

DOI:10.19853/j.zgjsps.1000-4602.2020.22.015

流式细胞术在饮用水微生物检测中的应用及挑战

严心涛¹, 吴云良¹, 查巧珍², 刘 珏², 王 策¹

(1. 中国科学院 苏州生物医学工程技术研究所, 江苏 苏州 215163; 2. 苏州高新区自来水有限公司, 江苏 苏州 215011)

摘 要: 流式细胞术(flow cytometry, FCM)是一种可实现液相中悬浮单细胞或微粒的高通量多参数检测的交叉学科技术,特别适合对 0.2 ~ 20 μm 粒径大小的微生物检测。但在 FCM 开发前期,因受限于特异性结合的荧光染料和仪器灵敏度,FCM 在微生物快速检测中并未得到广泛应用。近些年,随着光电探测技术的飞速发展,以及新型荧光染料的开发,FCM 在饮用水安全保障领域得到了快速发展和广泛应用。目前 FCM 能够快速定量检测饮用水中的总细菌浓度(total cell concentration, TCC),识别细菌活性,区分不同核酸含量的菌群和不同粒径大小的菌群等。论述了 FCM 对饮用水微生物检测的基本原理及绝对计数方法,介绍了已用于流式分析水体细菌的荧光染料和数据分析方法,综述了其应用方向。最后阐述了 FCM 在饮用水微生物学应用领域面临的问题,并对其未来发展方向进行了展望。

关键词: 流式细胞术; 饮用水; 微生物; 细菌; 自来水

中图分类号: TU991 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000 - 4602(2020)22 - 0089 - 07

Applications and Challenges of Microbial Detection in Drinking Water by Flow Cytometry

YAN Xin-tao¹, WU Yun-liang¹, ZHA Qiao-zhen², LIU Jue², WANG Ce¹

(1. Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215163, China; 2. Suzhou New District Water Supply Development Co. Ltd., Suzhou 215011, China)

Abstract: Flow cytometry (FCM) is an interdisciplinary technology that enables high-throughput and multi-parameter detection of suspended single cells or particles in the liquid phase. It's particularly suitable for the detection of microorganisms with a particle size of 0.2 to 20 μm . However, in the early stage of the FCM development, the FCM had not been widely used in the rapid detection of microorganisms due to the limitations of specific binding of fluorescent dyes and instrument sensitivity. In recent years, with the development of photoelectric detection technology and new fluorescent dyes, FCM has been rapidly developed and widely used in the field of drinking water safety and security. At present, FCM can quickly and quantitatively detect the total cell concentration (TCC) to identify bacterial activity, distinguish bacteria with different nucleic acid content and size in drinking water. This review briefly discussed the basic principles, absolute counting methods, fluorescent dyes and data analysis of FCM, focusing on its recent applications in aquatic microbiology. Finally, the problems faced by FCM in

基金项目: 苏州市科技局民生科技计划资助项目(SS201726); 中国科学院战略性先导科技专项(A类)资助项目(XDA22020404); 国家高技术研究发展计划(863)项目(2011AA02A106)

the field of drinking water microbiology application are described, and the prospects for its future development are discussed.

Key words: flow cytometry; drinking water; microorganism; bacteria; tap water

目前,国内外水质检测中心和科研院所对饮用水微生物的检测方法主要采用平板计数法(HPC),它是在特定培养环境、特定半固体营养物的培养基上对异养细菌进行培养和计数分析,根据国家标准《生活饮用水标准检测方法 微生物指标》(GB/T 5750.12—2006),其主要包括多管发酵法、滤膜法以及酶底物法等。但HPC存在一些缺点:其需要1~5 d才能得出微生物含量结果,不能快速反映饮用水中微生物状况;只有适应培养基和培养环境的菌种才能形成菌落,所检测到的微生物种属十分有限,现有的研究表明,HPC只能检测饮用水中不到1%的微生物;当培养条件(如温度或营养组分)变化时,部分细菌会进入“活的不可培养”的状态,但在适宜条件下,这些“活的不可培养”的细菌又会恢复活性;此外,一个菌落通常由许多聚集在一起的细菌培养而成,检测的细菌含量结果一致性较差。

近些年,涌现了许多非培养基下的微生物检测方法,如基于分子生物学技术的变形梯度凝胶电泳法(DGGE)、PCR-DGGE法、焦磷酸测序法、荧光定量PCR技术等;基于微生物生化性质的腺苷三磷酸(ATP)化学发光法、可同化有机碳(AOC)检测法等;以及基于免疫学的酶联免疫分析法(ELISA)、荧光原位杂交技术(FISH)、流式细胞术(FCM)等。这些检测方法的应用结果均表明,饮用水中微生物群落比HPC测试结果多得多。目前有相关研究表明,饮用水中微生物由9 000多个不同群落组成,细菌含量在1 000~500 000 cells/mL^[1]。在各种非培养基下的微生物检测方法中,因FCM更具有优异的高通量和高灵敏度特点,使其广泛应用于饮用水微生物的快速定量检测。

FCM是一种测量液相中悬浮单细胞或微粒的物理和化学性质的现代分析技术,其综合了激光技术、计算机技术、流体力学、微弱信号处理技术、细胞化学和生物探针技术等众多领域先进技术,能对粒径在0.2~100 μm细胞的生物物理和生物化学,如大小、内部结构、DNA、RNA、蛋白质、抗原等进行快速测量并分类收集,被业内公认为生物实验室“CT”^[2]。自20世纪60年代被开发以来,FCM主要

应用于医学领域的哺乳动物细胞的体外诊断,并建立了行业标准《流式细胞仪》(YY/T 0588—2017)。早期因受限于特异性结合的荧光染料和仪器灵敏度,FCM在微生物快速检测中未得到广泛应用。随着光电探测技术的发展和新型荧光染料的开发,近10年FCM在微生物分析领域得到快速发展和广泛应用。在国内,FCM的开发和应用起步比较晚,其在饮用水微生物快速检测应用上也鲜有报道。因此,概述FCM对饮用水微生物定量检测原理,并介绍常用于水体细菌的荧光染料,重点综述FCM在饮用水微生物快速检测中的典型应用和待解决的关键问题,以期为研究人员利用FCM对饮用水微生物检测提供研究方向。

1 FCM对饮用水微生物检测的原理及计数

1.1 FCM对饮用水微生物检测的原理

FCM对饮用水微生物检测的原理如图1所示,其主要由4部分组成:液流聚焦系统、光源与光学系统、信号收集与处理系统以及上位机分析系统。

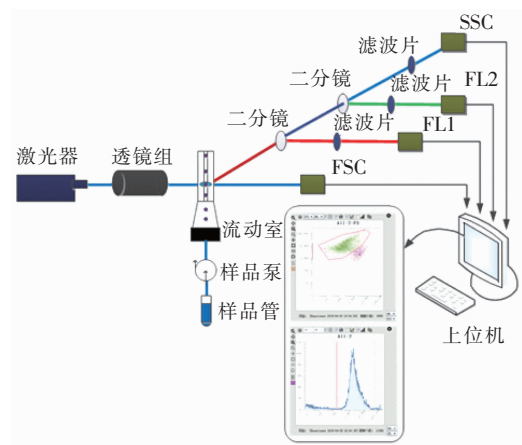


图1 FCM对饮用水微生物检测原理

Fig. 1 Principle of FCM on drinking water microorganism detection

由于FCM主要对悬浮单细胞或其他微粒进行检测,为了保证结果的可靠性,需使用不含任何细胞或微粒的鞘液。饮用水中微生物以单细胞悬液进入流动室,并被鞘液包裹,通过流体动力学聚焦作用,该样品流将高速流过检测区域。检测区域以激光作为激发光源,激光通过聚焦整形后,将聚焦光束

垂直照射在聚焦的样品流上,经激光激发后,样品流中的单细胞或微粒将产生一定强度的荧光信号和散射光信号。其中,前向散射光信号(FSC)和侧向散射光信号(SSC)分别由激光的正前方和90°方向的探测器接收;荧光信号(FL1, FL2)则需要通过二分光镜将不同波长的荧光分离后再由光电探测器接收。FSC信号反映了微生物细胞的体积大小;SSC信号反映了微生物细胞内所含颗粒的复杂程度;荧光信号反映了所标记的被测微生物细胞内部颗粒信息。根据米氏散射原理,由FSC和SSC散射光强度即可区分典型微生物(如大肠杆菌、曲霉、微球菌、棒状杆菌等),但对微生物活性的评定还需根据荧光信号强度来分析。这些荧光信号经光电探测器(如光电倍增管或雪崩二极管)转化为电信号后,再经A/D转换器和信号处理系统后上传到上位机,最后在上位机分析系统中以各信号通道的散点图或柱状图等形式进行数据分析。

1.2 FCM对饮用水微生物的绝对计数

在饮用水常规指标检测中,常需测量单位体积内细菌或细菌菌落的含量,在《生活饮用水卫生标准》(GB 5749—2006)中,明确规定了细菌菌落总数不超过100 CFU/100 mL。FCM绝对计数方法主要有:①注射泵法,即电机控制注射泵的活塞运动,利用活塞的前后移动产生压力差来推动管路内液体的

流动,其测量精度高,但最大测量体积有限,无法进行大体积水样的连续测定;②参比微球法,即在测试水样中添加一定数量的参比微球,利用目的细胞和微球的比例关系来计算细胞的绝对计数值,该方法简单,但需添加价格不菲的绝对计数微球,测试成本较高;③双电极法,如Partec公司流式细胞仪,其利用两个高度不同的电极感应信号来确定上样体积,该方法每次定量测试的体积是固定不可变的,且测量精度较低;④微流量传感器法,如Sensirion公司的流量传感器,主要采用微芯片技术,利用微孔道流场中温差变化量来换算流量变化量,该方法所用的传感器价格不菲,但精度高,待测的水样体积不受限制。

2 FCM常用荧光染料及数据分析

FCM在饮用水微生物检测中,为区分微生物与非生物颗粒,分析微生物细胞活性,以及识别不同群落的微生物含量,常需利用荧光染料对水体微生物细胞进行染色分析。现已用于分析水体细菌的荧光染料如表1所示,如PI、EB等荧光染料不能直接渗透到膜功能完整的细菌膜内,而只能与膜功能不完整的死细菌的核酸结合;SYBR Green I、SYTO-9等荧光染料能直接渗透到细菌膜内与核酸结合;CFDA等荧光染料利用活性细菌的酯酶作用,在一定波长激光激发下产生荧光素。

表1 已用于流式分析水体细菌的荧光染料

Tab.1 Fluorochromes for flow cytometric analysis of bacteria in water

染料	激发峰 λ_{EX}/nm	发射峰 λ_{EM}/nm	应用特点	作用对象	参考文献
Presidium Iodide (PI)	535	617	不渗透膜	DNA	[3]
SYBR Green I	494	521	渗透膜,对DNA更有亲和性	DNA(RNA)	[4]
SYBR Green II	494	521	渗透膜,对RNA更有亲和性	RNA(DNA)	[5]
Ethidium Bromide(EB)	518	605	不渗透膜	DNA/RNA	[6]
SYTO-9	480	500	渗透膜	DNA/RNA	[7]
Carboxyfluorescein Diacetate(CFDA)	492	517	渗透膜,在酯酶作用下产生荧光素	—	[8]
TO-PRO-3	515	531	不渗透膜	DNA/RNA	[9]

利用FCM对饮用水微生物进行分析时,常采用SYBR Green I和PI两种荧光染料^[3-4,10],SYBR Green I能激发出波峰为521 nm的荧光,PI能激发出波峰为617 nm的荧光,选用合适的带通滤波片可探测这两种荧光信号,进而区分出饮用水中死菌、活菌以及非生物颗粒等。

此外,FCM还能对细菌群落进行快速定量检测,如利用FSC与SSC散射光通道信号的散点图可

定量检测不同体积大小或不同胞内含量的细菌群落;利用双荧光通道信号的散点图可定量检测不同核酸含量的细菌群落,如高核酸含量菌群(HNAB)与低核酸含量菌群(LNAB)。

3 FCM在饮用水微生物检测中的应用

3.1 城市饮用水微生物全自动在线监测应用

FCM在饮用水微生物快速定量检测方面有着出色的表现,能在80 min内完成96孔样品盘全自

动检测,且短时间内对众多样品的细胞浓度定量测试和活力评估的准确度均很高^[4]。Hammes 等^[10]建立了基于 FCM 的饮用水微生物总细菌浓度(TCC)的全自动在线监测系统,如图2所示,并已应用于自来水生产处理系统中。该在线监测系统可全自动实现包含抽样、试剂添加、稀释、恒温孵育等过程的水样前处理和 FCM 分析。Besmer 等^[11-12]利用 FCM 长时间高频率地自动在线监测水源地水和水务公司中处理水(絮凝—超滤—臭氧化—颗粒活性炭过滤)的微生物 TCC 含量变化,可以更好地理解和缓解微生物含量动态波动问题。为实现全自动化的饮用水细菌定量检测和细菌群落变化检测,并得到稳定可靠的结果,可重复的染色方案、固定的 FCM 操作以及软件门控设置等至关重要^[4],不同的染色方案或主观的设门策略均会影响分析结果。

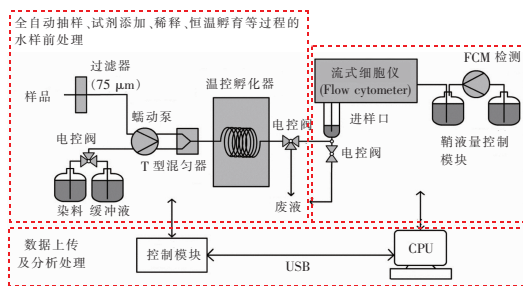


图2 饮用水微生物 TCC 全自动在线监测系统

Fig.2 On-line automatic monitoring system for the TCC of drinking water microorganism

3.2 水污染事件和自来水配送系统维护快速响应

在饮用水处理系统或自来水配送系统(WDS)中出现消毒杀菌失效、水压下降、回流、交叉连接甚至人为的恐怖生物污染等事故时,均可能发生饮用水快速污染事件,为了最大程度地降低这些污染事件带来的潜在健康危害,需要快速灵敏地对原位污染水样中微生物进行检测。Besmer 等^[13]利用 FCM 实现了超高频检测受污染的饮用水微生物,并评估化学消毒应急措施的可行性。WDS 在紧急维护中因涉及压力损失或管道开放,难免存在致病微生物污染风险, Van Nevel 等^[14]发现利用 FCM 可快速高效地评估管道冲洗水中微生物含量,缩短因管道维护而断水的时间和节约大量清洁管道所用的饮用水。

3.3 水中病原体高灵敏度快速筛选

病原体检测一直是饮用水安全保障的重要工

作,病原微生物一旦进入人体则可能使人患病,甚至死亡,严重威胁人类健康,尤其在发生自然灾害(地震、洪水等)、瘟疫、战争等突发性事件时,水源地水和自来水可能会暴发大面积的病原体污染,为了确保饮用水安全,快速检测病原体含量以及对其筛选并分析其潜在风险的意义十分重大^[15]。利用 HPC 能对某类特定的病原体进行培养和计数分析,能较方便地在培养基上分离出该病原体以确定其来源,但选择性培养基改变了非目标细菌和目标细菌的原始种群丰度,对确定病原体来源的追踪有影响,且 HPC 对病原体的检测和筛选周期较长,一般需要 2~5 d。FCM 和荧光激活细胞分选(FACS)现已广泛应用于病原体的检测和筛选。Ozawa 等^[16]研究发现利用 FCM 和 FACS,无需进行微生物培养和富集即可从水样中特异性检测和分离出大肠杆菌 O157:H7 群落,检测灵敏度高达 10 cells/mL。Zahavy 等^[17]先采用纳米磁珠对水样中的细菌进行预富集,之后利用荧光纳米晶体的独特光谱特性对富集后的细菌进行 FCM 分析和分选,通过该方法实现了炭疽芽孢杆菌和鼠疫耶尔森氏菌的分离和收集,灵敏度可达 1 000 cells/mL。

3.4 WDS 中微生物稳定性评估

经处理后的水厂出水会携带细微颗粒、微生物以及微生物赖以生存的各种营养素进入到 WDS 中。世界各国对水厂出厂水中微生物含量均有相应的强制性标准,但对 WDS 中微生物稳定性的安全问题却没有严格的界定和相应的标准,然而 WDS 中微生物稳定性的好坏直接影响着水龙头处自来水的的天安全。WDS 的管道材料、水压变化、温度变化、管道分叉设计、沉积物或未处理的水渗入到管道等众多因素均会影响微生物在 WDS 中的分布结构和再生长潜力,如何快速评估和预测 WDS 中关键节点的微生物稳定性十分重要。El-Chakhtoura 等^[18]利用 FCM 对 WDS 多个节点进行细菌 TCC 含量、细菌再生能力以及细菌群落变化等多参数的长时间监测,很好地评估了 WDS 中微生物稳定性安全问题。Nescerecka 等^[19]结合两种不依赖微生物培养的 ATP 化学发光法和 FCM,对 WDS 中多个采样点的水样微生物含量和活性进行检测,以此评估游离氯残留物含量对 WDS 中微生物稳定性的影响。刘婷婷等^[20]利用 FCM 和 HPC 对北京市 12 处 WDS 末梢水中细菌数量进行了定量检测,并分析和对比了这两种方法的

结果,发现 FCM 更能反映细菌的再生长潜能以及短时间内细菌的稳定性特征。

3.5 消毒和灭菌处理效果评估

水源地水天然存在着高浓度浮游细菌 ($> 10^4$ cells/mL), 饮用水处理的主要目标之一是确保自来水不含致病菌, 并在自来水配送过程中限制致病菌的再生能力。为此, 水务公司会采用臭氧氧化、预氯化、膜过滤或紫外线消毒等工艺^[11-12]; 很多国家在自来水配送前会额外添加一定浓度的消毒残余物(如游离氯)^[19], 某些欧洲国家也会通过限制细菌生成底物浓度来抑制 WDS 中细菌的再生能力。Huang 等^[21]利用 FCM 对细菌的快速定量检测和活性评估的优势, 能很好地对各消毒工艺过程的水样细菌含量做定量检测和细菌的再生潜力评估, 并利用分析结果来辅助指导消毒工艺过程。Ber 等^[22]采用 FCM 和 HPC 对自来水处理过程中的微生物含量进行了对比分析, 结果显示了 FCM 的实时检测优势, 如图 3 所示。马丽丽等^[23]利用荧光染料 SYBR Green I 对病毒核酸染色, 结合 FCM 对饮用水净化厂和污水处理厂各处理工艺中水样病毒含量进行了定量检测。黄慧婷等^[24]利用 FCM 对饮用水紫外灯消毒、氯消毒以及紫外/氯联合消毒的灭菌效果进行了相关研究, 提出在加入浓度相对较高的氯消毒剂时中压紫外/氯消毒方式对微生物的灭活效果最佳。二级消毒剂的种类以及添加浓度均会对 WDS 中微生物含量产生重要影响^[25]。相对于 HPC, FCM 测试结果更能准确地反映游离氯浓度对细胞活性的影响关系, 并快速评估饮用水中微生物状况及其再生潜力^[26]。

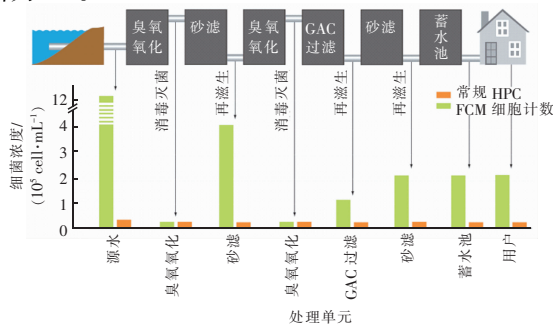


图3 分别采用 FCM 和 HPC 对自来水各处理工艺中水样微生物 TCC 检测结果

Fig.3 TCC test results of water samples in tap water processes by FCM and HPC method

4 FCM 应用中面临的问题与挑战

4.1 水样的前期预处理

直接采集的饮用水水样, 尤其是水源地水, 一般含有泥沙、铁锈、悬浮物、微纤维等非生物颗粒和气泡, 这会给 FCM 的检测结果带来偏差, 甚至可能造成 FCM 系统中微流孔道的堵塞。此外, 在饮用水微生物检测中, 染色染料的选择和染色条件(如添加试剂量、混匀条件、孵育时间和温度等)均会影响到 FCM 测试结果。因此, 如何进行水样的前期预处理, 最大限度地清除这些非生物颗粒或气泡, 以及微生物最优染色策略, 是未来 FCM 广泛应用于水生微生物全自动在线监测需重点考虑的问题。

4.2 饮用水微生物 FCM 检测标准的建立

FCM 自问世以来, 主要应用于医学领域的哺乳动物细胞的体外诊断, 现已有相应的医药行业标准, 但 FCM 应用于饮用水微生物的检测尚不成熟, 世界范围内还未形成行业标准。众所周知, 在 FCM 检测数据的设门分析中, 主要依赖于操作者对聚类数据的视觉分析和个人经验, 评判具有一定的主观性。如何客观地对水生微生物菌群进行设门和自动聚类分析, 也是 FCM 在饮用水微生物检测应用中还有待完善的地方。此外, 受限于微生物检测技术, 《生活饮用水卫生标准》(GB 5749—2006) 规定的微生物指标是基于 HPC 的检测结果, 但 HPC 只能检测自来水中不到 1% 的微生物, 因此, 基于 FCM 的水生微生物定量检测指标的标准还有待修订。

4.3 潜在荧光染料试剂的开发

当下对水生微生物的菌群分析中, 同时采用的荧光染料数目一般未超过两种^[3-4, 21], 主要是由于水生细菌或病毒相对于哺乳动物细胞而言体积较小, 很难进行多种荧光染料的染色。根据米氏散射原理, 由 FCM 中的散射光强度可区分出形态相差较大的典型菌群(如大肠菌群、曲霉、微球菌、棒状杆菌等), 但是对形态相差不大的菌群很难进行细分, 如利用 FCM 很难将大肠埃希氏菌从耐热大肠菌群中区分出来。荧光纳米晶体具有独特的光谱特性, 易于与体积很小的细菌或病毒特异性结合, 在水生菌群的细分应用上有着巨大的潜力, Zahavy 等^[17]结合 FACS 技术与纳米磁珠富集技术, 利用荧光纳米晶体已实现炭疽芽孢杆菌和鼠疫耶尔森氏菌的分析和分离。为了扩展 FCM 在水生微生物的菌群细化检测中的应用, 潜在荧光染料试剂的开发非常重要。

5 展望

流式细胞术是一种可进行每秒上万个细胞的多参数高通量测量技术,其在饮用水微生物的快速定量检测中已得到一定程度的应用和研究,但FCM在饮用水微生物检测的优势与挑战并存。一方面,利用FCM的高通量定量检测与多参数检测特点,在短时间内能快速检测微生物含量变化,可应用于微生物的全自动化在线监测、突发性水污染快速检测、WDS中微生物稳定性评估以及饮用水各处理工艺中微生物含量监控等方面;另一方面,受限于对病原体特异性结合的荧光染料试剂,FCM对水生微生物的菌群细分表现不佳。随着潜在荧光染料试剂的开发,FCM有望实现微生物的菌群细分检测,而不依赖于培养基的特定菌群培养。此外,FCM与现有检测方法对水污染问题的结果比对,以及成为普遍接受的饮用水微生物标准检测方法等还存在一些问题有待解决。

参考文献:

- [1] Bautista de los S Q M, Schroeder J L, Sevillano R M C, *et al.* Emerging investigators series: microbial communities in full-scale drinking water distribution systems—A meta-analysis[J]. *Environ Sci: Water Res Technol*, 2016, 2(4): 631–644.
- [2] Piyasena M E, Graves S W. The intersection of flow cytometry with microfluidics and microfabrication[J]. *Lab Chip*, 2014, 14(6): 1044–1059.
- [3] Yan X, Yu M, Wu L, *et al.* Rapid detection and enumeration of total bacteria in drinking water and tea beverages by a laboratory-built high-sensitivity flow cytometer[J]. *Anal Methods*, 2015, 7(7): 3072–3079.
- [4] Van N S, Koetzsch S, Weilenmann H U, *et al.* Routine bacterial analysis with automated flow cytometry[J]. *J Microbiol Methods*, 2013, 94(2): 73–76.
- [5] Helmi K, Watt A, Jacob P, *et al.* Monitoring of three drinking water treatment plants using flow cytometry[J]. *Water Sci Technol: Water Supply*, 2014, 14(5): 850–856.
- [6] Wallberg M, Gaustad P, Steen H B. Rapid assessment of ceftazidime, ciprofloxacin, and gentamicin susceptibility in exponentially-growing *E. coli* cells by means of flow cytometry[J]. *Cytom Part A*, 2015, 27(2): 169–178.
- [7] Peniuk G T, Schnurr P J, Allen D G. Identification and quantification of suspended algae and bacteria populations using flow cytometry: Applications for algae biofuel and biochemical growth systems[J]. *J Appl Phycol*, 2016, 28(1): 95–104.
- [8] Olsen R O, Hess-Erga O K, Larsen A, *et al.* Flow cytometric applicability to evaluate UV inactivation of phytoplankton in marine water samples[J]. *Mar Pollut Bull*, 2015, 96(1/2): 279–285.
- [9] Kerstens M, Boulet G, Tritsmans C, *et al.* Flow cytometric enumeration of bacteria using TO-PRO®-3 iodide as a single-stain viability dye[J]. *J Lab Autom*, 2014, 19(6): 555–561.
- [10] Hammes F, Broger T, Weilenmann H U, *et al.* Development and laboratory-scale testing of a fully automated online flow cytometer for drinking water analysis[J]. *Cytom Part A*, 2012, 81(6): 508–516.
- [11] Besmer M D, Weissbrodt D G, Kratochvil B E, *et al.* The feasibility of automated online flow cytometry for in-situ monitoring of microbial dynamics in aquatic ecosystems[J]. *Front Microbiol*, 2014. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00265.
- [12] Besmer M D, Hammes F. Short-term microbial dynamics in a drinking water plant treating groundwater with occasional high microbial loads[J]. *Water Res*, 2016, 107: 11–18.
- [13] Besmer M D, Sigrist J A, Props R, *et al.* Laboratory-scale simulation and real-time tracking of a microbial contamination event and subsequent shock-chlorination in drinking water[J]. *Front Microbiol*, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01900.
- [14] Van Nevel S, Buysschaert B, De Roy K, *et al.* Flow cytometry for immediate follow-up of drinking water networks after maintenance[J]. *Water Res*, 2016, 111: 66–73.
- [15] Ishii S, Nakamura T, Ozawa S, *et al.* Water quality monitoring and risk assessment by simultaneous multipathogen quantification[J]. *Environ Sci Technol*, 2014, 48(9): 4744–4749.
- [16] Ozawa S, Okabe S, Ishii S. Specific single-cell isolation of *Escherichia coli* O157 from environmental water samples by using flow cytometry and fluorescence-activated cell sorting[J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2016, 13(8): 456–461.
- [17] Zahavy E, Ordentlich A, Yitzhaki S, *et al.* Nano-Biotechnology for Biomedical and Diagnostic Research[M]. Dordrecht: Springer, 2012.
- [18] El-Chakhtoura J, Prest E, Saikaly P, *et al.* Dynamics of

- bacterial communities before and after distribution in a full-scale drinking water network[J]. *Water Res*,2015, 74:180 – 190.
- [19] Nescerecka A, Rubulis J, Vital M, *et al*. Biological instability in a chlorinated drinking water distribution network[J]. *PLoS One*,2014,9(5):e96354.
- [20] 刘婷婷,陈南,孔维文,等. 基于流式细胞术研究管网水中细菌的稳定性[J]. *应用与环境生物学报*,2016, 22(1):146 – 150.
- Liu Tingting, Chen Nan, Kong Weiwen, *et al*. Monitoring the bacterial stability in drinking water distribution systems by flow cytometry [J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*,2016, 22(1):146 – 150(in Chinese).
- [21] Huang X, Zhao Z, Hernandez D, *et al*. Near real-time flow cytometry monitoring of bacterial and viral removal efficiencies during water reclamation processes [J]. *Water*,2016. DOI:10.3390/w8100464.
- [22] Ber M, Hammes F, Fuchsli H P. New methods for assessing the safety of drinking water [EB/OL]. <https://www.researchgate.net/publication/237240938>. 2008,2018 – 04 – 20.
- [23] 马丽丽,冯伟,毛冠男,等. 基于流式细胞法的各水处理工艺病毒含量变化评价[J]. *安全与环境学报*, 2013,13(1):19 – 22.
- Ma Lili, Feng Wei, Mao Guannan, *et al*. Monitoring of the viral variation in different water treatments using flow cytometry[J]. *Journal of Safety and Environment*,2013, 13(1):19 – 22(in Chinese).
- [24] 黄慧婷,曹新垠,王敏,等. 基于流式细胞仪方法评价饮用水紫外/氯消毒效果[J]. *中国给水排水*,2017, 33(9):22 – 25,30.
- Huang Huiting, Cao Xinkai, Wang Min, *et al*. Evaluation of effect of UV/chlorine disinfection for drinking water treatment by flow cytometry [J]. *China Water & Wastewater*,2017,33(9):22 – 25,30(in Chinese).
- [25] Chowdhury S. Heterotrophic bacteria in drinking water distribution systems: A review [J]. *Environ Monit Assess*,2012,184(10):6087 – 6137.
- [26] Gillespie S, Lipphaus P, Green J, *et al*. Assessing microbiological water quality in drinking water distribution systems with disinfectant residual using flow cytometry[J]. *Water Res*,2014,65:224 – 234.



作者简介:严心涛(1987 –),男,湖北仙桃人,硕士,副研究员,主要研究方向为流式细胞术(FCM)、机 – 电 – 液一体化。

E – mail:yanxt@sibet.ac.cn

收稿日期:2019 – 11 – 26

珍惜资源,保护环境,建设美丽中国