

DOI:10.19853/j.zgjsps.1000-4602.2023.13.011

# 紫外/氯消毒技术对金黄色葡萄球菌的灭活作用

王莉萍<sup>1</sup>, 叶成松<sup>2</sup>, 于鑫<sup>2</sup>, 方晶云<sup>1</sup>

(1. 中山大学 环境科学与工程学院, 广东 广州 510275; 2. 厦门大学 环境与生态学院, 福建 厦门 361102)

**摘要:** 从可培养细菌数、细胞膜完整性和消毒过程中细胞内外DNA数量变化等方面综合探究了紫外/氯消毒技术对金黄色葡萄球菌的灭活效果及机制。结果表明,当氯投加量为1 mg/L、紫外剂量为120 mJ/cm<sup>2</sup>时,紫外/氯消毒技术可灭活所有可培养的金黄色葡萄球菌(7.28-lg CFU/mL),而单独氯化和单独紫外分别灭活了5.10-lg和6.38-lg CFU/mL的金黄色葡萄球菌。自由基淬灭实验表明,紫外/氯消毒技术对金黄色葡萄球菌的灭活增强效果主要是紫外和氯的作用,自由基作用可忽略。流式细胞仪(FCM)和扫描电子显微镜(SEM)检测结果均证实氯化和紫外/氯消毒技术通过破坏细胞壁和细胞膜使得细菌失活。此外,紫外/氯消毒技术可有效去除细胞内DNA(iDNA)和游离质粒,并且自由基对质粒DNA表现出明显的去除效果,同时未引起溶液中细胞外DNA(eDNA)的数量增大。综上,紫外/氯消毒技术可以促进金黄色葡萄球菌的灭活,并同时控制细胞内外基因,这为紫外/氯消毒技术控制水体中的革兰氏阳性菌提供了参考。

**关键词:** 紫外/氯消毒; 自由基; 金黄色葡萄球菌; 胞内DNA; 胞外DNA

**中图分类号:** TU991 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4602(2023)13-0071-05

## UV/Chlorine Disinfection for Inactivation of *Staphylococcus aureus*

WANG Li-ping<sup>1</sup>, YE Cheng-song<sup>2</sup>, YU Xin<sup>2</sup>, FANG Jing-yun<sup>1</sup>

(1. School of Environmental Science and Engineering, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China; 2. College of the Environment & Ecology, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

**Abstract:** This paper investigated the performance and mechanism of UV/chlorine process for inactivation of *Staphylococcus aureus* from the aspects of culturable bacteria number, cell membrane integrity and changes in intracellular and extracellular DNA (iDNA/eDNA) numbers during disinfection. When the dosages of chlorine and UV were 1 mg/L and 120 mJ/cm<sup>2</sup>, the UV/chlorine process could inactivate all culturable *Staphylococcus aureus* (7.28-lg CFU/mL), while chlorination alone and UV alone inactivated 5.10-lg CFU/mL and 6.38-lg CFU/mL of *Staphylococcus aureus*, respectively. The free radical scavenging test showed that the enhanced inactivation of *Staphylococcus aureus* by the UV/chlorine process was mainly due to the roles of UV and chlorine, and the effects of free radicals could be ignored. The results of flow cytometry (FCM) and scanning electron microscopy (SEM) confirmed that chlorination and UV/chlorine caused bacterial inactivation through the destruction of cell wall and membrane. In

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21922612、22176228)

通信作者: 方晶云 E-mail: fangjy3@mail.sysu.edu.cn

addition, UV/chlorine process could effectively remove iDNA and free plasmid, and free radicals showed an obvious plasmid DNA removal ability, while the concentration of eDNA in solution did not increase. In conclusion, the UV/chlorine process promoted the inactivation of *Staphylococcus aureus* and controlled both intracellular and extracellular genes, which provided a theoretical basis for UV/chlorine disinfection process to control the growth of gram-positive bacteria in water.

**Key words:** UV/chlorine disinfection; free radical; *Staphylococcus aureus*; intracellular DNA; extracellular DNA

消毒是水处理过程的重要环节,可抑制病原微生物的繁殖和传播,特别是在新冠肺炎流行期间,对水体进行消毒可有效预防介水传染病。目前,氯化消毒和紫外消毒在国内外水厂得到了广泛应用,但也存在诸多局限。例如,单独氯化无法高效灭活不动杆菌属和假单胞菌等耐氯细菌<sup>[1]</sup>,且会诱导细菌(如大肠杆菌和铜绿假单胞菌)进入活的但不可培养(VBNC)状态<sup>[2]</sup>。此外,氯消毒也会导致细胞内基因泄漏,增加胞外基因水平转移风险<sup>[3]</sup>。单独紫外消毒也会诱导VBNC状态的细菌<sup>[4]</sup>,且存在微生物复活风险。因此,实际水处理过程中,需要采用更安全的消毒技术以彻底灭活病原微生物。

近些年,紫外/氯消毒技术已被证明能产生强氧化性的自由基,如羟基自由基( $\cdot\text{OH}$ )、氯自由基( $\text{Cl}\cdot$ )、氯氧自由基( $\text{ClO}\cdot$ )和二氯阴离子自由基( $\text{Cl}_2^{\cdot-}$ )。该技术可以显著促进铜绿假单胞菌、青霉菌和噬菌体MS2等微生物的灭活<sup>[2,5]</sup>,具有强化去除病原微生物的潜力。然而,现阶段对于紫外/氯消毒的研究主要集中在抗性细菌(ARB)、抗性基因(ARG)、革兰氏阴性菌<sup>[2]</sup>、真菌孢子和噬菌体<sup>[5]</sup>等,尚缺乏对紫外/氯消毒技术灭活革兰氏阳性菌的研究。

金黄色葡萄球菌是典型的革兰氏阳性致病菌,具有较高的环境耐受能力。即使在饮用水系统中,也会检出携带 *mecA* 基因的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌<sup>[6]</sup>。因此,不同水体中广泛存在的金黄色葡萄球菌给水质安全和人体健康造成了严重威胁。

笔者选取金黄色葡萄球菌作为目标生物,从可培养细菌数、活细菌数、细胞膜损伤程度和消毒过程中细胞内外DNA数量变化等方面综合评估紫外/氯消毒技术对革兰氏阳性菌的灭活效果和机制,旨在为水体中革兰氏阳性菌的控制提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验试剂

所用到的生化试剂包括:次氯酸(99%)、硫代硫酸钠( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ )、10×PBS、叔丁醇(TBA, 99%)、LB肉汤、NA固体培养基。金黄色葡萄球菌从污水中分离获得。

### 1.2 消毒装置与步骤

消毒实验装置采用紫外平行光反应装置<sup>[2]</sup>,紫外光辐照强度为  $0.2 \text{ mW}/\text{cm}^2$ ,初始氯投加量为  $1 \text{ mg}/\text{L}$ ,细菌初始数目为  $(1\sim2)\times 10^7 \text{ CFU}/\text{mL}$ 。具体实验步骤:将配好的反应体系盖上遮光板,放入已提前预热 30 min 的紫外灯下,打开磁力搅拌器使溶液混合均匀。撤掉遮光板并同时加氯,立刻计时,在特定时间点取样,水中余氯采用  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  进行淬灭。对于单独紫外组,直接撤掉遮光板计时;对于单独氯化组,无需打开紫外灯直接加氯计时。自由基淬灭实验需加入  $50 \text{ mmol}/\text{L}$  的 TBA,其余步骤不变。

### 1.3 分析方法

#### 1.3.1 细胞膜通透性检测

采用死/活菌染色试剂盒检测消毒过程中的活细菌数。SYTO 9 和 PI 分别加入到  $200 \mu\text{L}$  的样品中,保证其最终浓度分别为 2 和  $20 \mu\text{mol}/\text{L}$ ,并保证染色样品中的细菌数目为  $10^5 \text{ cell}/\text{mL}$ 。染色后黑暗静置 20 min,采用流式细胞仪收集细胞。

#### 1.3.2 细胞形貌检测

对样品进行离心富集( $5\,000 \text{ r}/\text{min}$ , 15 min),随后加入 2.5% 戊二醛并于  $4^\circ\text{C}$  冰箱中固定 12 h。采用 1×PBS 清洗样品 2 次,依次用 30%、50%、70%、90%、100% 的乙醇对样品进行梯度脱水( $4^\circ\text{C}$ , 10 min)。脱水样品采用临界蒸发器进行 24 h 干燥。干燥样品粘在导电胶上进行喷金,采用扫描电子显微镜(SEM)观察消毒前后细胞形貌的变化。

### 1.3.3 细胞内外DNA检测

采用0.22  $\mu\text{m}$  无菌聚醚砜滤膜对10 mL样品进行抽滤,随后用DNA快速提取试剂盒提取截留在膜上的完整细胞DNA作为细胞内DNA(iDNA)。滤液经冷冻干燥后,采用DNA纯化试剂盒提纯获得细胞外DNA(eDNA)。通过实时荧光定量PCR(qPCR)特异性扩增 *nuc* 基因来检测 iDNA 和 eDNA 数量的变化,并通过凝胶电泳实验加以佐证。短扩增片段引物为 128F (5'-GCATCACAAACAGATAATGGCGT-3') 和 128R (5'-ACCGTATCACCATCAATCGCT-3'); 长扩增片段的引物为 482F (5'-GAAAGGGCAATACGCAAAGA-3') 和 482R (5'-TAGCCAAGCCTTGACGAAGT-3')。PCR反应条件:50  $^{\circ}\text{C}$ , 2 min $\rightarrow$ 95  $^{\circ}\text{C}$ , 5 min(预变性);进入循环扩增阶段,程序为95  $^{\circ}\text{C}$ 、15 s, 60  $^{\circ}\text{C}$ 、45 s, 循环45次,采用仪器自动设置的溶解曲线程序检验扩增产物的特异性。

## 2 结果与讨论

### 2.1 紫外/氯体系对金黄色葡萄球菌的灭活效果

图1为紫外、氯化和紫外/氯体系对金黄色葡萄球菌的灭活效果。可见,紫外/氯消毒技术仅在10 min内(紫外剂量为120  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ )就灭活了所有的可培养细菌(7.28-lg CFU/mL),而单独紫外和单独氯化处理10 min后使金黄色葡萄球菌的可培养细菌数目分别减少了6.38-lg和5.10-lg CFU/mL,这表明紫外/氯消毒技术可增强对金黄色葡萄球菌的灭活效果。采用TBA作为自由基淬灭剂,紫外/氯体系对金黄色葡萄球菌的灭活未受到明显抑制,表明被淬灭的自由基(如 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{Cl}\cdot$ 和 $\text{ClO}\cdot$ )对金黄色葡萄球菌的灭活贡献较小。

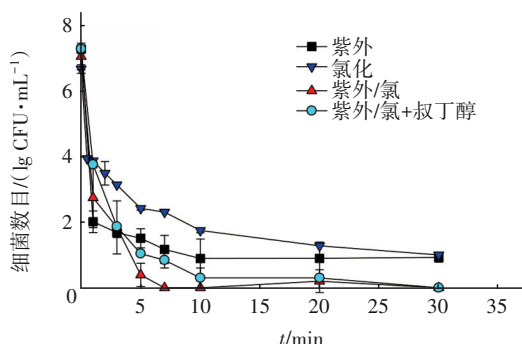


图1 紫外、氯化和紫外/氯体系对金黄色葡萄球菌的灭活效果

Fig.1 Inactivation of *S. aureus* by UV, chlorine and UV/chlorine processes

### 2.2 紫外/氯体系对细胞膜通透性的影响

采用流式细胞仪测定了紫外、氯化和紫外/氯消毒过程中金黄色葡萄球菌细胞膜通透性的变化(见图2)。结果表明,对比未处理组,单独紫外消毒未引起细胞膜的通透性发生明显变化,完整细胞数基本维持在5.30-lg~5.65-lg cell/mL,可见紫外消毒不会破坏细菌的细胞膜。

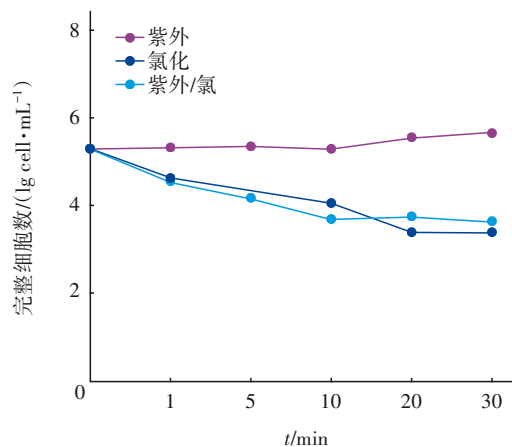


图2 紫外、氯化和紫外/氯体系处理过程中完整细胞数的变化

Fig.2 Change of intact *S. aureus* cells numbers during UV, chlorine and UV/chlorine processes

采用氯化和紫外/氯技术处理10 min后,完整细胞数从5.30-lg cell/mL分别减少到3.37-lg和3.64-lg cell/mL,表明氯化和紫外/氯消毒技术都是通过破坏细胞膜引起金黄色葡萄球菌失活。相比单独氯化,紫外/氯消毒技术并没有促进完整细胞数减少,进一步证实了紫外/氯消毒技术中产生的自由基对金黄色葡萄球菌的失活没有贡献,主要是紫外和氯的作用。这之前报道的铜绿假单胞菌结果不一致<sup>[2]</sup>,可能是因为目标生物结构上的差异性导致的。金黄色葡萄球菌细胞壁较厚,含有较多的肽聚糖和多糖,对外界不利条件抵抗能力强,也会消耗更多的 $\text{HOCl}$ 、 $\text{OCl}\cdot$ 和自由基。

### 2.3 紫外/氯体系对细胞形貌的改变

为进一步探究消毒机理,采用SEM对氯化消毒和紫外/氯消毒过程中金黄色葡萄球菌的形态进行表征,结果如图3所示。可知,未经处理的金黄色葡萄球菌表面光滑,形貌完整且饱满,单独紫外可以穿透细胞且不会造成细胞膜损伤,然而经过单独氯化和紫外/氯处理后的金黄色葡萄球菌表面均出现了破损。不同的是,单独氯攻击后的细胞表面出现了明显的裂缝,而紫外/氯联合技术处理后的细胞有



明显凹陷。SEM结果进一步证实了单独氯化和紫外/氯联合技术可通过破坏金黄色葡萄球菌的细胞膜使其失活。

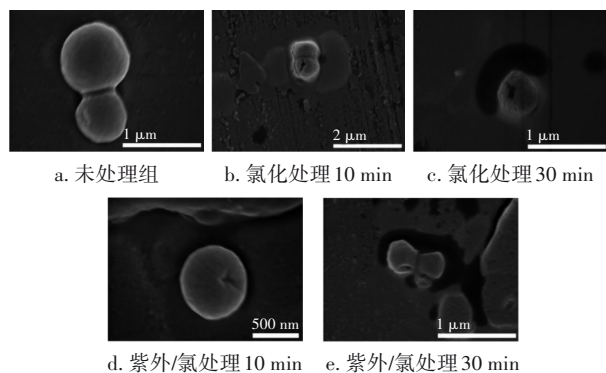
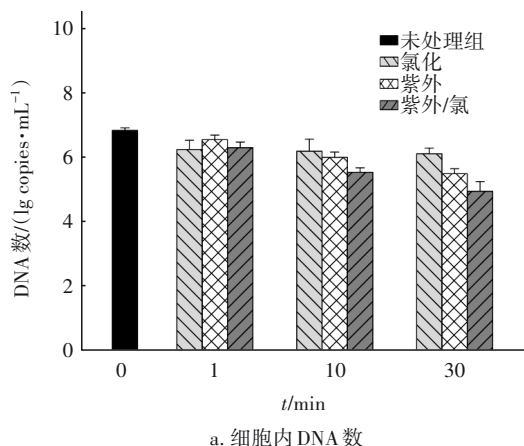


图3 氯化及紫外/氯处理前后金黄色葡萄球菌SEM图像  
Fig.3 SEM images of *S. aureus* before and after chlorine and UV/chlorine processes

#### 2.4 紫外/氯体系对iDNA及游离质粒的去除效果

采用qPCR技术分别研究了紫外/氯体系对iDNA和游离质粒的去除效果,结果如图4所示。由图4(a)可知,对于iDNA,单独氯化无明显去除效果,30 min内iDNA仅去除了0.73-lg copies/mL。相比之下,单独紫外和紫外/氯体系可有效去除iDNA,30 min内分别去除了1.34-lg和1.89-lg copies/mL。紫外/氯体系对iDNA的去除效果(去除量为1.89-lg copies/mL)接近单独紫外和单独氯对iDNA的总去除效果(去除量为2.07-lg copies/mL),表明自由基对iDNA的去除贡献可忽略。这与之前报道的紫外/氯消毒技术产生的自由基可以有效去除铜绿假单胞菌的iDNA结果不一致,主要是由于两种细菌的结构有差异,金黄色葡萄球菌在消毒过程中会消耗更多的自由基,导致其在接触iDNA之前已经被消耗掉。



a. 细胞内DNA数

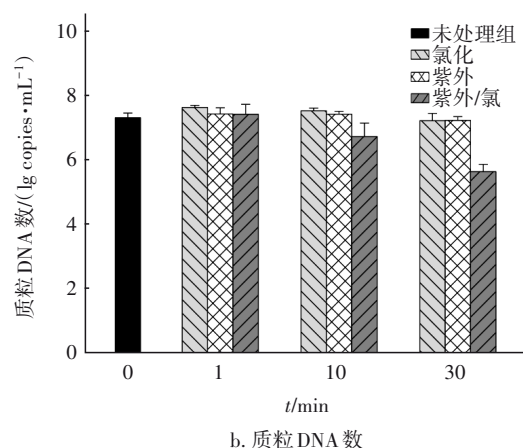


图4 氯化、紫外和紫外/氯体系对胞内DNA和游离质粒的去除效果  
b. 质粒DNA数

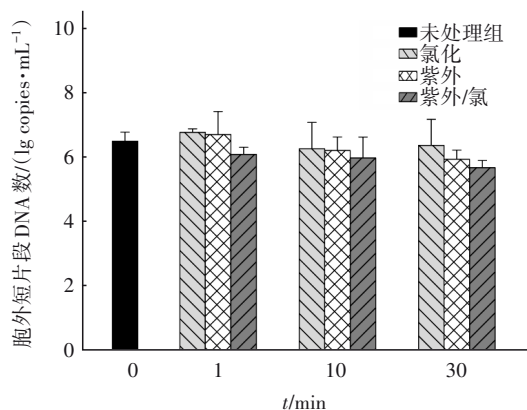
Fig.4 Removal effect of iDNA and free plasmid by chlorine, UV and UV/chlorine processes

为明确细菌结构是否会影响自由基对iDNA的去除效果,探究了紫外、氯化和紫外/氯体系对游离质粒的去除,结果见图4(b)。单独采用紫外和氯化处理30 min后,质粒数分别减少了0.08-lg和0.09-lg copies/mL,然而紫外/氯处理30 min可去除1.68-lg copies/mL,表明紫外/氯体系产生的自由基能去除*nuc*基因,证实细菌结构对自由基的消耗会影响iDNA的去除效果。此外,单独紫外对环状质粒DNA的去除效果弱于iDNA,这可能与目标基因的结构有关,有文献报道,UVA和UVB光照不会引起环状质粒DNA损伤<sup>[7]</sup>。因此,单独紫外对质粒DNA的降解效果不佳可能与其环状结构相关。对比紫外/氯消毒技术对iDNA和游离质粒的去除效果发现,质粒DNA的去除效果略逊色于iDNA,这可能与目标DNA结构有关,具体原因需进一步研究。

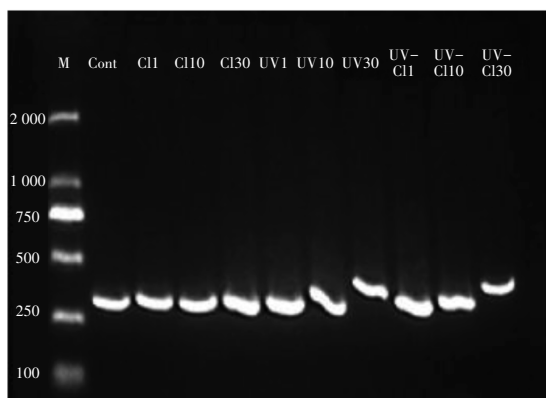
#### 2.5 紫外/氯消毒过程中eDNA浓度的变化

考虑到消毒过程中因细胞膜破损引起的核酸泄漏可能会导致细菌间水平基因转移风险增大<sup>[4]</sup>,因此采用qPCR和凝胶电泳技术分析了释放在细胞外的*nuc*短片段(128 bp)和*nuc*长片段(482 bp)浓度的变化。意外的是,未处理组的eDNA数高达6.48-lg copies/mL,如图5(a)所示,这可能与金黄色葡萄球菌可通过膜泡释放DNA有关<sup>[8]</sup>。经氯化处理30 min后,eDNA数基本维持在(6.5±0.3)-lg copies/mL;经单独紫外和紫外/氯处理30 min后,eDNA数分别降低了0.53-lg和0.80-lg copies/mL,表明紫外和紫外/氯过程不会引起eDNA数增大。此外,相比

单独的紫外和氯化,紫外/氯体系能促进eDNA去除,但去除效果有限。PCR结果证实了这一点,见图5(b)。经过3种技术处理后,均出现了明亮的电泳条带,表明紫外/氯消毒技术对胞外长片段nuc基因去除效果一般。



a. 胞外短片段DNA数



b. 胞外长片段DNA浓度

图5 氯化、紫外和紫外/氯处理后长片段eDNA释放情况  
Fig.5 Release of long and short eDNA after chlorine, UV and UV/chlorine processes

### 3 结论

紫外/氯消毒技术通过单独紫外和单独氯的叠加作用强化破坏金黄色葡萄球菌的细胞膜和细胞壁,从而促进其灭活。紫外/氯消毒技术通过单独紫外和单独氯的叠加作用强化去除eDNA,然而对于游离质粒的去除,紫外/氯消毒技术中产生的自由基占主要作用。紫外/氯消毒后不会引起eDNA浓度增大,但对细胞外nuc基因去除效果一般。

### 参考文献:

[1] WANG Y H, WU Y H, TONG X, et al. Chlorine

disinfection significantly aggravated the biofouling of reverse osmosis membrane used for municipal wastewater reclamation [J]. Water Research, 2019, 154: 246–257.

- [2] WANG L P, YE C S, GUO L Z, et al. Assessment of the UV/chlorine process in the disinfection of *Pseudomonas aeruginosa*: efficiency and mechanism [J]. Environmental Science and Technology, 2021, 55 (13): 9221–9230.
- [3] JIN M, LIU L, WANG D N, et al. Chlorine disinfection promotes the exchange of antibiotic resistance genes across bacterial genera by natural transformation [J]. The ISME Journal, 2020, 14(7): 1847–1856.
- [4] ZHANG S H, YE C S, LIN H R, et al. UV disinfection induces a VBNC state in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Environmental Science and Technology, 2015, 49(3): 1721–1728.
- [5] RATTANAKUL S, OGUMA K. Analysis of hydroxyl radicals and inactivation mechanisms of bacteriophage MS2 in response to a simultaneous application of UV and chlorine [J]. Environmental Science & Technology, 2017, 51(1): 455–462.
- [6] SANTOS G A C, DROPA M, ROCHA S M, et al. *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in drinking water fountains in urban parks [J]. Journal of Water and Health, 2020, 18(5): 654–664.
- [7] KIM S, GHAFOR K, LEE J, et al. Bacterial inactivation in water, DNA strand breaking, and membrane damage induced by ultraviolet-assisted titanium dioxide photocatalysis [J]. Water Research, 2013, 47(13): 4403–4411.
- [8] BITTO N J, CHENG L, JOHNSTON E L, et al. *Staphylococcus aureus* membrane vesicles contain immunostimulatory DNA, RNA and peptidoglycan that activate innate immune receptors and induce autophagy [J]. Journal of Extracellular Vesicles, 2021, 10(6): e12080.

作者简介:王莉萍(1995–),女,陕西宝鸡人,博士研究生,主要研究方向为消毒技术。

E-mail: 1239859739@qq.com

收稿日期:2021-11-24

修回日期:2022-01-12

(编辑:任莹莹)