

## 城镇水系统全流程水质监测技术专栏

张瑞婷, 王园媛, 邢方潇, 等. PMA-qPCR 定量检测饮用水中铜绿假单胞菌的方法[J]. 净水技术, 2025, 44(5): 206–215.

ZHANG R T, WANG Y Y, XING F X, et al. Quantitative determination of *Pseudomonas aeruginosa* in drinking water by PMA-qPCR method[J]. Water Purification Technology, 2025, 44(5): 206–215.

## PMA-qPCR 定量检测饮用水中铜绿假单胞菌的方法

张瑞婷, 王园媛, 邢方潇, 张 晓, 张 岚\*

(中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所, 传染病溯源预警与智能决策全国重点实验室, 中国疾病预防控制中心环境与人群健康重点实验室, 北京 100050)

**摘 要** 【目的】为预防水源性疾病暴发和保障水质安全, 建立快速、准确的检测水中活性病原菌的方法至关重要。鉴于生活饮用水细菌含量较低, 建立一种适用于大体积饮用水中铜绿假单胞菌检测的富集浓缩及叠氮溴化丙锭-定量聚合酶链式反应(PMA-qPCR)方法。【方法】通过调整涡旋振荡时长, 计算加标回收率, 优化富集浓缩方法; 采用  $L_{16}(4^3)$  正交试验筛选能够有效去除铜绿假单胞菌死菌脱氧核糖核酸的 PMA 处理条件的最佳组合, 并进行验证。【结果】通过膜过滤法将 10 L 饮用水中的铜绿假单胞菌富集至膜上后, 采用涡旋振荡(转速为 3 000 r/min, 振荡时间为 15 min, 重复 2 次)及离心(8 000 g, 10 min)的方式将膜上的细菌洗脱至 1 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)中。该方法在 50 min 内完成且回收率可达  $80.95\% \pm 7.43\%$ 。PMA-qPCR 法的最优 PMA 处理条件: PMA 浓度为 30  $\mu\text{mol/L}$ 、黑暗中孵育时间为 20 min、光暴露时间为 20 min。该方法与平板计数法的检测结果一致, 可有效抑制死菌 DNA 的扩增。活菌数与 PMA-qPCR 扩增循环数为  $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^6$  CFU/mL 时呈现良好的线性关系( $R^2=0.99$ ), 建立的标准曲线方程( $y=-3.541x+44.11$ )可定量检测活菌数量。PMA-qPCR 法定量限为  $1 \times 10^2$  CFU/mL, 且结合富集的方式, 灵敏度可被提高  $1 \times 10^4$  倍。【结论】该研究建立的检测方法适用于 10 L 大体积饮用水中铜绿假单胞菌活菌的定量分析, 为后续深入研究提供了有效的技术手段。

**关键词** 铜绿假单胞菌 叠氮溴化丙锭(PMA) 荧光定量聚合酶链式反应(PCR) 活菌计数 饮用水

**中图分类号:** TU991 **文献标志码:** A **文章编号:** 1009-0177(2025)05-0206-10

**DOI:** 10.15890/j.cnki.jsjs.2025.05.023

## Quantitative Determination of *Pseudomonas aeruginosa* in Drinking Water by PMA-qPCR Method

ZHANG Ruiting, WANG Yuanyuan, XING Fangxiao, ZHANG Xiao, ZHANG Lan\*

(National Institute of Environmental Health, Chinese Center for Diseases Control and Prevention, National Key Laboratory of Intelligent Tracking and Forecasting for Infectious Diseases, Key Laboratory of Environment and Population Health, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China)

**Abstract** [Objective] To prevent waterborne disease outbreaks and ensure water quality safety, it is crucial to establish a rapid and accurate method for detecting active pathogenic bacteria in water. In view of the low bacterial content of domestic drinking water, enrichment concentration and propidium monoazide-real time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PMA-qPCR) method that suitable for the detection of *Pseudomonas aeruginosa* in large-volume drinking water is established. [Methods] The enrichment and concentration method was optimized by adjusting the vortex oscillation duration and calculating the spiked recovery rate.  $L_{16}(4^3)$  orthogonal array design was employed to optimize the PMA treatment conditions for effective removal of DNA from non-viable

[收稿日期] 2025-01-15

[基金项目] 国家重点研发计划(2022YFC3204702)

[作者简介] 张瑞婷(1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向为公共卫生, E-mail: zhangruiting2356@163.com。

[通信作者] 张岚(1969—), 女, 研究方向为饮用水健康及水质检测技术, E-mail: zhanglan@nieh.chinacdc.cn。

*Pseudomonas aeruginosa* cells, followed by experimental validation. [Results] After enriching *Pseudomonas aeruginosa* from 10 L of drinking water onto the membrane by membrane filtration, the bacteria on the membrane were eluted into 1 mL phosphate buffer solution (PBS) by vortex shaking (the rotational speed was 3 000 r/min, shaking for 15 min, repeated twice) and centrifugation (8 000 g, 10 minutes). The method was completed within 50 minutes and the recovery rate was  $80.95\% \pm 7.43\%$ . The optimal PMA treatment conditions for the PMA-qPCR method: PMA concentration was 30  $\mu\text{mol/L}$ , incubation time in the dark was 20 min, light exposure time was 20 minutes. The method was consistent with the detection result of the plate counting method, which could effectively inhibit the amplification of dead bacterial DNA. The linear relationship between the number of viable bacteria and the number of PMA-qPCR amplification cycles was good in the range of  $1 \times 10^2$  CFU/mL to  $1 \times 10^6$  CFU/mL ( $R^2 = 0.99$ ), and the standard curve equation ( $y = -3.541x + 44.11$ ) was established to quantitatively detect the number of viable bacteria. The limit of quantification of PMA-qPCR was  $1 \times 10^2$  CFU/mL, and the sensitivity could be improved  $1 \times 10^4$  fold by combining with enrichment method. [Conclusion] The assay established in this study is suitable for the quantitative analysis of *Pseudomonas aeruginosa* viable bacteria in 10 L large-volume drinking water, which provides an effective technical means for subsequent in-depth research.

**Keywords** *Pseudomonas aeruginosa* propidium monoazide (PMA) quantitative polymerase chain reaction (PCR) viable bacteria count drinking water

铜绿假单胞菌是一种革兰氏阴性的机会性致病菌,能够引起菌血症、肺炎、角膜炎、耳炎以及软组织、皮肤和尿路感染等<sup>[1]</sup>,是免疫抑制和慢性疾病患者患病和死亡的主要原因<sup>[2]</sup>。众多研究者<sup>[3-4]</sup>在生活饮用水中检测到铜绿假单胞菌,发现其可在水环境中生存繁殖。全球已发生多起由铜绿假单胞菌引起的水源性疾病暴发事件<sup>[5-6]</sup>。王雪玉等<sup>[7]</sup>统计了2005年—2022年27个国家的149例铜绿假单胞菌医院感染暴发事件,其中明确暴发源的78起事件中有35.9%与生活饮用水相关。2011年—2012年,北爱尔兰发生数起因水受污染引起的疫情,其中有4名早产儿因铜绿假单胞菌感染致死<sup>[8]</sup>。为有效预防与控制此类公共卫生问题,确保水质安全,开展水质监测至关重要。目前已有一些先进的检测方法,如培养法、免疫学检测法、基于核酸检测法等。培养法检测周期为2~3 d,耗时费力,且当铜绿假单胞菌受消毒剂等不利条件影响转化为活的非可培养状态(viable but non-culturable, VBNC)时,该方法会导致漏检,引发生物安全风险;常规免疫学方法及基于核酸的聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)法因无法区分细菌的生命状态,易造成假阳性结果。已有研究证明,叠氮溴化丙锭联合实时荧光定量聚合酶链反应(propidium monoazide-real time fluorescence quanti-tative polymerase chain reaction, PMA-qPCR)可有效消除由死亡细胞核酸引起的假阳性结果,且其高效快速、操作简便,已被广泛应用于水环境领域致病菌的检测<sup>[9-10]</sup>。Xie等<sup>[11]</sup>建立的PMA-qPCR方法适用于50 mL环境

水中铜绿假单胞菌的检测,但富集时间为6~8 h,检测体积小,耗时较长。检索文献<sup>[12-13]</sup>发现,已有的PMA-qPCR法多适用于纯菌液或体积为600  $\mu\text{L}$ ~2 L小体积废水或池塘水中活菌的检测。鉴于生活饮用水中细菌含量较低,为确保检测结果的准确性和可靠性,需要富集大体积水样以获得足够的核酸量<sup>[14]</sup>。但对于大体积水样中活菌检测,该方法的研究和应用相对较少。因此,开发一种适用于大体积水样中活菌检测的PMA-qPCR方法显得尤为迫切。

本研究旨探寻PMA对饮用水中铜绿假单胞菌处理的方案,以期利用PMA处理大体积饮用水中活/死菌的条件优化提供理论与方法依据,有助于提高水质监测的准确性,为健康风险评估提供更坚实的数据支撑,为制定更有效的公共卫生干预措施、减少水传播疾病的风险奠定基础。

## 1 试验材料和方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 菌种及培养条件

试验菌株:铜绿假单胞菌 ATCC27853 购买自宁波明舟生物科技有限公司,将菌种接种至假单胞菌琼脂基础培养基(CN琼脂)平板上37  $^{\circ}\text{C}$  24 h传代培养。

#### 1.1.2 试剂

PMAxx<sup>TM</sup>染料(40069),美国 Biotium 公司;铜绿假单胞菌核酸实时荧光PCR检测试剂盒,北京卓诚惠生生物科技股份有限公司;磁珠法环境微生物基因组DNA提取试剂盒(DP712-T7),北京天根生

化科技有限公司;无菌磷酸盐缓冲液(PBS)(浓度为 0.01 mol/L, pH 值为 7.2~7.4),北京索莱宝科技有限公司;假单胞菌琼脂培养基,北京陆桥技术有限公司;无菌硝酸纤维滤膜,GVS 北美公司。

### 1.1.3 仪器

650W 卤素灯,欧司朗;QantStudio 7 Flex 荧光定量 PCR 仪,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;TCL-16M 冷冻离心机,湖南湘仪;HFsafe1800LC 生物安全柜,上海力申;高压蒸汽灭菌器,生化培养箱,上海新苗医疗器械制造有限公司;TGuide S96 全自动核酸提取纯化仪,北京天根生化科技有限公司;BT600S 调速型智能蠕动泵,保定雷弗流体科技有限公司;142 mm 不锈钢过滤盘,美国 Millipore 公司;涡旋仪,上海析牛莱伯仪器有限公司。

## 1.2 细菌富集方法的建立

### 1.2.1 加标水样制备

打开水龙头,放水 5 min 后收集饮用水 10 L 至无菌采样桶中,每升水中加入 0.8 mg 硫代硫酸钠( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )以中和余氯<sup>[15]</sup>。用高压蒸汽灭菌器灭菌后,制备含有  $2.8 \times 10^8$  CFU 铜绿假单胞菌的加标水样。

### 1.2.2 水样富集方法建立

连接过滤装置,使用酒精棉球擦拭滤盘,放置直径为 142 mm、孔径为 0.20  $\mu\text{m}$  无菌硝酸纤维素膜,用蠕动泵以恒定速度(210 r/min)将空白水样或 1.2.1 制备的加标水样通过滤膜。将过滤后滤膜折叠剪成条状,置于预加有 45 mL PBS 的 50 mL 离心管中,采用涡旋振荡法洗脱细菌至 PBS 缓冲液中。为优化洗脱程序,分别设置 3 种洗脱方式。方式 A:“20 min+20 min”,即用涡旋仪(3 000 r/min)振荡 20 min,取出膜至新的 50 mL 离心管,加入 PBS 45 mL,继续振荡 20 min。方式 B:涡旋振荡时间为“15 min+15 min”,其他操作同方式 A。方式 C:涡旋振荡时间为“10 min+10 min”,其他操作同方式 A。最后将两管洗脱液合并,离心(8 000 g, 10 min)获得加标细菌<sup>[16]</sup>。弃去所有上清液,用 1 mL PBS 缓冲液重悬。空白水样作相同处理作为对照,每组设置 3 个重复,最后使用稀释涂布平板法对洗脱液中的铜绿假单胞菌进行培养计数<sup>[17]</sup>。

### 1.2.3 回收率测定

评估水样中细菌的回收率计算如式(1)。

$$\rho = \frac{C_r}{C_o} \times 100\% \quad (1)$$

其中: $\rho$ ——细菌回收率;

$C_o$ ——浓缩前添加至水样中的细菌数,CFU;

$C_r$ ——浓缩后的洗脱液中的细菌数,CFU。

## 1.3 PMA-qPCR 方法的建立

### 1.3.1 死菌菌液制备

用 PBS 缓冲液制备铜绿假单胞菌菌液,并稀释至  $1 \times 10^7$  CFU/mL。为制备死菌,将菌液在 100  $^{\circ}\text{C}$  水浴 20 min<sup>[18-19]</sup>,置于冰上冷却,吸取 100  $\mu\text{L}$  涂布于假单胞菌琼脂培养基平板上进行验证,37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24~48 h 后发现未有菌落长出。

### 1.3.2 加标死菌浓缩水样制备

为评估 PMA 处理富集浓缩水样的效果,用 1.2.2 中的富集方法浓缩水样基质,制备浓度为  $1 \times 10^6$  CFU/mL 的铜绿假单胞菌死菌浓缩水样。

### 1.3.3 正交试验设计

PMA 能够穿过破损的细胞质膜进入细胞内部与脱氧核糖核酸结合,在可见光(最大吸收峰为 460 nm)的作用下发生光解,产生氮烯,氮烯与 PMA 结合的 DNA 发生共价交联反应,进而抑制 DNA 的扩增。同时,这种交联作用可使 DNA 形成沉淀,并在细菌核酸的提取中同细胞碎片一起被除去<sup>[20]</sup>。设置适当的暗育时间可以使 PMA 与样品中死细胞及游离的核酸充分地结合;加入过量的 PMA 可充分抑制死细胞 DNA 扩增,同时剩余的 PMA 可通过加长光照时间,使其与水分子发生交联而失活,从而保证在 DNA 提取中活细胞被裂解后也不会与过剩的 PMA 反应。因此,本研究选取了 PMA 浓度、暗育时间、光照时间 3 个因素进行正交试验<sup>[21-22]</sup>,正交试验因素水平如表 1 所示,用 SPSSAU 在线软件生成 3 因素 4 水平正交试验设计表(表 2),共 16 组 PMA 处理组作为试验组,未用 PMA 处理的作为对照组,每组处理设置 3 个重复。

表 1 正交试验因素水平表  
Tab. 1 Table of Orthogonal Test Factor Levels

| 水平 | A:PMA 浓度 | B:暗育时间 | C:卤素灯照射时间 |
|----|----------|--------|-----------|
| 1  | 10       | 5      | 10        |
| 2  | 30       | 10     | 15        |
| 3  | 50       | 15     | 20        |
| 4  | 70       | 20     | 25        |

表 2 正交试验设计  
Tab. 2 Design of Orthogonal Experiment

| 试验号 | 各试验因素水平 |      |         |
|-----|---------|------|---------|
|     | PMA 浓度  | 培育时间 | 卤素灯照射时间 |
| 1   | 1       | 1    | 1       |
| 2   | 1       | 2    | 2       |
| 3   | 1       | 3    | 3       |
| 4   | 1       | 4    | 4       |
| 5   | 2       | 1    | 2       |
| 6   | 2       | 2    | 1       |
| 7   | 2       | 3    | 4       |
| 8   | 2       | 4    | 3       |
| 9   | 3       | 1    | 3       |
| 10  | 3       | 2    | 4       |
| 11  | 3       | 3    | 1       |
| 12  | 3       | 4    | 2       |
| 13  | 4       | 1    | 4       |
| 14  | 4       | 2    | 3       |
| 15  | 4       | 3    | 2       |
| 16  | 4       | 4    | 1       |

1.4 细菌基因组的提取和检测

本试验采用磁珠法环境微生物基因组 DNA 提取试剂盒 (DP712-T7) 提取基因组 DNA。利用铜绿假单胞菌荧光定量 PCR 反应检测试剂盒进行定量检测。

1.5 PMA-qPCR 方法的验证

1.5.1 PMA-qPCR 法检测加标活菌或死菌模拟浓缩水样

将铜绿假单胞菌制备为浓度分别约为  $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^2$ 、10 CFU/mL 的加标活菌模拟浓缩水样及加标死菌模拟浓缩水样,操作同 1.3.1、1.3.2 节。分别采用 qPCR 法、优化的 PMA-qPCR 法和平板计数法进行检测,每组设置 4 个重复。

1.5.2 PMA-qPCR 法检测加标活、死菌混合模拟浓缩水样

在模拟浓缩水样基质中,通过将活菌菌液和死

菌菌液以不同体积比混合,形成活/死菌混合体系。混合体系中的活菌所占比例为 0~100% (0、10%、30%、50%、70%和 100%)。分别采用 qPCR 法及优化的 PMA-qPCR 法进行检测,每组设置 3 个重复。

1.5.3 PMA-qPCR 法测定活菌数的标准曲线的建立

利用 1.5.1 制备的不同浓度梯度的加标活菌模拟浓缩水样的平板计数得到的菌落浓度 (菌落浓度的对数) 与对应的 PMA-qPCR 检测得到的阈值循环数 (cycle threshold, Ct 值) 建立线性关系,通过式 (2) 确定扩增效率。每组设置 3 个重复。

$$E = 10^{-1/K} - 1 \quad (2)$$

其中:  $E$ ——标准曲线扩增效率;

$K$ ——标准曲线的斜率。

1.6 数据分析与处理

使用 Microsoft Excel 2021、IBM SPSS Statistics 27 和 GraphPad prism 8、OriginPro 2021 对试验数据进行整理、 $t$  检验、方差比值 ( $F$ ) 检验分析和图形绘制。

2 结果和讨论

2.1 最佳振荡时间

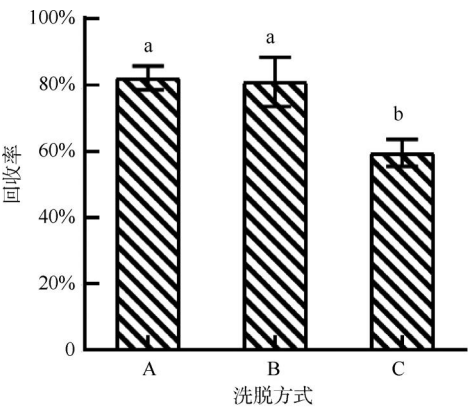
水中致病菌具有浓度低、分离培养困难等特点,往往需要富集后进行核酸提取<sup>[23]</sup>,所以本研究选择孔径为 0.2  $\mu\text{m}$  的滤膜对水中致病菌进行富集。而直接利用 PMA 处理滤膜,会因为滤膜的遮光作用降低 PMA 的处理效果<sup>[24]</sup>。因此,本研究在 PMA 处理样品前通过剧烈振荡来洗脱膜上的细菌<sup>[25]</sup>。振荡时间为 20~40 min,不同振荡时间下加标水样中细菌的回收率情况如表 3 所示,随着振荡时间的缩短,A、B、C 3 组加标试验组中洗脱液的细菌个数在逐渐减少。当振荡时间为 30 min 时,细菌的回收率为 80.95%,与振荡 20 min 的结果相比,具有统计学差异 ( $P < 0.05$ ),与振荡 40 min 的结果无统计学差异 ( $P > 0.05$ ) (图 1),所以确定最佳洗脱方式为方式 B,结合过滤及离心时间 (20 min),此方式可在

表 3 不同的振荡时间下细菌的回收率  
Tab. 3 Bacterial Recovery Rates under Different Vortex Shaking Time

| 洗脱方式 | 振荡时间/min | 加标菌种   | 洗脱液细菌个数/CFU ( $\bar{x} \pm s, n=3$ ) | 回收率 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ ) |
|------|----------|--------|--------------------------------------|------------------------------|
| A    | 20 + 20  | 铜绿假单胞菌 | $(2.30 \pm 0.10) \times 10^8$        | $82.14\% \pm 3.57\%$         |
| B    | 15 + 15  |        | $(2.27 \pm 0.21) \times 10^8$        | $80.95\% \pm 7.43\%$         |
| C    | 10 + 10  |        | $(1.67 \pm 0.21) \times 10^8$        | $59.52\% \pm 4.12\%$         |

注:  $\bar{x} \pm s$  表示平均值  $\pm$  标准差,  $n$  表示试验重复次数,下同。





注:误差线表示标准偏差,不同小写字母间表示差异显著( $P<0.05$ )。

图 1 不同振荡时间对细菌回收率的影响  
Fig. 1 Effect of Different Vortex Oscillation Time on Bacterial Recovery Rates

50 min 内从 10 L 水中回收超过 80% 的细菌并浓缩体积至 1 mL。

2.2 PMA 浓度、暗育时间、光照时间最佳组合试验

在对样品进行 PMA 处理时,应保证 PMA 对死菌 DNA 的充分抑制。因此,本研究基于正交试验,以 1.3.2 中制备的铜绿假单胞菌死菌浓缩加标水样为研究对象,将 PMA 处理组与未处理组 qPCR 检测结果阈值循环数差值( $\Delta C_t$  值)作为评估指标<sup>[26]</sup>,旨在确定能够抑制饮用水中铜绿假单胞菌死菌 DNA 扩增的最佳 PMA 条件,其中  $\Delta C_t$  值越大,PMA 对死菌 DNA 的处理效果越明显。计算均值和变异系数,结果如表 4 所示,试验变异系数低于 10%,试验数据可靠。采用极差分析法和方差分析法 2 种途径对正交试验的结果进行分析。

表 4 正交试验极差分析  
Tab. 4 Extreme Variance Analysis of Orthogonal Tests

| 项目     |       | 各试验因素水平   |         |         | 试验组 $C_t$    | 对照组 $C_t$    | $\Delta C_t$ 值 | 变异系数  |
|--------|-------|-----------|---------|---------|--------------|--------------|----------------|-------|
|        |       | A: PMA 浓度 | B: 暗育时间 | C: 光照时间 | 平均值( $n=3$ ) | 平均值( $n=3$ ) |                |       |
| 试验编号   | 1     | 1         | 1       | 1       | 32.68        | 20.01        | 12.86          | 4.18% |
|        | 2     | 1         | 2       | 2       | 33.79        |              | 13.78          | 1.73% |
|        | 3     | 1         | 3       | 3       | 33.97        |              | 14.12          | 1.01% |
|        | 4     | 1         | 4       | 4       | 33.55        |              | 13.99          | 2.93% |
|        | 5     | 2         | 1       | 2       | 32.79        |              | 12.80          | 0.57% |
|        | 6     | 2         | 2       | 1       | 33.30        |              | 13.14          | 7.86% |
|        | 7     | 2         | 3       | 4       | 34.19        |              | 14.20          | 5.51% |
|        | 8     | 2         | 4       | 3       | 36.03        |              | 16.01          | 1.28% |
|        | 9     | 3         | 1       | 3       | 34.02        |              | 13.96          | 1.46% |
|        | 10    | 3         | 2       | 4       | 34.26        |              | 14.25          | 3.39% |
|        | 11    | 3         | 3       | 1       | 32.29        |              | 12.36          | 0.65% |
|        | 12    | 3         | 4       | 2       | 32.61        |              | 12.42          | 6.44% |
|        | 13    | 4         | 1       | 4       | 33.99        |              | 13.72          | 9.50% |
|        | 14    | 4         | 2       | 3       | 33.98        |              | 14.12          | 1.54% |
|        | 15    | 4         | 3       | 2       | 34.29        |              | 14.35          | 2.58% |
|        | 16    | 4         | 4       | 1       | 33.64        |              | 13.47          | 4.59% |
| 试验结果和  | $K_1$ | 54.74     | 53.34   | 51.83   | —            | —            | —              | —     |
|        | $K_2$ | 56.16     | 55.29   | 53.36   | —            | —            | —              | —     |
|        | $K_3$ | 52.99     | 55.03   | 58.20   | —            | —            | —              | —     |
|        | $K_4$ | 55.66     | 55.89   | 56.16   | —            | —            | —              | —     |
| 试验结果均值 | $k_1$ | 13.69     | 13.34   | 12.96   | —            | —            | —              | —     |
|        | $k_2$ | 14.04     | 13.82   | 13.34   | —            | —            | —              | —     |
|        | $k_3$ | 13.25     | 13.76   | 14.55   | —            | —            | —              | —     |
|        | $k_4$ | 13.92     | 13.97   | 14.04   | —            | —            | —              | —     |
| 极差     | $R$   | 0.79      | 0.64    | 1.59    | —            | —            | —              | —     |

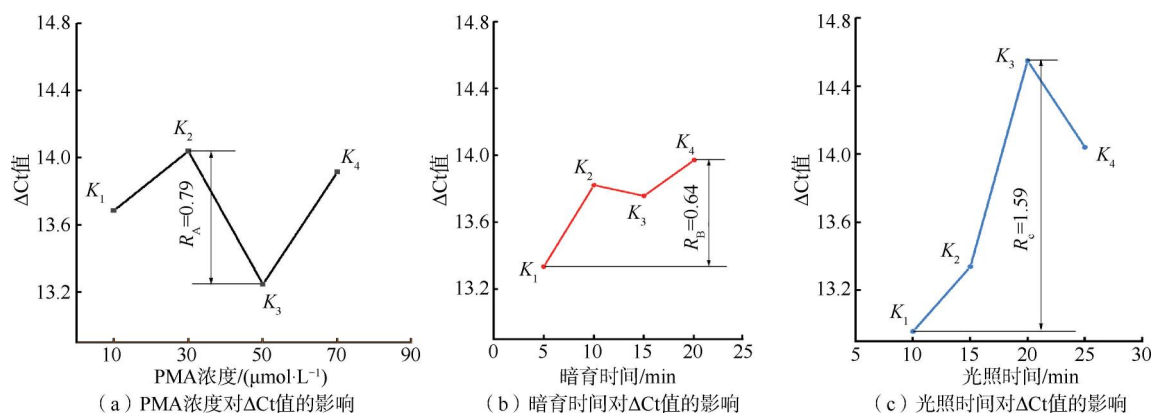


图 2 各因素对  $\Delta Ct$  值的影响  
Fig. 2 Effect of Various Factors on  $\Delta Ct$  Values

2.2.1 正交试验对  $\Delta Ct$  值的极差分析

正交试验的极差分析可用于研究不同因素间的主次作用和因素间不同水平的优势<sup>[27-28]</sup>,若同一因素同一水平下所有试验结果的和为  $K_i$ ,均值为  $k_i$  ( $i$  代表水平数),同一因素不同水平下的极差为  $R$ , $R$  反映各因素水平变化对试验指标的影响程度, $R$  值越大代表该因素对指标的影响越显著。各因素  $R$  值的变化情况如图 2 所示。

由极差  $R$  值的分析结果可知,3 个因素对饮用水中活菌检测影响的主要顺序为  $R_C > R_A > R_B$ ,光照时间对 PMA-qPCR 检测水中死菌的影响最大,在 10~25 min 时, $\Delta Ct$  值先增大后减小,在 20 min 时  $\Delta Ct$  值达到最大。PMA 浓度为 10~70  $\mu\text{mol/L}$  时, $\Delta Ct$  值呈现波动性,没有明显的上升或下降趋势,当浓度为 30  $\mu\text{mol/L}$  时处理效果最佳;相比之下,暗育时间影响最小,当暗育时间为 20 min 时, $\Delta Ct$  值最大,为 5~20 min,随着暗育时间的延长, $\Delta Ct$  值整体呈上升趋势。

2.2.2 正交试验对  $\Delta Ct$  值的方差分析

本研究通过 SPSS 中无交互作用的多因素单变量模型进行分析(表 5)。3 个因素按重要性排序  $C > B > A$ ,光照时间显著地影响了  $\Delta Ct$  值( $P < 0.05$ )。

在浓度为 10~70  $\mu\text{mol/L}$  时,PMA 对  $\Delta Ct$  值的影响随浓度的变化不显著( $P > 0.05$ ),即当 PMA 浓度达到 10  $\mu\text{mol/L}$  时,PMA 可有效抑制死菌核酸的扩增,这与 Gensberger 等<sup>[12]</sup>利用 PMA-qPCR 方法检测饮用水中大肠埃希氏菌、肠球菌时所用 PMA 浓度一致。在暗处孵育时间为 5~20 min 时,PMA 对  $\Delta Ct$  值的影响随暗育时间无显著性变化( $P > 0.05$ )。黑暗环境下孵育振荡目的是使 PMA 充分穿过受损的细胞膜,与膜内的 DNA 结合,与 Santiago 等<sup>[29]</sup>PMA 处理饮用水中的幽门螺旋杆菌方法中所用的暗育时间一致。基于上述分析,为充分抑制死菌 DNA 的扩增,选择最优的组合方式为  $A_2B_4C_3$  组合(PMA 浓度为 30  $\mu\text{mol/L}$ 、暗育时间为 20 min、光照时间为 20 min), $\Delta Ct$  值为 16.01,即最有利于抑制死菌 DNA 的扩增,这与李聪聪等<sup>[30]</sup>的研究中 PMA 对死菌的最大抑制作用结果一致。值得注意的是,PCR 的荧光信号并没有随着三因素组合方式的改变而完全消失,因多种因素如细菌浓度和特性、光照波长、qPCR 引物特性、扩增 DNA 长度等<sup>[31]</sup>限制了 PMA 对死菌 DNA 的抑制功效,PMA 不可能完全去除死菌 DNA<sup>[32]</sup>。因此,为更好地区分死菌和活菌,将  $Ct$  值  $> 36$  判定为阴性结果。

表 5 正交试验方差分析  
Tab. 5 Analysis of Variance for Orthogonal Tests

| 方差来源                                           | 平方和(SS)   | 自由度(DF) | 均方(MS) | $F$    | $P$           |
|------------------------------------------------|-----------|---------|--------|--------|---------------|
| A: PMA 浓度/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$ | 1.472     | 3       | 0.491  | 0.955  | 0.424         |
| B: 暗育时间/min                                    | 4.113     | 3       | 1.371  | 2.668  | 0.061         |
| C: 光照时间/min                                    | 16.229    | 3       | 5.410  | 10.526 | $< 0.001^{①}$ |
| 误差                                             | 19.530    | 38      | —      | —      | —             |
| 总计                                             | 9 196.850 | 48      | —      | —      | —             |

注: $< 0.001^{①}$ 表示差异显著( $P < 0.05$ )。

## 2.3 PMA-qPCR 方法的验证

### 2.3.1 PMA-qPCR 法检测不同浓度加标模拟浓缩水样

利用 PMA-qPCR 法检测活菌,要保证去除环境中死菌 DNA 的干扰,避免出现“假阳性”结果;同时当 PMA 浓度过高或者光照不能使过剩的 PMA 完全钝化时,PMA 则会与活菌 DNA 结合,出现“假阴性”的结果<sup>[30]</sup>。因此,设置不同浓度梯度的死菌模拟水

样与活菌模拟水样来验证所建立的 PMA-qPCR 方法的适用性。结果如表 6 所示,通过  $t$  检验比较 PMA-qPCR 与 qPCR 2 种方法检测活菌模拟样本的结果无显著性差异 ( $P>0.05$ ),即此方法对活菌的 DNA 扩增无影响。当模拟水样中死菌浓度为  $10\sim 1\times 10^6$  CFU/mL 时,PMA-qPCR 与平板计数的检测结果一致(表 7),而常规 qPCR 法均能检测到铜绿假单胞菌的存在,不能区分死、活菌。

表 6 qPCR、PMA-qPCR 法检测浓缩水样中活菌  
Tab. 6 qPCR, PMA-qPCR for Detection of Live Bacteria in Concentrated Water Samples

| 活菌模拟水样浓度/<br>(CFU·mL <sup>-1</sup> ) | 平板计数法/<br>(CFU·mL <sup>-1</sup> ) ( $n=4$ ) | qPCR (Ct 值)<br>( $\bar{x}\pm s, n=4$ ) | PMA-qPCR (Ct 值)<br>( $\bar{x}\pm s, n=4$ ) | $t$ 检验 |       |
|--------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------------|--------|-------|
|                                      |                                             |                                        |                                            | $t$    | $p$   |
| $1\times 10^1$                       | 25                                          | 36.86±0.49                             | 37.65±0.78                                 | -1.655 | >0.05 |
| $1\times 10^2$                       | $2.5\times 10^2$                            | 35.65±0.25                             | 35.67±0.56                                 | -0.071 | >0.05 |
| $1\times 10^3$                       | $2.5\times 10^3$                            | 32.26±0.42                             | 31.69±0.58                                 | 1.597  | >0.05 |
| $1\times 10^4$                       | $2.5\times 10^4$                            | 28.92±0.40                             | 28.88±0.27                                 | 0.165  | >0.05 |
| $1\times 10^5$                       | $2.5\times 10^5$                            | 25.27±0.39                             | 25.23±0.56                                 | 0.122  | >0.05 |
| $1\times 10^6$                       | $2.5\times 10^6$                            | 21.43±0.45                             | 21.19±0.19                                 | 1.041  | >0.05 |

表 7 qPCR、PMA-qPCR、平板计数法检测浓缩水样中的死菌  
Tab. 7 qPCR, PMA-qPCR, and Plate Counting Methods for Detection of Dead Bacteria in Concentrated Water Samples

| 死菌模拟<br>水样浓度/<br>(CFU·mL <sup>-1</sup> ) | qPCR<br>(Ct 值)<br>( $\bar{x}\pm s, n=4$ ) | PMA-qPCR<br>(Ct 值)<br>( $n=4$ ) | 平板计数法/<br>(CFU·mL <sup>-1</sup> )<br>( $n=4$ ) |
|------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------------------|
| $1\times 10^1$                           | 37.40±0.22                                | UD                              | 0                                              |
| $1\times 10^2$                           | 35.75±0.54                                | UD                              | 0                                              |
| $1\times 10^3$                           | 34.11±0.22                                | UD                              | 0                                              |
| $1\times 10^4$                           | 32.40±0.14                                | UD                              | 0                                              |
| $1\times 10^5$                           | 26.85±0.75                                | UD                              | 0                                              |
| $1\times 10^6$                           | 22.10±0.52                                | UD                              | 0                                              |

注:UD 表示未检出。

### 2.3.2 PMA-qPCR 方法对活/死菌混合体系中活菌的鉴别

将  $1\times 10^6$  CFU/mL 的死菌与活菌以不同体积比混合进行 PMA-qPCR 检测,并以未经 PMA 处理的样品(qPCR 组)作为对照,各组的试验数据结果如表 8 所示。如图 3 所示,当活菌所占比例为 0 时,PMA-qPCR 组未检出(Ct 值>36)。随着活菌比例的增加,PMA-qPCR 组 Ct 值逐渐下降,但始终高于 qPCR 组 Ct 值。当活菌所占比例为 100%时,PMA-qPCR 组与 qPCR 组 Ct 值差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ),这表明无论是否存在死菌,PMA-qPCR 都能

表 8 qPCR、PMA-qPCR 检测不同比例的活菌、死菌混合水样

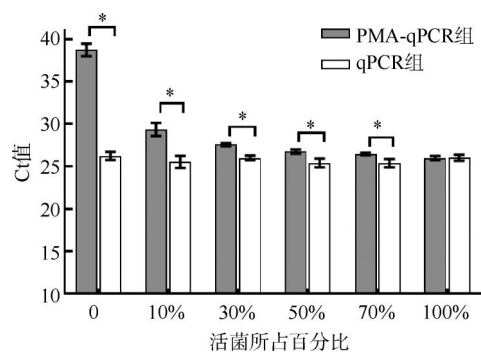
Tab. 8 qPCR, PMA-qPCR for Detection of Different Proportions of Live and Dead Bacteria in Mixed Water Samples

| 活菌所占百分比 | PMA-qPCR (Ct 值)<br>( $\bar{x}\pm s, n=3$ ) | qPCR (Ct 值)<br>( $\bar{x}\pm s, n=3$ ) |
|---------|--------------------------------------------|----------------------------------------|
| 0       | 38.70±0.74                                 | 26.23±0.49                             |
| 10%     | 29.36±0.78                                 | 25.53±0.69                             |
| 30%     | 27.57±0.16                                 | 25.99±0.27                             |
| 50%     | 26.75±0.25                                 | 25.41±0.51                             |
| 70%     | 26.46±0.16                                 | 25.38±0.47                             |
| 100%    | 25.96±0.25                                 | 26.03±0.39                             |

准确检测活菌。

### 2.3.3 PMA-qPCR 法测定活菌数的标准曲线的建立

本研究利用 PMA-qPCR 法建立了测定活菌数的标准曲线,将加标活菌模拟水样浓度调至  $2.5\times 10^6$  CFU/mL,进行 10 倍梯度稀释,使浓度依次为  $2.5\times 10^5$ 、 $2.5\times 10^4$ 、 $2.5\times 10^3$ 、 $2.5\times 10^2$  CFU/mL,分别进行 PMA-qPCR 检测。结果以活菌浓度的对数为  $x$  轴,相应的 Ct 值为  $y$  轴,对活菌浓度进行定量。如图 4 所示,当活菌浓度为  $2.5\times 10^2\sim 2.5\times 10^6$  CFU/mL 时,PMA-qPCR 标准曲线表现出很强的线性相关性 ( $R^2=0.990\ 1$ ),扩增效率  $E$  为 91.6%,



注:误差线表示标准偏差,\*表示  $P < 0.05$  差异性显著。

图3 PMA-qPCR 与 qPCR 方法检测不同比例死、活菌混合物

Fig. 3 Detection for Mixture of Dead and Live Bacteria in Different Proportion with qPCR PMA-qPCR Methods

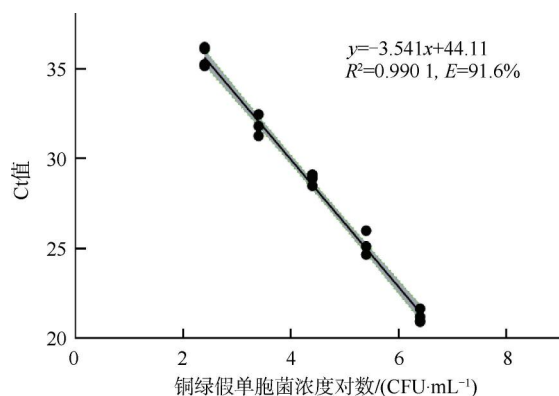


图4 PMA-qPCR 检测铜绿假单胞菌的标准曲线

Fig. 4 Standard Curve for *Pseudomonas Aeruginosa* Detection by PMA-qPCR

PCR 反应效率良好<sup>[33]</sup>。其关系式为  $y = -3.541x + 44.11$ 。该方法的定量检测值为  $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^6$  CFU/mL。综上,此方法可应用于饮用水中的铜绿假单胞菌定量。

### 3 结论

本文建立了一种膜过滤富集方法,该方法可以将 10 L 饮用水铜绿假单胞菌富集至 1 mL PBS 缓冲液中,回收率超过 80%。并利用正交试验设计不同 PMA 处理条件的组合方式,最终确定了抑制死菌 DNA 扩增的最佳条件,即 PMA 浓度为 30  $\mu\text{mol/L}$ 、黑暗中孵育时间为 20 min、光暴露时间为 20 min。该 PMA-qPCR 方法在复杂的饮用水环境基质中不仅有效地去除了死菌对铜绿假单胞菌活菌检测的干扰,而且不会影响活菌 DNA 的扩增,可在死菌存在下实现对活菌的定量检测。通过 PMA-qPCR 方法

检测不同浓度梯度的铜绿假单胞菌活菌建立标准曲线  $y = -3.541x + 44.11$ ,获得定量限为  $1 \times 10^2$  CFU/mL,且结合膜过滤富集的方式,该方法的灵敏度可提高  $1 \times 10^4$  倍,可应用于大体积饮用水中铜绿假单胞菌活菌的定量检测。

### 参考文献

- [1] GELLATLY S L, HANCOCK R E. *Pseudomonas aeruginosa*: New insights into pathogenesis and host defenses [J]. Pathogens and Disease, 2013, 67(3): 159-173.
- [2] DIGGLE S P, WHITELEY M J M. Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: Opportunistic pathogen and lab rat [J]. Microbiology, 2020, 166(1): 30-33.
- [3] HAJJARTABAR M. *Pseudomonas aeruginosa* isolated from otitis externa associated with recreational waters in some public swimming pools in Tehran [J]. Archives of Clinical Infectious Diseases, 2010, 5(3): 142-151.
- [4] MENA K D, GERBA C P. Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water [J]. Reviews of environmental contamination and toxicology, 2009, 201: 71-115. DOI: 10.1007/978-1-4419-0032-6\_3.
- [5] YIEK W K, COENEN O, NILLESEN M, et al. Outbreaks of healthcare-associated infections linked to water-containing hospital equipment: A literature review [J]. Antimicrobial Resistance & Infection Control, 2021, 10: 1-19. DOI: 10.1186/s13756-021-00935-6.
- [6] PERKINS K M, REDDY S C, FAGAN R, et al. Investigation of healthcare infection risks from water-related organisms; Summary of CDC consultations, 2014-2017 [J]. Infection Control & Hospital Epidemiology, 2019, 40(6): 621-626.
- [7] 王雪玉,田芳英,赵明. 全球铜绿假单胞菌医院感染暴发事件的流行特征与应对策略 [J]. 中国感染控制杂志, 2022, 21(12): 1171-1178.  
WANG X Y, TIAN F Y, ZHAO M. Epidemic characteristics and preventive strategies of worldwide outbreak of healthcare-associated infection caused by *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Chinese Journal of Infection Control, 2022, 21(12): 1171-1178.
- [8] WALKER J, JHUTTY A, PARKS S, et al. Investigation of healthcare-acquired infections associated with *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in taps in neonatal units in Northern Ireland [J]. Journal of Hospital Infection, 2014, 86(1): 16-23.
- [9] SCARIOT M C, VENTURELLI G L, PRUDÊNCIO E S, et al. Quantification of *Lactobacillus paracasei* viable cells in probiotic yoghurt by propidium monoazide combined with quantitative PCR [J]. International journal of food microbiology, 2018, 264: 1-7. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.021.
- [10] XIE G, HU L, LIU R, et al. Quantitative detection of viable



- Escherichia coli* O157: H7 using a photoreactive DNA-binding dye propidium monoazide in irrigation water [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2019, 151: 107354. DOI: 10.1016/j.bej.2019.107354.
- [11] XIE G, YU S, LI W, et al. Simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, and *Escherichia coli* O157: H7 in environmental water using PMA combined with mPCR [J]. *Journal of Microbiology*, 2020, 58: 668–674. DOI: 10.1007/s12275-020-0084-6.
- [12] GENSBERGER E T, POLT M, KONRAD-KÖSZLER M, et al. Evaluation of quantitative PCR combined with PMA treatment for molecular assessment of microbial water quality [J]. *Water Research*, 2014, 67: 367–376. DOI: 10.1016/j.watres.2014.09.022.
- [13] HUNTER M E, FERRANTE J A, MEIGS-FRIEND G, et al. Improving eDNA yield and inhibitor reduction through increased water volumes and multi-filter isolation techniques [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 5259–5259. DOI: 10.1038/s41598-019-40977-w.
- [14] CHIAO T H, CLANCY T M, PINTO A, et al. Differential resistance of drinking water bacterial populations to monochloramine disinfection [J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(7): 4038–4047.
- [15] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 生活饮用水标准检验方法 第2部分: 水样的采集与保存: GB/T 5750.2—2023[S]. 北京: 中国标准出版社, 2023.
- State Administration for Market Regulation, Standardization Administration of China. Standard examination methods for drinking water—Part 2: Collection and preservation of water samples: GB/T 5750.2—2023[S]. Beijing: Standards Press of China, 2023.
- [16] SALAM K W, EL-FADEL M, BARBOUR E K, et al. A propidium monoazide-quantitative PCR method for the detection and quantification of viable *Enterococcus faecalis* in large-volume samples of marine waters [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98: 8707–8718. DOI: 10.1007/s00253-014-6023-x.
- [17] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 生活饮用水标准检验方法 第12部分: 微生物指标: GB/T 5750.12—2023[S]. 北京: 中国标准出版社, 2023.
- Ministry of Ecology and Environment of the People's Republic of China, State Administration for Market Regulation. Standard examination methods for drinking water—Part 12: Microbiological parameters: GB/T 5750.12—2023[S]. Beijing: Standards Press of China, 2023.
- [18] BONETTA S, PIGNATA C, BONETTA S, et al. Viability of *Legionella pneumophila* in water samples: A comparison of propidium monoazide (PMA) treatment on membrane filters and in liquid [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2017, 14(5): 467. DOI: 10.3390/ijerph14050467.
- [19] GUO J, FAN F, WANG W, et al. Development of PMA-qPCR assay to accurately and reproducibly quantify viable bacteria of *Paenibacillus polymyxa* [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2023, 76(11): ova127. DOI: 10.1093/lambio/ova127.
- [20] NOCKER A, CAMPER A K. Novel approaches toward preferential detection of viable cells using nucleic acid amplification techniques [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 291(2): 137–142.
- [21] LI D, TONG T, ZENG S, et al. Quantification of viable bacteria in wastewater treatment plants by using propidium monoazide combined with quantitative PCR (PMA-qPCR) [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2014, 26(2): 299–306.
- [22] DESNEUX J, CHEMALY M, POURCHER A M. Experimental design for the optimization of propidium monoazide treatment to quantify viable and non-viable bacteria in piggy effluents [J]. *BMC Microbiology*, 2015, 15: 1–9. DOI: 10.1186/s12866-015-0505-6.
- [23] 吴妍, 张晓, 张良, 等. 水源性致病微生物检测中水样前处理方法研究进展 [J]. *净水技术*, 2023, 42(11): 8–17.
- WU Y, ZHANG X, ZHANG L, et al. Research progress on pretreatment methods for water samples in determination of waterborne pathogenic microorganisms [J]. *Water Purification Technology*, 2023, 42(11): 8–17.
- [24] VARMA M, FIELD R, STINSON M, et al. Quantitative real-time PCR analysis of total and propidium monoazide-resistant fecal indicator bacteria in wastewater [J]. *Water Research*, 2009, 43(19): 4790–4801.
- [25] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 循环冷却水中军团菌的检测: GB/T 40392—2021[S]. 北京: 中国标准出版社, 2022.
- State Administration for Market Regulation, National Standardization Administration. Detection of *Legionella* in circulating cooling water: GB/T 40392—2021[S]. Beijing: Standards Press of China, 2022.
- [26] ZHU R G, LI T P, JIA Y F, et al. Quantitative study of viable *Vibrio parahaemolyticus* cells in raw seafood using propidium monoazide in combination with quantitative PCR [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2012, 90(3): 262–266.
- [27] 潘义宏, 蔡宪杰, 邓涛, 等. 多栽培因素与土壤养分对‘云烟105’含梗率影响关联分析 [J]. *农学学报*, 2023, 13(9): 31–37.
- PAN Y H, CAI X J, DENG T, et al. Effects of multiple cultivation factors and soil nutrients on tobacco stem ratio of ‘Yunyan 105’: A correlation analysis [J]. *Journal of Agriculture*, 2023, 13(9): 31–37.
- [28] 杨建豪, 张育维, 傅国海, 等. Mehlich 3 浸提土壤养分的影响因素研究 [J]. *中国无机分析化学*, 2023, 13(5): 475–

483.  
YANG J H, ZHANG Y W, FU G H, et al. Study on influencing factors of soil nutrient content by Mehlich 3 leaching [J]. Chinese Journal of Inorganic Analytical Chemistry, 2023, 13 (5): 475–483.
- [29] SANTIAGO P, MORENO Y, FERRÚS M A J H. Identification of viable *Helicobacter pylori* in drinking water supplies by cultural and molecular techniques [J]. Helicobacter, 2015, 20 (4): 252–259.
- [30] 李聪聪, 余以刚, 邱杨, 等. PMA-qPCR 方法快速检测活性 *E. coli* O157:H7 [J]. 食品科学, 2012, 33 (22): 217–220.  
LI C C, YU Y G, QIU Y, et al. Rapid detection of live *E. coli* O157:H7 by PMA-qPCR method [J]. Food Science, 2012, 33 (22): 217–220.
- [31] HOLM W V, GHESQUIÈRE J, BOON N, et al. A viability quantitative PCR dilemma: Are longer amplicons better? [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2021, 87 (5): e0265320. DOI: 10.1128/aem.02653-20.
- [32] CODONY F, DINH-THANH M, AGUSTÍ G. Key factors for removing bias in viability PCR-based methods: A review [J]. Current Microbiology, 2020, 77 (4): 682–687.
- [33] LI H, XIN H, LI S F. Multiplex PMA-qPCR assay with internal amplification control for simultaneous detection of Viable *Legionella pneumophila*, *Salmonella typhimurium*, and *Staphylococcus aureus* in environmental waters [J]. Environmental Science & Technology, 2015, 49 (24): 14249–14256.

(上接第 137 页)

- [9] QILIN L, MENACHEM E. Organic fouling and chemical cleaning of nanofiltration membranes: Measurements and mechanisms [J]. Environmental Science & Technology, 2004, 38 (17): 4683–4693.
- [10] 孙剑宇. 膜生物反应器城市污水处理工艺优化运行与节能降耗研究 [D]. 北京: 清华大学, 2016.  
SUN J Y. Energy saving and operation optimization of membrane bioreactors for municipal wastewater treatment [D]. Beijing: Tsinghua University, 2016.
- [11] WANG Z W, MA J X, TANG C Y, et al. Membrane cleaning in membrane bioreactors: A review [J]. Journal of Membrane Science, 2014, 468: 276–307.
- [12] 马旭蛟. A/O/A-MBR 工艺处理低 C/N 污水与膜污染初步研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2021.  
MA X J. The Preliminary study on low C/N wastewater treatment and membrane fouling of A/O/A-MBR process [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2021.