

兰童, 雍绍文, 王金山, 等. 饮用水处理工艺中 VBNC 状态细菌研究现状[J]. 净水技术, 2024, 43(4): 68-75.

LAN T, YONG S W, WANG J S, et al. Research status of VBNC bacteria in drinking water treatment process[J]. Water Purification Technology, 2024, 43(4): 68-75.

饮用水处理工艺中 VBNC 状态细菌研究现状

兰童^{1,2}, 雍绍文³, 王金山³, 罗晓峰³, 钱江³, 刘成^{1,2,*}, 陈卫²

(1. 河海大学浅水湖泊综合治理与资源开发教育部重点实验室, 江苏南京 210098; 2. 河海大学环境学院, 江苏南京 210098; 3. 宁夏水投银川水务有限公司, 宁夏银川 750201)

摘要 活的非可培养(viable but non-culturable, VBNC)状态是某些细菌在不良环境中进入的一种特殊休眠状态, 在条件适宜时可复苏并恢复其致病性, 因此, VBNC 状态的水源性致病菌会对饮用水安全和人类健康造成潜在威胁。文中简要综述了饮用水处理工艺中 VBNC 细菌的研究现状, 分析了 VBNC 状态细菌形成和复苏的影响条件和作用机制, 探讨了常规饮用水处理工艺对 VBNC 细菌的影响。论文可为有效控制饮用水中 VBNC 细菌、保障饮用水安全提供一定的参考。

关键词 活的非可培养状态 饮用水安全 诱导 复苏 臭氧-生物活性炭工艺

中图分类号: TU991 文献标识码: A 文章编号: 1009-0177(2024)04-0068-08

DOI: 10.15890/j.cnki.jsjs.2024.04.009

Research Status of VBNC Bacteria in Drinking Water Treatment Process

LAN Tong^{1,2}, YONG Shaowen³, WANG Jinshan³, LUO Xiaofeng³, QIAN Jiang³, LIU Cheng^{1,2,*}, CHEN Wei²

(1. Key Laboratory of Integrated Regulation and Resource Development on Shallow Lakes, Ministry of Education, Hohai University, Nanjing 210098, China;

2. College of Environment, Hohai University, Nanjing 210098, China;

3. Ningxia Water Investment Yinchuan Water Co., Ltd., Yinchuan 750201, China)

Abstract Viable but non-culturable (VBNC) is a special dormant state for some bacteria to resist the adverse environment. It can be resuscitated and recover its pathogenicity when the conditions are suitable. Therefore, the waterborne pathogens in VBNC state may cause a potential threat to the drinking water safety and human health. This paper briefly summarizes the research status of VBNC bacteria in drinking water treatment, and analyzes the influencing conditions and mechanism on the formation and recovery of VBNC state. It discusses the possible influence of conventional drinking water treatment technology on VBNC bacteria. This paper can provide certain reference for effectively controlling VBNC bacteria in drinking water and ensuring drinking water safety.

Keywords viable but non-culturable (VBNC) drinking water safety induction recovery O₃-BAC process

1982年, Xu等^[1]首次发现并提出了细菌的“活的非可培养”状态(viable but non-culturable, VBNC), 明确了其基本概念: 细菌在不良外界环境中, 无法在常规固体培养基上生长繁殖形成菌落, 但

仍然具有代谢活性的一种特殊休眠状态, 在合适条件下可以复苏并恢复可培养性^[2]。

VBNC状态的存在影响了基于细胞可培养性的传统检测方法的准确性, 易导致微生物泄漏问题。包秋华等^[3]通过研究1994年—2021年Web of Science数据库中836篇关于VBNC的文献发现, 细菌VBNC研究方向主要集中在微生物学、传染病学、生物化学分子生物学等领域, 高频关键词也反映了目前的研究热点包括检测手段、诱导条件、形成机制等方面, 具体如图1所示。目前对于饮用水过程中细菌的VBNC状态研究相对较少, 部分研究结果表

[收稿日期] 2022-09-07

[基金项目] 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2012ZX07403-001)

[作者简介] 兰童(1999—), 女, 硕士, 研究方向为饮用水深度处理, E-mail: 738113392@qq.com。

[通信作者] 刘成, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为城市饮用水安全保障、特殊水质地下水处理等, E-mail: liucheng8791@hhu.edu.cn。

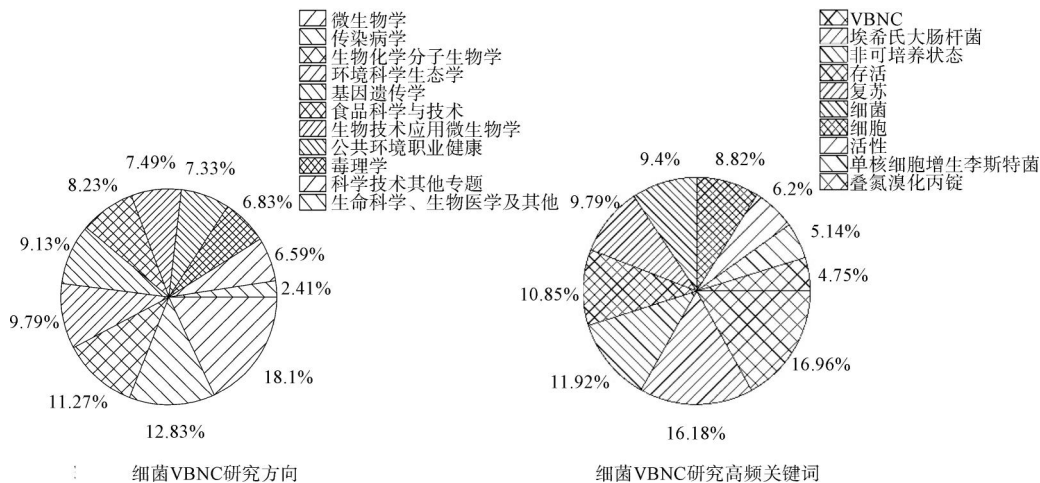


图 1 VBNC 细菌研究方向和高频关键词^[3]

Fig. 1 Research Directions and High Frequency Keywords of VBNC Bacterial^[3]

明一些致病菌能够在饮用水处理过程中呈现 VBNC 状态,并在输配水环节复苏,恢复致病性,威胁饮用水安全。然而人们对该转变过程的影响因素和作用机制尚不明确。

因此,本文从 VBNC 状态水源性致病菌种类、生物学特性变化、检测技术的发展以及诱导因素对目前细菌 VBNC 状态的研究进行论述,并结合饮用水处理过程中的工艺环节和水质条件,分析细菌 VBNC 状态的形成和复苏机制,重点探讨了臭氧-生物活性炭(O₃-BAC)单元对细菌实现 VBNC 状态转变的影响。论文内容可为有效控制饮用水中 VBNC 状态致病菌、保障饮用水供水安全提供一定的参考。

1 饮用水中 VBNC 状态细菌涉及的种类和生物学特征

1.1 饮用水中 VBNC 状态细菌涉及的种类

迄今国内外已陆续报道 100 余种微生物能够在某些不利的环境条件下诱导进入 VBNC 状态,包括多种细菌类群和部分真菌,细菌又分为致病菌和非致病菌。其中,常见的水源性致病菌种类如表 1^[4-6]所示,大多数为革兰氏阴性菌(G⁻),以变形菌门 γ-变形菌纲细菌为主(11 属 20 种),其余则属于 α-变形菌纲(1 属 1 种)、β-变形菌纲(1 属 1 种)、ε-变形菌纲(1 属 1 种)和拟杆菌门(1 属 1 种);仅有少量细菌为革兰氏阳性菌(G⁺),分别属于厚壁菌门(4 属 4 种)和放线菌门(2 属 2 种)。

1.2 饮用水中 VBNC 状态细菌的生物学特征

进入 VBNC 状态的细菌,它的多种生物学特征均会发生较明显变化,主要表现在细胞形态、代谢活性、抗性与致病性等方面。

细胞形态:细胞形态的变化是不同菌体应对环境变化的一种自我保护现象。大多数细菌进入 VBNC 状态后,细胞体积变小,杆状和弧状细菌通常会变为球杆状或球状^[7];而有些处于 VBNC 状态的 G⁺,如粪肠球菌^[8]的细胞形态则会变大并稍微伸长。

代谢活性:VBNC 状态的细菌能够保持较低的代谢活性。利用 5-氨基-2,3-二甲苯基四氮唑(CTC)染色结合流式细胞仪检测发现 VBNC 状态下的大肠杆菌仍然保持呼吸活性,但较可培养细胞降低了约 50%^[9]。同样地,金黄色葡萄球菌进入 VBNC 状态后,与代谢相关的基因明显下调、代谢活性受到抑制^[10]。

抗性:一般情况下,处于 VBNC 状态的细菌细胞代谢活性减弱、分裂增殖能力下降,对外界胁迫因子的抗性增强。VBNC 状态的副溶血性弧菌对高温(42、47 °C)、低渗透压(0.9% NaCl)和高浓度酸(pH 值=4.0)应激条件的抗性增强^[11];VBNC 状态的大肠杆菌对氨苄西林、庆大霉素、多黏菌素、环丙沙星等 9 种典型抗生素也表现出良好的耐受性^[12]。

致病性:VBNC 状态致病菌能够直接表达毒力因子或保留致病潜力,复苏后恢复致病性,对水质安全和人类健康造成潜在危害。利用实时荧光定量

表 1 饮用水中部分已报道可进入 VBNC 状态的致病菌种类
Tab. 1 Some Pathogenic Bacteria in Drinking Water
Reportedly Entering into VBNC State

拉丁学名	中文译名	所属门/纲	G ⁺ /G ⁻
<i>Acetobacter aceti</i> ^[6]	醋化醋杆菌	变形菌门 α- 变形菌纲	G ⁻
<i>Burkholderia cepacia</i> ^[5]	洋葱伯克霍尔 德氏菌	变形菌门 β- 变形菌纲	
<i>Aeromonas hydrophila</i> ^[5]	嗜水气单胞菌	变形菌门 γ- 变形菌纲	
<i>Aeromonas salmonicida</i> ^[5]	杀鲑气单胞菌		
<i>Edwardsiella taeda</i> ^[4]	迟缓爱德华氏菌		
<i>Enterobacter aerogenes</i> ^[5]	产气肠杆菌		
<i>Escherichia coli</i> ^[5]	大肠杆菌		
<i>Klebsiella aerogenes</i> ^[5]	产气克雷伯氏菌		
<i>Legionella pneumophila</i> ^[5]	嗜肺军团菌		
<i>Pasteurella piscicida</i> ^[5]	杀鱼巴斯德杆菌		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^[5]	铜绿假单胞菌		
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ^[6]	荧光假单胞菌		
<i>Pseudomonas putida</i> ^[6]	恶臭假单胞菌		
<i>Pseudomonas syringae</i> ^[5]	丁香假单胞菌		
<i>Salmonella typhi</i> ^[4]	伤寒沙门氏菌		
<i>Shigella dysenteriae</i> ^[5]	痢疾志贺氏菌		
<i>Shigella sonnei</i> ^[5]	福氏志贺氏菌		
<i>Vibrio cholerae</i> ^[5]	霍乱弧菌		
<i>Vibrio fischeri</i> ^[6]	费氏弧菌		
<i>Vibrio harveyi</i> ^[5]	哈维氏弧菌		
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ^[5]	副溶血弧菌		
<i>Vibrio vulnificus</i> ^[5]	创伤弧菌		
<i>Helicobacter pylori</i> ^[5]	幽门螺杆菌	变形菌门 ε-变形菌纲	
<i>Cytophaga allerginae</i> ^[5]	过敏嗜纤维菌	拟杆菌门	
<i>Enterococcus faecalis</i> ^[5]	粪肠球菌	厚壁菌门	G ⁺
<i>Listeria monocytogenes</i> ^[5]	单核增生李斯特氏菌		
<i>Staphylococcus aureus</i> ^[4]	金黄色葡萄球菌		
<i>Streptococcus faecalis</i> ^[5]	粪链球菌		
<i>Micrococcus luteus</i> ^[4]	膝黄微球菌	放线菌门	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ^[5]	结核分枝杆菌		

PCR (RT-PCR) 技术检测发现, 进入 VBNC 状态的副溶血性弧菌可以表达毒力基因 *tdh2*^[13]; 然而哈维氏

弧菌的毒力基因表达检测结果显示, VBNC 状态细胞中未检测到溶血毒素基因的表达, 但复苏细胞仍能导致斑马鱼的死亡, 说明复苏后该细菌的致病性也随之恢复^[14]。

2 VBNC 状态细菌检测方法

细菌进入 VBNC 状态后会丧失可培养性, 常规平板计数法无法对其进行有效检测, 导致“漏检”部分致病菌、影响水质安全, 需建立快速、准确的 VBNC 细菌检测方法。

目前尚未报道能够直接检测 VBNC 状态细菌数量的方法, 一般而言, 该过程需要分别对总菌、活菌和可培养菌进行定量计数, 当可培养菌数明显小于活菌数时, 即可认为存在部分处于 VBNC 状态的细菌, 其数量可通过活菌数和可培养菌数的差值获得, 即 VBNC 状态菌数 = 活菌数 - 可培养菌数。可培养菌数由平板计数法获得, 由此可见关键在于对活菌数的准确测定。

目前针对活菌数量的检测主要使用由 Kogure 等^[15] 最初采用的活菌直接计数法 (direct viable counting, DVC), 而部分革兰氏阳性菌对萘啶酮酸的抗性会导致观察效果不好。为进一步提高检测结果的准确性, LIVE/DEAD 试剂盒检测法、流式细胞仪检测法、免疫学法等检测手段陆续得到发展和应用。近年来, 实时荧光定量 PCR 法 (quantitative real-time PCR)、叠氮溴化丙锭联合实时荧光定量 PCR 法 (PMA-qPCR)、核酸探针等分子生物学检测手段也被用于 VBNC 状态的检测^[16]。上述几种 VBNC 状态细菌检测方法的对比如表 2^[17] 所示。由于单一检测方法的结果具有局限性, 在实际应用过程中大多通过两种或以上的方法组合验证的方式来提高检测精确度。

3 VBNC 状态细菌的形成和复苏机制

3.1 VBNC 状态细菌的诱导因素

目前已证实多种环境因素可以诱导细菌进入 VBNC 状态, 包括温度、营养、pH、盐度、氧气浓度、紫外照射等物理因素, 以及消毒剂、抗生素等化学因素。在饮用水处理过程中, 温度 (季节变化) 和营养缺乏 (饥饿状态) 是影响细菌 VBNC 状态形成的主要因素。

3.1.1 温度

温度对细菌 VBNC 状态的诱导与细菌种类有

表2 VBNC 状态细菌检测方法比较
Tab. 2 Comparison of Determination Methods for Bacteria in VBNC State

检测方法	检测原理	优点	缺点
DVC 法	活性细胞对底物的吸收能力	设备简单,特异性较强,重复性良好	部分细菌对萘啶酮酸产生抗性,影响观察效果
LIVE/DEAD 试剂盒	活菌细胞膜完整性	操作简单省时,使用范围广泛	无法区分细菌种类,价格高昂
流式细胞仪检测法	细胞自身携带荧光信号	能准确检测死活细菌数量和比例关系	无法区分细菌种类,价格高昂
免疫学法	抗原抗体的特异性结合	检测快速,灵敏度高,选择性好	不同细菌种类,结果准确性不同
分子生物学检测法(PMA-qPCR)	活菌细胞膜完整性	特异性强,检测限低,灵敏度高	价格高昂,模板量大

关,主要区别在于细菌对高温/低温的敏感度。分别在 10~30 ℃ 和 4~6 ℃ 条件下培养霍乱弧菌和空肠弯曲杆菌,发现霍乱弧菌在 4~6 ℃ 时更容易进入 VBNC 状态,而空肠弯曲杆菌在 30 ℃ 条件下的诱导效果更好^[2]。相关研究表明,大多数水源性致病菌对低温较敏感,能够在低温条件下进入 VBNC 状态。在饮用水处理全过程中,水温呈现明显的季节性变化,尤其是冬季和夏季。在不同的季节,细菌可能呈现不同的生存状态,在活菌和 VBNC 状态之间相互转化。

3.1.2 营养缺乏

营养缺乏是影响细菌进入 VBNC 状态的重要因素之一,VBNC 状态可增强细菌对寡营养环境的抗性。使用无菌蒸馏水培养军团菌,发现军团菌在饥饿状态下进入 VBNC 状态,并伴随有细胞膜的损伤和酯酶活性降低等现象^[18]。

3.1.3 其他因素

饮用水处理过程中的紫外照射和消毒剂处理也被证实可以导致多种细菌进入 VBNC 状态^[19-20]。使用质量浓度为 1 mg/L 的氯处理大肠杆菌 5~60 min 后,发现可培养细菌从 1×10^6 CFU/mL 降至 0,而活菌数相差不大,认为已被诱导进入 VBNC 状态。相较而言,盐度和渗透压对于水源性细菌影响相对较弱。

3.2 细菌 VBNC 状态的形成机制

目前,细菌 VBNC 状态的形成机制尚不明确,现有研究发现该过程涉及细菌多种代谢途径中的众多相关基因,主要包括严紧反应、蛋白酶对抗毒素的降解和毒素-抗毒素(toxin-antitoxin,TA)系统^[21],三者相互协同发挥作用。此外,氧化应激反应和一些关键调控因子对 VBNC 状态的形成也具有重要意义,主要形成机制如图 2 所示。

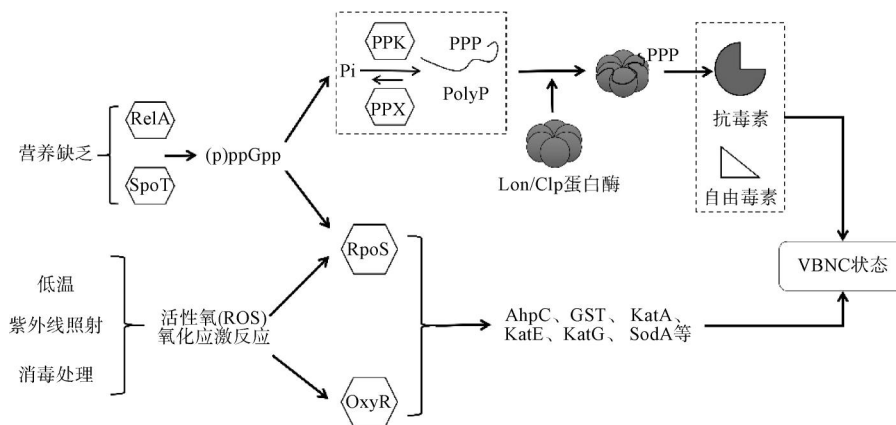


图2 VBNC 状态形成机制

Fig. 2 Formation Mechanism of VBNC State

3.2.1 严紧反应、蛋白酶对抗毒素的降解和 TA 系统

严紧反应是通过减缓细菌生长实现菌体内氨、基酸水平升高的一种作用机制,该过程主要利用信

号分子鸟苷五磷酸或鸟苷四磷酸[(p)ppGpp]对细胞分裂转录和翻译等生理过程进行调控。在营养缺乏的条件下,被激活的核糖体蛋白 RelA 和胞质蛋白 SpoT 能够合成 (p)ppGpp 信号分子,(p)ppGpp 通

过抑制外切聚磷酸酶 (PPX) 对多聚磷酸盐 (polyphosphates, PolyP) 的降解、促进多聚磷酸盐激酶 (PPK1、PPK2) 的活化实现细菌体内 PolyP 的逐渐积累。Lon/Clp 蛋白酶被积累的 PolyP 激活并开始降解 TA 系统的抗毒素,使得毒素 (toxin) 和抗毒素 (antitoxin) 比例升高,游离毒素通过抑制细胞 DNA 复制和 mRNA 翻译等过程抑制细胞分裂和生长,进而调控 VBNC 状态的形成^[22-23]。

3.2.2 氧化应激反应

ROS 和氧化应激反应是 VBNC 状态形成的重要因素。研究^[24]表明,抗氧化酶 AhpC、谷胱甘肽 S-转移酶 GST、过氧化氢酶 KatA/KatG、超氧化物歧化酶 SodA 等与 ROS 相关的蛋白质均参与 VBNC 细菌的形成。在低温条件下,过氧化氢酶活性受到抑制、细胞可培养性降低,部分水源性致病菌能够进入 VBNC 状态。对于紫外线照射和消毒处理等过程而言,过量自由基的产生、氧化应激反应及相关基因的表达也能促进 VBNC 状态细菌的形成。

3.2.3 关键调控因子

RNA 聚合酶 sigma 因子 (RNA polymerase sigma factor, RpoS) 和转录调控因子 OxyR 对 VBNC 状态的形成具有一定的调控作用^[25]。RpoS 蛋白能够调控细菌转录、翻译、蛋白质水解等过程,菌体内 (p) ppGpp 水平的增加会导致 RpoS 蛋白的积累,进而诱导 VBNC 状态;OxyR 的作用机制主要与活性氧及抗氧化胁迫有关,通过影响 AhpC 和 GST 等基因的表达实现对细菌 VBNC 状态的调控^[24]。

3.3 VBNC 状态细菌的复苏机制

针对不同的细菌种类和诱导条件,VBNC 状态细菌的复苏方法和能力也大不相同。目前可行的 VBNC 状态复苏方法主要有两种:一是去除诱导因子,即降低外界环境胁迫;二是添加与复苏相关的特定信号分子,如复苏促进因子、自诱导因子等。

3.3.1 去除诱导因子

低温、寡营养、紫外线照射等不利条件均可诱导细菌进入 VBNC 状态,相对应地,通过提高培养温度、添加某些营养物质、添加自由基清除剂 (丙酮酸钠) 等方法直接去除环境诱导因子可以实现 VBNC 状态细菌的复苏。在培养液中添加营养物质并升温培养,发现低温寡营养条件下诱导的 VBNC 状态副溶血弧菌细菌能够在 48 h 内复苏为可培养状态,且复苏后的副溶血弧菌与正常状态的细菌形态

相似^[26]。

然而现有研究表明,仅有少量被诱导进入 VBNC 状态的细菌能够在实验室条件下成功复苏。由此可见,该过程并不是简单的逆转过程,具体的作用机制仍需进一步探讨。

3.3.2 添加信号分子

(1) 复苏促进因子

1995 年, Mukamolova 等^[27] 首次在膝黄微球菌中发现了复苏促进因子 Rpf (resuscitation-promoting factor)。Rpf 是一种高度保守的分泌蛋白,广泛存在于高 G+C 的 G⁺ 中,能有效促进该类细菌,尤其是放线菌门细菌的生长和复苏^[28]。

目前针对 Rpf 促进 VBNC 状态细菌复苏机制的研究主要从两个方面考虑:①Rpf 作为细胞因子,能够与 VBNC 状态细菌表面的受体蛋白结合并传递生长信号,促进细胞的生长和复苏,但目前仍未发现相关的受体以及上、下游调控因子^[29];②Rpf 作为一种胞壁溶解酶,其作用机制与溶菌酶相似,通过水解 VBNC 状态细菌细胞壁中的肽聚糖,使得细胞壁部分裂解,促进细胞分裂和生长^[30],降解得到的肽聚糖产物也可能充当“第二信使”,协同其他的影响因素,共同参与 VBNC 状态细菌的生长和复苏过程。

此外,在部分 G⁻ (沙门氏菌属、弧菌属等) 中也发现了类似于 Rpf 的复苏促进因子,如 YeaZ、Gcp 等^[31-32],这些蛋白类似于糖蛋白酶,其蛋白互作网络与细胞分裂和 DNA 代谢密切相关。然而 G⁻ 的蛋白结构较复杂,目前相关研究较少,作用机制尚未形成定论。

(2) 自诱导因子

自诱导因子 (AI-2) 是由群体感应 (quorum sensing, QS) 分泌的一种信号分子,能够实现 VBNC 状态细菌的复苏。研究^[21]表明,细菌的生理过程变化受到多种蛋白的共同调控,如 LuxR 蛋白能够调节细菌的毒性基因表达和生物膜形成,RpoS 蛋白则能够调节细菌在不良环境下的应激表达。在适当条件下,群体感应信号分子 AI-2 能够提高 luxR 和 rpoS 等相关基因的表达,实现 VBNC 状态细菌的复苏^[33]。

4 饮用水处理过程对细菌 VBNC 状态的影响

相关报道显示,在饮用水处理及管道输配过程

中,受到多种外界环境因素的影响,部分水源性致病菌可能会被诱导进入 VBNC 状态^[34],能够直接表达毒力因子或保留致病潜力。因此,进一步探究饮用水处理过程对于细菌 VBNC 状态形成和复苏的影响,对于保障饮用水安全具有重要意义。

饮用水常规处理工艺包括混凝-沉淀-过滤-消毒,为了有效去除水中大分子有机物、提高出水水质,部分水厂增设了如 O₃-BAC、膜处理等深度处理单元。其中,涉及到 VBNC 状态细菌变化的主要工艺包括混凝、沉淀、过滤、O₃-BAC 工艺和消毒处理。

4.1 混凝、沉淀、过滤工艺单元

混凝、沉淀、过滤是饮用水处理过程中最基本的处理单元,其主要净水原理是通过投加混凝剂,使水中胶体物质凝聚成团沉降,利用石英砂过滤去除水中的细小悬浮颗粒,其中包括一部分的 VBNC 状态细菌。针对全尺寸饮用水处理厂中致病菌 VBNC 状态的检测结果^[35]表明,相较于水源水而言,该阶段的 VBNC 状态细菌数量有所减少。然而目前尚未见有关混凝、沉淀、过滤工艺诱导细菌进入 VBNC 状态的报道。

4.2 O₃-BAC 工艺

O₃ 氧化能够破坏细菌的细胞膜结构,程度严重时会导致细胞死亡,对水中微生物具有一定的控制作用。同时能通过产生过量自由基,诱导微生物上调抗氧化相关基因表达,促使部分未被完全灭活的细菌进入 VBNC 状态^[20]。

BAC 上富集大量的微生物,具有丰富的种群多样性和种群结构,能够为细菌提供更多的生态位,同时为实现细菌 VBNC 状态的转变提供了更多的可能性。相关研究表明,BAC 颗粒上的致病微生物大多来源于水源水,而大多数致病菌在水源水中已经处于 VBNC 状态^[35],部分致病微生物在 BAC 前置处理过程中也会转变为 VBNC 状态,这些 VBNC 状态细菌能够直接富集在 BAC 上,因此,BAC 生物膜上的致病微生物是活菌和 VBNC 状态细菌的混合体。炭池运行过程中形成的不利环境条件也能够诱导部分致病微生物进入 VBNC 状态。VBNC 状态细菌在炭池不同深度的分布情况间接反映了 O₃-BAC 对 VBNC 状态的诱导作用。表层细菌由于长期暴露于 O₃ 环境下,易造成细胞膜的破坏;而深层细菌能够持续消耗营养物质和 O₂,易形成寡营养环境,并导

致细菌数量降低^[36],营养缺乏和 O₃ 都是细菌 VBNC 状态形成的重要因素,两者的共同作用对细菌 VBNC 状态转变的影响,需要进行进一步的系统研究。

4.3 消毒工艺单元

常见的饮用水消毒处理方法(氯气、紫外线等)均可诱导细菌进入 VBNC 状态。其中,紫外线处理能够降低细胞的可培养性,引起微生物体内活性氧的失衡,促使其进入 VBNC 状态^[37];而氯气消毒则主要依靠细胞膜的损伤、抑制酶促反应来实现^[20]。

细菌种类和诱导因子均会影响消毒处理诱导微生物进入 VBNC 状态的复苏能力。利用紫外线分别诱导大肠杆菌和铜绿假单胞菌进入 VBNC 状态,发现大肠杆菌的复苏能力比铜绿假单胞菌强^[37];经氯/氯胺处理后的大肠杆菌均可进入 VBNC 状态,但仅有氯处理的 VBNC 状态细菌能够在 37 °C 的 LB 培养基中复苏^[9]。

4.4 水厂控制 VBNC 状态微生物的关键环节探讨

相较于其他饮用水处理工艺,O₃-BAC 工艺对于 VBNC 状态微生物的控制起着关键的作用。一方面,通过 O₃ 氧化可以有效灭活大部分微生物,但也能诱导部分未被灭活的微生物处于 VBNC 状态,并在 BAC 单元截留、富集;另一方面,BAC 单元净化过程中,微生物在 BAC 颗粒表面和孔隙内大量富集、滋生、增殖,以及生物膜厚度的增加,造成局部营养物质含量不足及生长条件恶化,诱导部分微生物进入 VBNC 状态。在一般水厂应用中,O₃-BAC 工艺常被设置于净化工艺末端,会直接影响最终出水中 VBNC 细菌的种类和含量。因此,O₃-BAC 工艺对于水厂 VBNC 细菌控制具有重要的意义,具体可通过以下途径予以优化控制:

- 1) 解析 O₃ 氧化灭活微生物效能与诱导微生物处于 VBNC 状态的“剂量-效应”关系,探讨水质条件的影响因素,优化 O₃ 投加剂量;

- 2) 明确 BAC 单元中 VBNC 微生物富集以及诱导生物膜微生物进入 VBNC 状态的机制及关键条件,合理调整 BAC 运行参数,规避或减弱 BAC 净化过程中对 VBNC 状态的诱导效应;

- 3) 强化 O₃-BAC 工艺出水中 VBNC 状态微生物的控制,通过 BAC 单元结构的优化设计,改进底部

砂垫层的组成及厚度,强化对逸散微生物的截留及控制效能,必要情况下,可通过后置增设超滤膜截留、优化消毒工艺形式等方式来确保 VBNC 状态微生物的有效控制。

5 结论

饮用水处理过程中存在的各种物理、化学等环境胁迫因素,能够诱导部分致病菌进入 VBNC 状态,并在适当条件下复苏,致病性的恢复对饮用水安全和人体健康造成了严重威胁。因此,进一步探讨饮用水全处理流程中细菌 VBNC 状态的形成和复苏机制、建立有效的 VBNC 状态细菌控制手段是今后的研究重点,主要体现在以下几个方面:(1)明确 VBNC 状态细菌在饮用水处理全过程中的分布情况,分析 VBNC 状态细菌的转变规律;(2)研究饮用水处理条件对 VBNC 状态细菌的诱导作用,深入探讨 VBNC 状态的形成及复苏机制;(3)建立快速、准确的 VBNC 状态细菌检测方法,避免致病菌的“漏检”,保障供水安全。

参考文献

- [1] XU H S, ROBERTS N, SINGLETON F L, et al. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment [J]. *Microbial Ecology*, 1982, 8(4): 313-323.
- [2] COLWELL R R, BRAYTON P R, GRIMES D J, et al. Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: Implications for release of genetically engineered microorganisms [J]. *Bio/Technology*, 1985, 3(9): 817-820.
- [3] 包秋华, 刘倩宇. 基于 Web of Science 细菌活的非可培养状态研究文献的可视化分析 [J]. *食品科学*, 2023, 44(5): 248-256.
- BAO Q H, LIU Q Y. Visual analysis of research literature on viable but non-culturable state in bacteria based on Web of Science [J]. *Food Science*, 2023, 44(5): 248-256.
- [4] 张晓华, 钟浩辉, 陈吉祥. 细菌活的非可培养状态研究进展 [J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2020, 50(9): 153-160.
- ZHANG X H, ZHONG H H, CHEN J X. Research progress on viable but nonculturable state bacteria [J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2020, 50(9): 153-160.
- [5] OLIVER J D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria [J]. *Fems Microbiology Reviews*, 2010, 34(4): 415-425.
- [6] PINTO D, SANTOS M A, CHAMBEL L. Thirty years of viable but nonculturable state research: Unsolved molecular mechanisms [J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2015, 41(1): 61-76.
- [7] SALIVE A F V, PRUDÊNCIO C V, BAGLINIÈRE F, et al. Comparison of stress conditions to induce viable but non-cultivable state in *Salmonella* [J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2020, 51(3): 1269-1277.
- [8] SIGNORETTO C, DEL MAR LLEÒ M, TAFI M C, et al. Cell wall chemical composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(5): 1953-1959.
- [9] CHEN S, LI X, WANG Y, et al. Induction of *Escherichia coli* into a VBNC state through chlorination/chloramination and differences in characteristics of the bacterium between states [J]. *Water Research*, 2018, 142: 279-288. DOI: 10.1016/j.watres.2018.05.055.
- [10] LIAO X Y, LIU D H, DING T. Nonthermal plasma induces the viable-but-nonculturable state in *Staphylococcus aureus* via metabolic suppression and the oxidative stress response [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(5): e02216-19. DOI: 10.1128/AEM.02216-19.
- [11] WONG H C, WANG P. Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, 96(2): 359-366.
- [12] LIN H, YE C, CHEN S, et al. Viable but non-culturable *E. coli* induced by low level chlorination have higher persistence to antibiotics than their culturable counterparts [J]. *Environmental Pollution*, 2017, 230: 242-249. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.06.047.
- [13] 刘静宇, 凌莉, 邓翼惠, 等. 活的非可培养状态副溶血性弧菌实时荧光逆转录 PCR 检测方法的建立及其毒力研究 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2013, 25(4): 309-315.
- LIU J Y, LING L, DENG Y H, et al. Determination and analysis of potential virulence of viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2013, 25(4): 309-315.
- [14] SUN F, CHEN J, ZHONG L, et al. Characterization and virulence retention of viable but nonculturable *Vibrio harveyi* [J]. *Fems Microbiology Ecology*, 2008, 64(1): 37-44.
- [15] KOGURE K, SIMIDU U, TAGA N. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1979, 25(3): 415-420.
- [16] 赵黎黎, 包秋华, 赵国芬. 细菌 VBNC 态检测技术的研究进展 [J]. *微生物学杂志*, 2016, 36(4): 96-101.
- ZHAO L L, BAO Q H, ZHAO G F. Advances in test techniques of viable but non-culturable state of bacteria [J]. *Journal of Microbiology*, 2016, 36(4): 96-101.
- [17] 谷立慧, 钟青萍, 方祥, 等. “活的非可培养态”食源致病细菌的研究进展 [J]. *食品与发酵工业*, 2016, 42(2): 270-274.
- GU L H, ZHONG Q P, FANG X, et al. Research progress on

- the viable but non-culturable state of food-borne pathogenic bacteria[J]. Food and Fermentation Industries, 2016, 42(2): 270-274.
- [18] SCHRAMMEL B, CERVERO-ARAGO S, DIETERSDORFER E, et al. Differential development of *Legionella* sub-populations during short- and long-term starvation [J]. Water Research, 2018, 141: 417-427. DOI: 10.1016/j.watres.2018.04.027.
- [19] IMAMURA D, MIZUNO T, MIYOSHI S I, et al. Stepwise changes in viable but nonculturable *Vibrio cholerae* cells [J]. Microbiology and Immunology, 2015, 59(5): 305-310.
- [20] ORTA D V M T, YANEZ N I, CASASOLA R B, et al. Effects of ozone and chlorine disinfection on VBNC *Helicobacter pylori* by molecular techniques and FESEM images [J]. Environmental Technology, 2017, 38(6): 744-753.
- [21] 张蕊蕊, 关翔宇. 自然环境中功能菌活的非可培养状态形成及复苏机制研究进展[J]. 环境化学, 2021, 40(4): 1243-1253.
- ZHANG R R, GUAN X Y. Research progress on the formation and resuscitation mechanism of viable but non-culturable state of functional bacteria in natural environment [J]. Environmental Chemistry, 2021, 40(4): 1243-1253.
- [22] AYRAPETYAN M, WILLIAMS T, OLIVER J D. Relationship between the viable but nonculturable state and antibiotic persister cells[J]. Journal of Bacteriology, 2018, 200(20): e00249-18. DOI:10.1128/JB.00249-18.
- [23] 阙玉敏, 蒋娜, 白凯红, 等. 细菌有活力但不可培养状态及其机制研究进展[J]. 微生物学通报, 2020, 47(3): 880-891.
- KAN Y M, JIANG N, BAI K H, et al. Research progress on viable but non-culturable state of bacteria [J]. Microbiology China, 2020, 47(3): 880-891.
- [24] 李静薇, 杨雅迪, 李婷婷. VBNC 细菌的抗生素耐受机制及治疗研究进展[J]. 国外医药(抗生素分册), 2022, 43(1): 1-9.
- LI J W, YANG Y D, LI T T. Research progress on antibiotic tolerance mechanism and treatment of bacteria in VBNC state [J]. World Notes on Antibiotics, 2022, 43(1): 1-9.
- [25] 王国雄, 廖红梅. 物理场加工中细菌活的非可培养状态相关研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(15): 4949-4956.
- WANG G X, LIAO H M. Research progress on viable but non-culturable state of bacteria in physical field processing [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2022, 13(15): 4949-4956.
- [26] 杜萌, 陈吉祥, 孙丰蓉, 等. 低温寡营养条件下副溶血弧菌形成活的非可培养状态及其复苏研究[J]. 水生生物学报, 2008, 32(2): 178-183.
- DU M, CHEN J X, SUN F R, et al. Studies of viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus* at low temperature under poor nutrition conditions and its resuscitation [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2008, 32(2): 178-183.
- [27] MUKAMOLOVA G V, KAPRELYANTS A S, KELL D B. Secretion of an antibacterial factor during resuscitation of dormant cells in *Micrococcus luteus* cultures held in an extended stationary phase[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1995, 67(3): 289-295.
- [28] MURUGAN K, VASUDEVAN N. Intracellular toxicity exerted by PCBs and role of VBNC bacterial strains in biodegradation[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 157: 40-60. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.03.014.
- [29] RAMAMURTHY T, GHOSH A, PAZHANI G P, et al. Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria[J]. Frontiers in Public Health, 2014, 2: 103. DOI: 10.3389/fpubh.2014.00103.
- [30] ZHAO X, ZHONG J, WEI C, et al. Current perspectives on viable but non-culturable state in foodborne pathogens [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 580. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00580.
- [31] 芮文鸿. 哈维氏弧菌 YeaZ 互作蛋白基因克隆表达及其性质研究[D]. 兰州: 兰州理工大学, 2018.
- RUI W H. Expression and characterization of YeaZ interaction related protein genes of *Vibrio harveyi* [D]. Lanzhou: Lanzhou University of Technology, 2018.
- [32] 赵明君, 贾俊涛, 陈吉祥. 副溶血弧菌一种糖蛋白酶(复苏促进因子)在大肠杆菌中的表达及性质[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2012, 42(3): 57-63.
- ZHAO M J, JIA J T, CHEN J X. Expression and characterization of a resuscitation-promoting factor like glycoprotease gene from *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Periodical of Ocean University of China, 2012, 42(3): 57-63.
- [33] SCHUSTER M, HAKINS A C, HARWOOD C S, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing [J]. Molecular Microbiology, 2004, 51(4): 973-985.
- [34] LIN Y W, LI D, GU A Z, et al. Bacterial regrowth in water reclamation and distribution systems revealed by viable bacterial detection assays [J]. Chemosphere, 2016, 144: 2165-2174. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2015.10.071.
- [35] GUO L, WAN K, ZHU J, et al. Detection and distribution of VBNC/viable pathogenic bacteria in full-scale drinking water treatment plants [J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 406: 124335. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.124335.
- [36] BOON N, PYCKE B F G, MARZORATI M, et al. Nutrient gradients in a granular activated carbon biofilter drives bacterial community organization and dynamics [J]. Water Research, 2011, 45(19): 6355-6361.
- [37] ZHANG S, YE C, LIN H, et al. UV disinfection induces a VBNC state in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Environmental Science & Technology, 2015, 49(3): 1721-1728.