养菌总数(HPC)和大肠杆菌的 16S-rDNA 特异扩增图谱,作为快速分析各种群落的有效方法。

2.2 病毒的检测

2.2.1 样品富集 玻璃丝可以用来从饮用水和 seawater 中收集病毒^[7],美国 EPA 采用 1MDS 过滤器收集病毒^[8],洗脱后进行超滤和絮凝。

2.2.2 培养测定 EPA 制定的检测病毒的标准方法为全培养病毒测定(TCVA),但诺瓦克病毒、轮状病毒和星状病毒等无法用 TCVA 方法检测。

2.2.3 免疫技术 ELISA 方法已用来检测 HAV 和指示活的脊髓灰质炎病毒的存在。商业化的临床 ELISA 试剂盒已用于水样的研究,可以检测轮状病毒和腺病毒。

2.2.4 分子生物学方法 基于 PCR 技术的方法已成功用于检测各类环境样品中的病毒^[10]。一些研究描述了结合细胞培养反转录 PCR(Integrated Cell Culture -PCR, ICC RT-PCR)技术检测肠道病毒的方法^[11],能排除 PCR 抑制物的干扰,且能区分感染性和非感染性的病毒基因片段。Michael 等^[11]和 Vivier 等^[7]分别用此技术检测了呼肠孤病毒和肠道病毒。

基于核酸序列的扩增技术(Nucleic Acid Sequence-based Amplification, NASBA)是 RNA 体外扩增技术的一种,扩增温度始终恒定在 41℃ 左右,不受双链 DNA 的污染, RNA 以 10 的指数形式扩增,从而具有更高的特异性和灵敏度。Jean 等^[12]用多重 NASBA 技术分别扩增 HAV 和人轮状病毒(HRV)的 RNA,可检测样本中 2 pfu(400 pfu·mL⁻¹)的 HAV 和 0.2 pfu(40 pfu·mL⁻¹)的 HRV。使用 NASBA-ELISA 技术可在 6 h 内检测去离子水和污水中的 HRV^[13]。

2.3 原生动物的检测

2.3.1 免疫荧光技术 在 EPA 最新认可的检测原生动物的方法中,采用荧光免疫法(IF)检测小隐孢子虫的卵囊和兰伯贾第虫的胞囊^[14], Slifko 等^[15]建立了基于细胞培养技术并结合 IF 测定的

焦点检测方法(FDM),对检测小隐孢子虫具有特异性。

2.3.2 分子生物学方法 RT-PCR 技术能检测水环境中具有活性的贾第虫胞囊和隐孢子虫卵囊。Wiedenmann 等^[16]详细描述了用 PCR 技术检测小隐孢子虫的方法。一种叫做 Xtra 结合捕获系统的技术已用来在 RT-PCR 之前从水中富集隐孢子虫^[17]。FISH 技术也可作为供选择的方法特异性检测小隐孢子虫。

3 讨论和展望

检测饮用水中微生物污染具有极其重要的意义。因为病原微生物危害极大,能够在同一时间使大量的饮用者染病。但是目前普遍采用的检测方法大多还是基于培养技术,费时费力,灵敏性有限,且不能检测“活的未可培养状态”的微生物。

从发展趋势看,基于分子生物学检测方法是一个主流方向,尽管还不能完全取代常规培养方法,但其显著地提高快速监测微生物的能力,尤其是对难培养的和未被培养的微生物进行检测时。在目前发展的分子生物学技术中,ICC RT-PCR 能检测有侵染能力的病毒,是一个值得关注的重点。NASBA 是一种相当新的方法,具有更高的特异性和灵敏度,可成为环境中病毒的有效诊断工具。DGGE 技术基于 16SrRNA 序列,能区分即使只有一对碱基差异的序列,已成为研究微生物类群强有力的工具。FISH 技术结合了分子生物学的精确性和显微镜的可视性信息,可以在自然生境中监测和鉴定不同的微生物个体。此外,更加高效的采样富集方法和同时测定多种病原微生物的生物芯片技术还有待探索和发展。

在评价指标方面,鉴于水源传播疾病不仅仅 是由肠道细菌引起的,还包括病毒、原生动物和藻类,它们和肠道细菌有着迥然不同的生长特征和营养要求,所以目前广泛使用的大肠杆菌类细菌并不能作为病原病毒、原生动物和藻类的有效指示物,必须使用多种微生物作为监测饮用水微生物安全性的指示生物。

目前 WHO 的《饮用水水质准则》中微生物学指标有大肠杆菌或耐热大肠菌和总大肠菌群 2 项,新的准则正在修订当中。欧盟《饮用水水质指令》微生物方面指标为大肠杆菌和肠道球菌,并制定了瓶装或桶装饮用水微生物指标。美国环保局《饮用水水质标准》对微生物的人体健康风险给予高度重视,2004 修订的《饮用水水质标准》中微生物学标准共有 8 项,包括隐孢子虫、贾第虫、军团菌、分枝杆菌、病毒等,其中分枝杆菌是新增指标^[18]。澳大利亚、加拿大、俄罗斯、日本等国则同时参照三大标准来制定本国的饮用水标准。在美国已经建立了“信息收集规则”(ICR),评价超过 10 万人口的城市用水中病原体的威胁,这项工作会为进一步确定检测对象和评价指标提供依据。类似的工作也会在其他发达国家开展。

我国最新的《生活饮用水卫生标准》(GB 5749-2006)中,微生物学指标由 2 项增至 6 项,增加了对贾第鞭毛虫、隐孢子虫等易引起肠道疾病且一般消毒方法很难全部杀死的微生物的检测,但还不包括病毒指标。常规检验项目增加了耐热大肠菌群 1 项,总大肠菌群和细菌总数指标进行了更严格的规定。总大肠菌群以前的标准是 1 L 水不得超过 3 个,现在为 100 mL 水样中不得检出。细菌总数限值有所提高,从 $\leq 100 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 规范为 $\leq 80 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。非常规检测项目中增加了粪型链球菌群、蓝氏贾第鞭毛虫、隐孢子虫 3 项。

新标准正式实施后,北京、上海等大中城市的居民可饮用的水将更干净、更安全。但是,一些偏远地区尤其是农村,因为仪器设备缺乏、科技人员不足等问题,近期还不能体会到新标准带来的好处。总体来讲,我国对饮用水中病原微生物的检测技术比较单一、落后,同时缺少对水源传播疾病系统调查数据,尤其缺乏用户端(水笼头)生物污染的健康风险评价数据。因此目前我国对饮用水的微生物安全性还很难进行客观的表述。随着生活品质和对健康要求的提高,迫切需要提高饮用水中病原微生物的检测和评价能力。

参考文献:

- [1] WANG Zi-jian, HE Xiao-qing, XIE Xiang-ming. Molecular technologies for monitoring pathogens in drinking water [J]. J Ecotech Res, 2004, 10(3): 113-118.
- [2] 王晓昌. 隐孢子虫-水系传染疾病寄生虫 [J]. 中国给水排水, 1996, 12(4): 43-44.
- [3] 严敏, 陈红英. 病原微生物和水处理 [J]. 浙江工业大学学报, 2004, 32(3): 338-342.
- [4] 范晓军, 陈佩堂, 陈成章, 等. 澳门地区原水及海水中的病原虫调查 [J]. 中国给水排水, 2001, 17(11): 32-34.
- [5] Yolanda M, Salut B, Jose' L A, et al. Specific Detection of Arcobacter and Campylobacter Strains in Water and Sewage by PCR and Fluorescent In Situ Hybridization [J]. Appl. Environ. Microbiol, 2003, 69(2): 1181-1186.
- [6] Farnleitner A H, Reischer G, Zibuschka F, et al. Comparison and differentiation of heterotrophic plate count communities in raw and drinking water using eubacterial 16S-rD-

- NA amplicon profiling [J]. Vom Wasser, 2001, 97: 167-180.
- [7] Vivier J C, Ehlers M M, Grabow W O K. Detection of enteroviruses in treated drinking water [J]. Water Res, 2004, 38: 2699-2705.
- [8] EPA. Manual of Methods for Virology [M]. Washington: EPA publication, 2001.
- [9] Perdek J M. Managing Urban Watershed Pathogen Contamination [M]. Washington: EPA publication, 2003.
- [10] Grabow W O K, Taylor M B, de Villiers J C. New methods for the detection of viruses call for review of drinking water quality guidelines [J]. Water Sci Technol, 2001, 43(12): 1-8.
- [11] Michael L S, George D Di Giovanni. Detection and Identification of Mammalian Reoviruses in Surface Water by Combined Cell Culture and Reverse Transcription-PCR [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67: 3016-3020.
- [12] Jean J, Blais B, Darveau A, et al. Simultaneous detection and identification of hepatitis A virus and rotavirus by multiplex nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) and microtiter plate hybridization system [J]. J Virol Method, 2002, 105: 123-132.
- [13] Jean J, Blais B, Darveau A, et al. Rapid detection of human rotavirus using colorimetric nucleic acid sequence-based immunosorbent assay in amplification (NASBA) 2enzyme 2linked sewage treatment effluent [J]. FEMS Microbiol Lett, 2002, 210: 143-147.
- [14] EPA. Method 1623: Cryptosporidium and Giardia in water by Filtration /MS/FA [M]. Washington, EPA publication, 2001.
- [15] Slifko T R, Friedman D, Rose J B, et al. An In Vitro Method for Detecting Infectious Cryptosporidium Oocysts Cell Culture. Appl [J]. Environ Microbiol, 1997, 63(9): 3669-3675.
- [16] Wiedenmann A, Kruger P, Botzenhart K. PCR Detection of Cryptosporidium parvum in environmental samples-a review of published protocols and current developments [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 1998, 21: 150-166.
- [17] Hallier-Soulier S, Guillot E. An Immunomagnetic Separation Polymerase Chain Reaction Assay for Rapid and Ultra Sensitive Detection of Cryptosporidium parvum in Drinking Water [J]. FEMS Microbiol Lett, 1999, 176(2): 285.
- [18] EPA. Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories [M]. Washington, EPA publication, 2004.

Progress in Monitoring Approaches and Criteria for the Waterborne Pathogens in Drinking Water

HE Xiao-qing¹, CHENG Li^{1,2}, ZHU Yi², WANG Dong-hong², RAO Kai-feng²

(1. Biological Sciences and Technology College of Beijing Forestry University, Beijing 100083; 2. State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085)

Abstract: The rapid emergence of pathogens has created a threat to the drinking water industry. Consequently, the microbiological quality of drinking water is of a major concern to consumers, water suppliers, regulators and public health authorities. As a result, monitoring for waterborne pathogens is needed and methods based on appropriate molecular technologies attract dramatically the attention. This review attempts to summarize the most recent progress and offers a comprehensive view of the emerging detecting technologies and criteria for pathogens in water supply system.

Key words: drinking water; pathogens; monitoring