

# 二氧化氯对水中隐孢子虫卵囊的杀灭特性

吴明松<sup>1</sup>, 张玉玲<sup>1,2</sup>, 黄君礼<sup>1</sup>, 李绍峰<sup>3</sup>, 崔崇威<sup>1</sup>, 田禹<sup>1</sup>

(1. 哈尔滨工业大学 城市水资源与水环境国家重点实验室, 哈尔滨 150090, wumingsong@163.com; 2. 华北电力大学 环境科学与工程学院, 河北 保定 071003; 3. 深圳职业技术学院 建筑与环境工程学院, 广东 深圳 518055)

**摘要:** 为扩展二氧化氯在饮用水安全中的应用, 应用荧光活性染色的检活手段研究了二氧化氯投量、反应时间、温度及 pH 对安氏隐孢子虫卵囊杀灭效果的影响, 并通过扫描电镜观察方法比较了杀灭前后卵囊的形态变化. 结果表明: 在 1.5 mg/L 和 2.5 mg/L 的投量下作用 60 min 时, 杀灭率分别达 90% 和 100%. 温度越高杀灭效果越好, 当温度从 5 °C 升至 30 °C 时, 2 mg/L ClO<sub>2</sub> 投量下卵囊的杀灭率从 54% 提高到 70%; pH 值对杀灭效果影响不大. 二氧化氯对于隐孢子虫卵囊有很强的穿透性, 杀灭后卵囊形态并未受到严重破坏. 二氧化氯可在常规饮用水条件下有效地杀灭隐孢子虫卵囊, 从而为工程应用提供理论依据.

**关键词:** 二氧化氯; 饮用水消毒; 隐孢子虫卵囊; 杀灭特性

中图分类号: TU993.1 文献标志码: A 文章编号: 0367-6234(2010)08-1242-04

## Characteristics of chlorine dioxide eliminating *Cryptosporidium oocyst* in water

WU Ming-song<sup>1</sup>, ZHANG Yu-ling<sup>1,2</sup>, HUANG Jun-li<sup>1</sup>, LI Shao-feng<sup>3</sup>, CUI Chong-wei<sup>1</sup>, TIAN Yu<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China, wumingsong@163.com; 2. College of Environmental Science and Engineering, North China Electric Power University, Baoding 071003, China; 3. Department of Architecture Engineering, Shenzhen Polytechnic Institute, Shenzhen 518055, China)

**Abstract:** In order to extend the application of ClO<sub>2</sub> in drinking water safety, the influences of ClO<sub>2</sub> dosage, contact time, temperature and pH value on the killing effect of oocyst were investigated using fluorescent staining vital assessing method. SEM was used to study the changes of oocyst shaped in the sterilization process. The results show that the killing rate can reach 90% and 100% at the ClO<sub>2</sub> dosages of 1.5 and 2.5 mg/L respectively when the contact time is 60 min. Higher killing rate can be obtained at higher temperature. The killing rate can increase from 54% to 70% when the temperature is raised from 5 °C to 30 °C. The effect of pH value is not obvious. By comparing the SEM photos before and after sterilization, it can be found that ClO<sub>2</sub> has great penetrability and does not destroy the oocyst surface but transforms the supporting structure. All the results indicate that ClO<sub>2</sub> can be used to control *Cryptosporidium oocyst* in drinking water treatment and they provide a theoretical foundation for the engineering application.

**Key words:** chlorine dioxide; drinking water disinfection; *Cryptosporidium oocyst*; eliminating characteristics

因隐孢子虫污染生活饮用水而导致隐孢子虫病的暴发在英美等发达国家流行日趋严重, 已对

公众的健康构成了严重威胁, 成为倍受关注的介水传播生物危险因素之一<sup>[1]</sup>. 1986年, 世界卫生组织(WHO)将人的隐孢子虫病列为艾滋病(AIDS)的怀疑指标之一, 2006年又被WTO列入“被忽视疾病计划”名单<sup>[2]</sup>. 在我国新颁布的《生活饮用水卫生标准》<sup>[3]</sup>中, 已经将隐孢子虫作为水质非常规指标而规定了其限值, 这也正说明了我国已经开始重视水中的隐孢子虫问题. 但是根

收稿日期: 2009-08-30.

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(2006AA06Z309).

作者简介: 吴明松(1982—), 男, 博士研究生;

黄君礼(1938—), 男, 教授, 博士生导师;

崔崇威(1963—), 男, 教授, 博士生导师;

田禹(1968—), 女, 教授, 博士生导师.

据目前我国的饮用水处理工艺及水源水质和供水水质现状来看,存在隐孢子虫感染暴发的潜在威胁,因此研究隐孢子虫的杀灭具有很重要的现实意义.隐孢子虫在自然环境中主要以隐孢子虫卵囊(*Cryptosporidium oocyst*)的形式存在<sup>[4]</sup>,在环境水体中分布广泛<sup>[5-7]</sup>,对外环境的抵抗力很强,具有很强的抗氯性<sup>[8]</sup>.二氧化氯( $\text{ClO}_2$ )由于其具有广谱高效,不生成氯仿等有机卤代物等优良特性,已替代液氯作为饮用水消毒剂在很多国家应用多年<sup>[9]</sup>.目前,关于 $\text{ClO}_2$ 杀灭隐孢子虫卵囊的研究报道并不多,多数研究所使用的样品含量较高<sup>[10-12]</sup>,对环境因素的影响考察较少,结果应用性不强.本文配制较低隐孢子虫卵囊含量的水样,研究 $\text{ClO}_2$ 的杀灭效果、pH值和温度对杀灭效果的影响以及杀灭后卵囊的形态变化,从而为实际工程提供参考.

## 1 试验

### 1.1 材料

安氏隐孢子虫卵囊,吉林大学畜牧兽医学院提供,悬浮于质量分数2.5%重铬酸钾溶液低温避光保存.

二氧化氯储备液,采用文献[13]中的方法配制,用连续碘量法标定<sup>[14]</sup>其质量浓度为160 mg/L.

PI(碘化丙啶)、D-hanks溶液(不含钙镁,含酚红,规格500 mL):美国Sigma公司产品;DAPI(4,6-二脒基-2-苯基吡啶):德国Roche公司产品.PI和DAPI均配制成1 g/L溶液.磷酸盐缓冲溶液(PBS)溶液采用文献[15]中的方法配制.实验所需的其他药剂均为分析纯,所用水为蒸馏水.

### 1.2 杀灭试验

取出适量保存于2.5%的重铬酸钾溶液中的隐孢子虫卵囊悬浮溶液,于3 000 r/min下离心洗去重铬酸钾,将离心获得的沉积物用PBS溶液稀释至活体卵囊含量( $C_{A0}$ )为50个/mL.取1 mL上述洗好的隐孢子虫卵囊悬浮溶液于1.5 mL离心管中,调节pH值、反应温度等因素,然后向离心管中加入所需量的 $\text{ClO}_2$ 储备液,进行杀灭试验(每个试验均做2个平行样),到达一定反应时间后,加入过量 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液中中止反应,在Olympus BX51显微镜下用荧光染色法镜检计数并计算其杀灭率.

### 1.3 隐孢子虫卵囊的活性检测方法

将卵囊水样在3 000 r/min下离心10 min浓缩至100  $\mu\text{L}$ ,依次加入5  $\mu\text{L}$  DAPI和PI溶液进行

染色.在37  $^{\circ}\text{C}$ 下培养2 h后用PBS清洗2次,离心浓缩至20  $\mu\text{L}$ 采用荧光染色法<sup>[16]</sup>进行活性检测与计数.将卵囊悬浮液滴在血细胞计数板上,在500 nm、350 nm激发光下和正常明视野观察染色效果.在350 nm下不发出红色荧光且孢子核在500 nm激发光下发出天蓝色荧光的卵囊,才被认为是活性卵囊;杀灭前、后水中活性卵囊含量(个/mL)分别记为 $C_{A0}$ 和 $C_{A0}'$ ,杀灭率可由下式计算:

$$\text{杀灭率} = [(C_{A0} - C_{A0}') / C_{A0}] \times 100\%$$

### 1.4 $\text{ClO}_2$ 灭活隐孢子虫卵囊超微结构的观察

将制备好的活性隐孢子虫卵囊投入0.5 mL质量浓度为10 mg/L的 $\text{ClO}_2$ 溶液中反应120 min.将反应前后的卵囊样品置于1.5 mL离心管中,加入1 mL体积分数为2%的戊二醛溶液静置固定30 min,然后用0.1 mol/L、pH = 7.0磷酸缓冲液清洗3次,每次10 min.再分别用50%、70%、80%、90%、95%和100%的乙醇依次脱水,每次5 min.之后再用1:1的100%酒精与醋酸异戊酯混合液置换10 min,纯醋酸异戊酯置换10 min.最后将样品置于样品篮内临界点干燥.用导电胶将干燥后的样品粘贴到样品台上,用离子溅射仪喷金,在Quanta 200F扫描电镜下观察并摄影.

## 2 结果与讨论

### 2.1 $\text{ClO}_2$ 对水中低含量隐孢子卵囊的灭活效果

向隐孢子虫卵囊水样中分别加入 $\text{ClO}_2$ 储备液,使其质量浓度分别为1.0、1.5、2.0、2.5 mg/L和3.0 mg/L,在pH = 7.0和15  $^{\circ}\text{C}$ 条件下分别反应5、10、15、20、30 min和60 min时,用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 终止反应,镜检计数并计算 $\text{ClO}_2$ 对隐孢子虫卵囊的杀灭率,结果见图1.

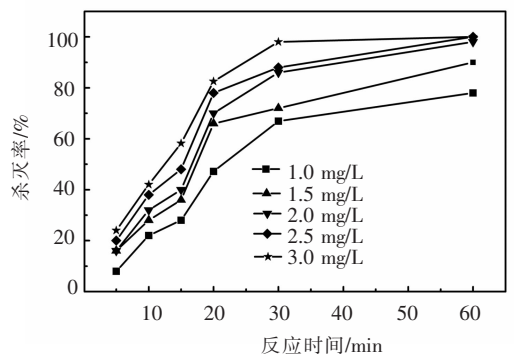


图1 不同二氧化氯质量浓度对隐孢子虫卵囊的杀灭效果  
从图1中可见, $\text{ClO}_2$ 对低含量隐孢子虫卵囊的杀灭率随消毒剂投量的增加而增加,反应30 min,2.0 mg/L以上的投量即可获得接近90%

的杀灭率,3 mg/L 时,杀灭率几乎为 100%,这说明少量  $\text{ClO}_2$  即可有效地杀灭水中的低含量隐孢子虫卵囊.同时还可看出,不同  $\text{ClO}_2$  投量下隐孢子虫卵囊的杀灭率随时间的变化规律是相似的,反应前 20 min 杀灭率增速较快,反应 20 min 时, $\text{ClO}_2$  投量为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mg/L 时的杀灭率分别为 48%、66%、70%、78%、82%,60 min 时,杀灭率分别增至 78%、90%、98%、100%、100%,在 30~60 min 之间,杀灭率变化不显著,因此在应用  $\text{ClO}_2$  杀灭隐孢子虫时,接触时间控制在 30 min 之内为宜.对上述结果归纳可得: $\text{ClO}_2$  投量和反应时间均是影响  $\text{ClO}_2$  杀灭隐孢子虫卵囊的重要因素,在实际饮用水处理过程中,可从增加  $\text{ClO}_2$  质量浓度和延长反应时间两方面入手来获得满意的处理效果.

## 2.2 温度与 pH 对 $\text{ClO}_2$ 杀灭隐孢子虫卵囊的影响

向隐孢子虫卵囊样品中加入  $\text{ClO}_2$  储备液,使其质量浓度为 2.0 mg/L,调节 pH=7.0 后分别在 5、15、20 °C 和 30 °C 下反应 20 min,考察温度对低含量隐孢子虫卵囊的杀灭效果的影响.由图 2 可知,杀灭率随着温度的升高而升高,当反应温度从 5 °C 升高到 30 °C 时,杀灭率也从 54% 提高到 70%.此结果表明,在 5~30 °C 范围内,温度越高越有利于  $\text{ClO}_2$  的杀灭.

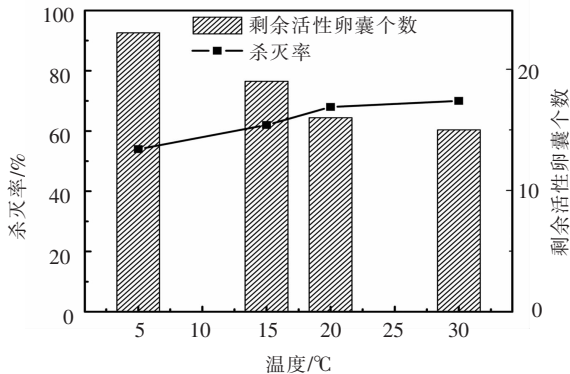


图2 温度对  $\text{ClO}_2$  杀灭隐孢子虫卵囊效果的影响

同样按照上述方式制备  $\text{ClO}_2$  质量浓度 2 mg/L 的水样 5 组,调节 pH 值分别为 3、5、7、9 和 11,在 15 °C 下反应 20 min 时用硫代硫酸钠终止反应,探讨 pH 值对低含量隐孢子虫卵囊的杀灭效果,其结果见图 3.结果表明,pH 对杀灭效果的影响不显著,隐孢子虫的杀灭率随着 pH 的而呈先升后降的趋势,在 50%~66% 的范围内变化,中性条件下效果略好.通常饮用水水质条件以中性为主,因此应用  $\text{ClO}_2$  杀灭饮用水中隐孢子虫卵囊可获得满意效果.

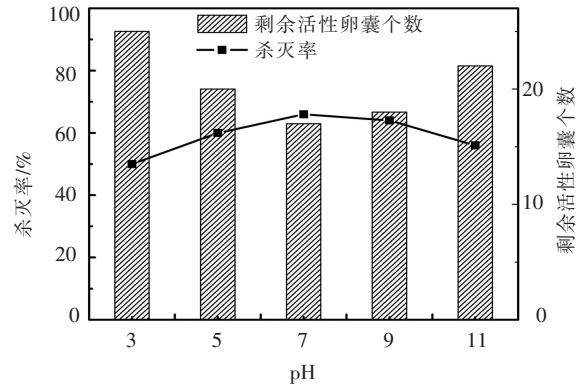


图3 pH 值对  $\text{ClO}_2$  杀灭隐孢子虫卵囊效果的影响

## 2.3 $\text{ClO}_2$ 对隐孢子虫卵囊杀灭的显微形态观察

$\text{ClO}_2$  处理前后隐孢子虫卵囊体表超微结构的变化如图 4 所示.图 4(a)、4(c)、4(e) 为处理前隐孢子虫卵囊形态的扫描电镜照片,图 4(b)、4(d)、4(f) 为处理后隐孢子虫卵囊形态的扫描电镜照片,此时 95% 以上的卵囊均被灭杀.通过 4(a) 和 4(b) 两图对比可粗略地看出,处理后的隐孢子虫卵囊表面比未处理之前出现了更深更加明显的褶皱,4(c)、4(d) 图分别为 1 个处理前和 1 个处理后的完整隐孢子虫卵囊表面形态图,对比可看出,处理后的隐孢子虫卵囊表面不再如处理前的隐孢子虫卵囊表面光滑,经过处理的隐孢子虫卵囊表面明显褶皱增加.而 4(e) 和 4(f) 两图更加清楚地对比出这些褶皱的区别,隐孢子虫卵囊经  $\text{ClO}_2$  处理后甚至引起了形状的变化,不再呈规则的球形,表面的褶皱也加深.经  $\text{ClO}_2$  处理之后,外壁的支撑性显著减弱,不能再支撑为球状,变成不规则形状.

从以上结果可推断出,虽然  $\text{ClO}_2$  对隐孢子虫卵囊的外壁有一定的影响,可以引起卵囊外壁起褶皱、改变卵囊外壁的光滑性并改变卵囊外壁的支撑性,但在电镜的观察过程中并没有发现引起卵囊外壁大规模的损伤、破裂等问题,仍能保持完整性,这说明  $\text{ClO}_2$  对隐孢子虫卵囊外壁并没有造成巨大的破坏,仅仅是造成卵囊外壁整体支撑性和外形的变化.这是由于隐孢子虫卵囊的性质造成的.隐孢子虫卵囊是隐孢子虫感染宿主之后由宿主排出体外的卵囊,大多数都有很厚的囊壁,对恶劣环境具有很强的抗性,这也是卵囊的抗氯性强的原因之一.经  $\text{ClO}_2$  处理后,荧光染色结果表明其活性已丧失,可知  $\text{ClO}_2$  对隐孢子虫卵囊具有很强的穿透性,可在杀死内部孢子的同时不对外壁做出强烈的破坏;由于卵囊壁的主要成分为多糖和蛋白质,因此二氧化氯仅会破坏蛋白质上还原性基团,使隐孢子虫的支撑结构发生改变.由

于杀灭后的卵囊依然完整,仍可被常用的 USEPA1623方法所检出。因此在实际应用  $\text{ClO}_2$  消毒过程中,应采用多种检测方法相结合,防止出现假阳性检测结果。

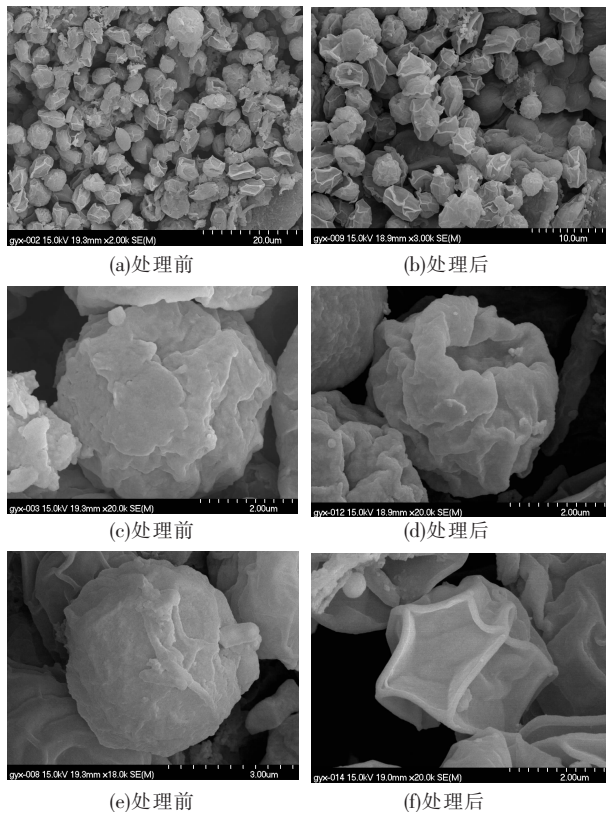


图4 扫描电镜下  $\text{ClO}_2$  处理前后隐孢子虫卵囊表面变化

### 3 结 论

1)  $\text{ClO}_2$  可以有效地杀灭隐孢子虫卵囊,反应时间和消毒剂投量对杀灭率影响很大,呈非线性正相关,在较高投量或较长的反应时间下可获得更好的灭活效果,在 1.5 mg/L 和 2.5 mg/L 的投量下作用 60 min 时,对于含量为 50 个/mL 的卵囊样品,杀灭率分别可达 90% 和 100%。

2) pH 值对杀灭效果的影响并不显著,在中性条件下杀灭率最高;温度对杀灭效果影响较明显,当温度从 5 °C 上升到 30 °C,  $\text{ClO}_2$  投量为 2 mg/L 时,对于含量为 50 个/mL 的卵囊样品,杀灭率从 54% 提高到 70%。

3)  $\text{ClO}_2$  具有很强的穿透力,可在不破坏隐孢子虫卵囊外壁的情况下将其杀灭。

### 参考文献:

[1] 杨兴友. 人体隐孢子虫病流行状况[J]. 寄生虫病与感染性疾病, 2005, 3(3): 135-137.  
[2] SAVIOL L, SMITH H, THOMPSON A. Giardia and Cryptosporidium join the "Neglected Disease Initiative"

[J]. Trends in Parasitology, 2006, 22(5): 203-208.  
[3] GB 5749—2006. 生活饮用水卫生标准[S]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 2006.  
[4] 张西臣. 隐孢子虫病[M]. 长春: 吉林大学出版社, 2004.  
[5] GAUT S, ROBERTSON L, GJERDE B, *et al.* Occurrence of Cryptosporidium oocysts and Giardia cysts in Norwegian groundwater wells in bedrock[J]. Journal of Water and Health, 2008, 6(3): 383-388.  
[6] GRACZYK T K, KACPRZAK M, NECZAJ E, *et al.* Occurrence of Cryptosporidium and Giardia in sewage sludge and solid waste landfill leachate and quantitative comparative analysis of sanitization treatments on pathogen inactivation[J]. Environmental Research, 2008, 106(1): 27-33.  
[7] CDC. Cryptosporidiosis outbreaks associated with recreational water use-five states, 2006[J]. Morbidity and Mortality Weekly Report, 2007, 56(29): 729-732.  
[8] BETANCOURT W Q, ROSE J B. Drinking water treatment processes for removal of Cryptosporidium and Giardia[J]. Veterinary Parasitology, 2004, 126(1/2): 219-234.  
[9] 黄君礼. 新型水处理剂——二氧化氯技术及其应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.  
[10] CHAURET C P, RADZIMINSKI C Z, LEPUIL M, *et al.* Chlorine dioxide inactivation of Cryptosporidium parvum oocysts and bacterial spore indicators[J]. Applied And Environmental Microbiology, 2001, 67(7): 2993-3001.  
[11] CLARK R M, SIVAGANESAN M, RICE E W, *et al.* Development of a Ct equation for the inactivation of Cryptosporidium oocysts with chlorine dioxide[J]. Water Research, 2003, 37(11): 2773-2783.  
[12] GB/T 5750.11—2006. 生活饮用水标准检验方法消毒剂指标[S]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 2006.  
[13] 黄君礼. 连续碘量法测定水中  $\text{ClO}_2$ ,  $\text{Cl}_2$ ,  $\text{ClO}_2^-$  和  $\text{ClO}_3^-$  [J]. 环境科学进展, 1999, 2(增刊): 17-23.  
[14] BUKHARI Z, HARGY T M, BOLTON J R, *et al.* Medium-pressure UV for oocyst inactivation[J]. Journal American Water Works Association, 1999, 91(3): 86-94.  
[15] CAMPBELL A T, ROBERTSON L J, SMITH H V. Viability of Cryptosporidium parvum oocysts: correlation of in vitro excystation with inclusion or exclusion of fluorogenic vital dyes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(11): 3488-3493.  
[16] 高云霞, 黄君礼, 吴明松, 等. 隐孢子虫检测方法[J]. 化学工程师, 2008(4): 31-34.