

二氧化氯灭活水中贾第鞭毛虫的效果及影响因素分析

冉治霖¹, 李绍峰², 崔崇威¹, 袁一星¹, 黄君礼¹

(1. 哈尔滨工业大学 市政环境工程学院, 哈尔滨 150090, cuichongwei1991@126.com;
2. 深圳职业技术学院 建筑与环境工程学院, 广东 深圳 518055)

摘要: 为了研究高纯二氧化氯(ClO_2)对水中贾第鞭毛虫的灭活效果,选择荧光活体染色法作为贾第鞭毛虫灭活效果的评价方法,研究不同因素对 ClO_2 灭活贾第虫效果的影响.结果表明:当 $\text{pH}=7.0$,水温为 $25\text{ }^\circ\text{C}$,浊度为 1 NTU ,投加 2 mg/L ClO_2 后 30 min ,可以达到最適消毒效果(贾第虫存活率小于 1%);浊度是影响 ClO_2 灭活贾第虫效果的主要因素;贾第虫孢囊的存活率(孢囊含量为 3×10^5 个/mL)与 ClO_2 投加质量浓度、作用时间成非线性负相关;酸性较于碱性更适宜 ClO_2 灭活贾第鞭毛虫;可溶性有机物质量浓度一定程度上抑制 ClO_2 的灭活效果.

关键词: 二氧化氯;灭活;贾第鞭毛虫

中图分类号: X1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0367-6234(2010)08-1246-04

Inactivating effects of chlorine dioxide on *Giardia* in water

RAN Zhi-lin¹, LI Shao-feng², CUI Chong-wei¹, YUAN Yi-xing¹, HUANG Jun-li¹

(1. School of Municipal & Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China, cuichongwei1991@126.com; 2. Department of Building & Environmental Engineering, Shenzhen Polytechnic Institute, Shenzhen 518055, China)

Abstract: In order to investigate the efficiency of chlorine dioxide on disinfecting *Giardia* in water, a fluorescence staining method was employed to evaluate the effect of chlorine dioxide inactivating *Giardia* affected by different factors. The results show that the optimum disinfection effect (the survival rate of less than 1%) can be achieved when adding of 2.0 mg/L ClO_2 after 30 min ($\text{pH}=7.0$, $25\text{ }^\circ\text{C}$ and turbidity of 1 NTU). Turbidity is one important factor affecting inactivation. The survival rate of *Giardia* cysts has a non-linear negative correlation with chlorine dioxide concentration and reaction time. The acidic condition is a little better than alkaline condition. Concentrations of organic matter can inhibit the disinfecting effect of ClO_2 to some extent.

Key words: chlorine dioxide; inactivation; *Giardia*

贾第鞭毛虫(*Giardia*)是一种寄生性的原生动物,经常引起饮用水爆发病,其主要来源于粪便污染的集中区域^[1-2].贾第鞭毛虫在临床上能够引起发烧、恶心、腹痛、腹泻等症状^[3].免疫力正

常的患者,经过适当的治疗就会痊愈,但对于免疫力缺陷者甚至会导致死亡.

贾第鞭毛虫一般情况下可分为A~G型,其中A、B型感染人类,C、D型感染犬类,E型感染家畜牛、羊、猪等,而F型和G型则分别感染猫和家鼠.从目前所鉴定的基因型来看,部分犬贾第鞭毛虫基因型为A型^[4-5],具有潜在的公共卫生危害性,有可能使生产者和社区其他成员受到威胁.

随贾第鞭毛虫污染的不断加重,我国新出台的《生活饮用水卫生标准》GB 5749—2006中,增

收稿日期: 2009-05-05.

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(2006AAZ309).

作者简介: 冉治霖(1980—),男,博士研究生;

崔崇威(1963—),男,教授,博士生导师;

袁一星(1957—),男,教授,博士生导师;

黄君礼(1938—),男,教授,博士生导师.

加了贾第鞭毛虫等4项微生物学指标. 各国学者已进行了多种消毒剂灭活贾第鞭毛虫效果的研究,其中包括:臭氧、氯气、氯胺、紫外线等^[6-7]. 近年来由于液氯用于饮用水消毒存在着诸多卫生和安全隐患,世界卫生组织和世界粮农组织已向全球推荐使用安全及高效的消毒剂——ClO₂, ClO₂的消毒效果远远优于Cl₂,它在水中不水解,且在pH=(2~9)较宽范围内消毒效果稳定^[8]. 然而,ClO₂灭活饮用水中贾第鞭毛虫效果的研究较少,且仅对消毒剂投量和作用时间进行了摸索^[9],并未深入系统探讨水消毒过程中其他因素的影响.

本文使用自制高纯ClO₂对饮用水中犬源贾第鞭毛虫(*Giardia Canis*)进行灭活,首先评价荧光活性染色和体外脱囊2种方法检测贾第鞭毛虫活性的可行性,在证明荧光染色可靠性的基础上,探讨投加质量浓度、灭活时间、温度、pH、浊度和有机物等因素的影响,以找出影响ClO₂灭活水中贾第鞭毛虫效果的最佳条件,为进一步的工程实践提供有益的信息.

1 实验

1.1 材料

二氧化氯:自制,纯度在99.5%以上,棕色瓶低温密封避光保存. 使用时准确标定并稀释至所需质量浓度. 犬源贾第鞭毛虫(*Giardia Canis*)采于患病犬,经过筛、硫酸锌漂浮和蔗糖梯度离心等步骤,得到含量为 1.5×10^6 个/mL犬源贾第鞭毛虫样品. 以2.5%重铬酸钾悬浮保存于4℃冰箱. 4,6-二脒基-2-苯基-吲哚(DAPI):Sigma USA;普匹碘胺(PI):Sigma USA;HBSS平衡盐溶液:Sigma USA;胃蛋白酶:Sigma USA;牛黄胆碱钠:Sigma USA;胰蛋白酶:Sigma USA.

1.2 方法

1.2.1 荧光染色法

1)取0.5 mL PBS(磷酸缓冲溶液)保存样品,加入1 mL HBSS平衡盐溶液漂洗2次;2)沉淀于160 μL HBSS平衡盐溶液中,加入20 μL的DAPI,20 μL的PI储备液,37℃温浴1 h;3)温浴后加入1 mL HBSS清洗3次,洗去未染上颜色的DAPI和PI;4)涂片,荧光显微镜下镜检,各样品分别取200个孢囊镜检.

1.2.2 体外脱囊法

消毒剂处理后的贾第鞭毛虫样品悬浮于500 μL纯水中,加入到10 mL 0.154 mol/L NaCl溶液中,其中50 mg含量为62 U/mg胃蛋白酶和70 μL浓盐酸溶液,37℃温浴30 min. 混合物用含

有0.262 mol/L NaHCO₃溶液和22 mg/L牛磺胆酸钠溶液,以及4 mg/L牛胰蛋白酶,37℃温浴120 min之后,样品1 000 g离心5 min,取10 μL脱囊后的样品在微分干涉显微镜下观察. 在连续随机视野中检测200个孢囊脱囊和未脱囊的个数^[10]. 脱囊百分比的计算方法:(脱囊个数/总孢囊数)×100%.

1.2.3 计数方法

采用血细胞计数法,400×显微镜下分别计数2种检测方法处理过的样品,经过3次重复,取平均值,计算公式如下:

$$1 \text{ mL 样品中隐孢子虫总数} = (A/5) \times 25 \times 10 \times 1\,000 \times B = 50\,000 A \cdot B \text{ (个)}.$$

其中:A为5个中方格总数;B为稀释倍数.

2 结果与分析

2.1 荧光活体染色法和体外诱导脱囊法评价贾第虫活性

在超纯水中加入含量为 3×10^5 个/mL的贾第鞭毛虫,于25℃避光培养,连续监测24 h,分别利用活性活体染色(DAPI/PI)和诱导脱囊2种方法检测贾第鞭毛虫孢囊活性,如图1所示. 可见,在灭活率方面,荧光活体染色数据略高于体外诱导脱囊法,但2种方法灭活规律一致,与Joaquin等人研究结果相符^[11]. 因此,可以说荧光活体染色法与体外诱导脱囊法一样都是评价贾第鞭毛虫孢囊活性的可靠方法^[12],本研究中将采用荧光活体染色法来评价ClO₂灭活水中贾第鞭毛虫孢囊的效果.

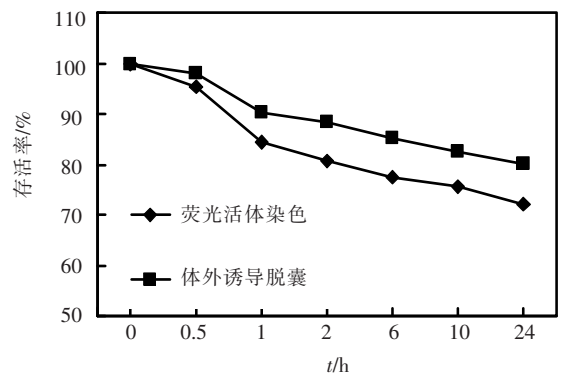


图1 荧光活体染色和体外诱导脱囊方法评价贾第鞭毛虫活性比较

荧光活体染色应用DAPI和PI作荧光活体染色剂,DAPI+/PI-型孢卵囊为激活状态;DAPI+/PI+型为已死的隐孢子虫孢囊(见图2). 从图中可以看到,自然光源下共有2个贾第虫孢囊,UV光源下,2个都发出蓝色荧光,即:

DAPI + = 2, 绿光源下, 2 个孢囊都发出红色荧光,

即: PI + = 2. 可以说明这 2 个孢囊都为灭活状态.

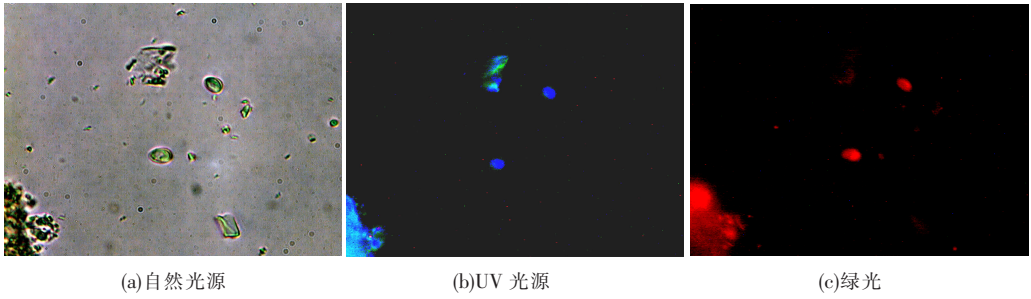


图2 荧光活体染色图片

2.2 二氧化氯灭活贾第虫影响因素

2.2.1 二氧化氯投量的影响

超纯水中, pH = 7.2, 浊度为 25 NTU, DOC 含量为 1 mg/L, 二氧化氯的投加量分别为 0.5, 1.0, 2.0 mg/L 和 4.0 mg/L, 于 25 °C 避光反应. 反应时间分别为: 1, 10, 30, 60, 120, 240 min 和 24 h, 硫代硫酸钠终止反应后, 迅速取样; 用 HBSS 平衡盐溶液 12 000 g 离心 30 s 两次, 洗去反应液. 利用活性染色的方法染色并计数, 结果见图 3.

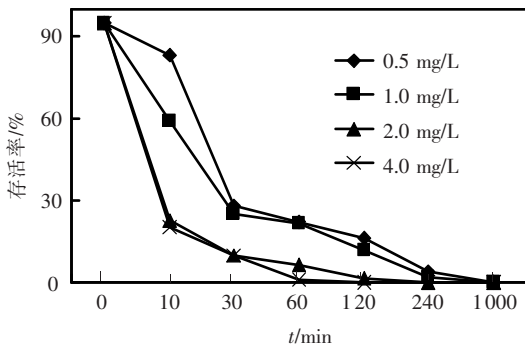


图3 ClO₂ 投量对贾第鞭毛虫活性的影响

由图 3 可见, 投加 ClO₂ 后, 其中贾第鞭毛虫孢囊的存活率与 ClO₂ 投量呈非线性负相关, 在初始阶段 (0 ~ 10 min) 贾第鞭毛虫孢囊的活性降低较快. 当 ClO₂ 的投加量为 4 mg/L 时, 经过 10 min 反应存活率为 20%, 而 0.5, 1.0, 2.0 mg/L 时存活率分别为 83.3%, 58.9%, 22.6%, 说明随 ClO₂ 投量的增加, 贾第鞭毛虫孢囊的存活率降低, 所以选取 ClO₂ 最适投量为 2.0 mg/L. 随着反应时间的延长, 120 min 时投加 2 mg/L ClO₂ 的反应体系中贾第鞭毛虫孢囊存活率接近 1%, 240 min 样品中几乎检测不到活性贾第鞭毛虫. ClO₂ 灭活贾第鞭毛虫的机理, 可能是类似于 ClO₂ 灭活细菌或者病毒, ClO₂ 破坏了贾第鞭毛虫表面蛋白或内部的核酸^[13], 但具体机理有待进一步研究.

2.2.2 水温的影响

研究表明水温也是影响二氧化氯消毒的一个主要因素. 设置 5、15、25 °C 和 35 °C 四个温度梯

度, 在水样 pH = 7.0, 浊度为 25 NTU, DOC 含量为 1 mg/L, ClO₂ 投量为 2.0 mg/L 时, 对贾第鞭毛虫孢囊活性进行检测, 取样时间分别为 1、10、30、60、120、240 min 和 24 h (见图 4). 由图 4 可见, 经过 10 min 反应, 水温 5、15、25 °C 和 35 °C 时, 贾第虫孢囊的存活率分别为 43.5%、33.3%、22.6% 和 11.7%, 水温越高, 灭活效果越好; 当反应时间达到 60 min 后, 在 15、25 °C 和 35 °C 时的灭活效果几乎相同 (存活率分别为 7.1%、6.4% 和 5%), 而 5 °C 时的灭活效果较差,

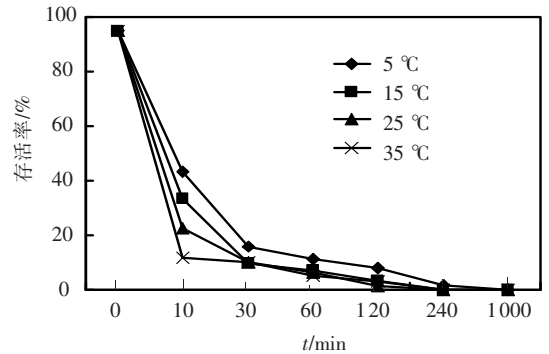


图4 水温对贾第鞭毛虫活性的影响

经过 240 min 的消毒处理, 仍有 5% 贾第虫孢囊存活. 其原因可能是较低的温度促使贾第虫进入休眠状态, 使消毒剂不易灭活贾第虫.

2.2.3 浊度的影响

Falabi 等人的研究^[14]表明贾第鞭毛虫孢囊与隐孢子虫卵囊的去除与浑浊度有显著关系 (贾第鞭毛虫孢囊与浊度 $P = 0.01$; 贾第鞭毛虫卵囊与浊度 $P = 0.05$)^[15]. 本研究在 pH = 7, 反应温度为 25 °C, ClO₂ 投量为 2.0 mg/L, 高岭土配置原液, 分别控制浊度为 50、25、10、5、1 NTU, 考察浊度对 ClO₂ 灭活贾第鞭毛虫孢囊的影响, 其结果见图 5. 由图 5 可见, 浊度 50 NTU 和 25 NTU 时, 贾第鞭毛虫孢囊灭活率差别不大. 当浊度下降到 10 NTU 以下后, 随浑浊度的降低贾第鞭毛虫孢囊的存活率迅速下降, 特别是当浊度为 1 NTU 时, ClO₂ 作用 30 min 后, 存活率接近零. 可见 ClO₂ 灭

活贾第鞭毛虫的效果随着浊度的降低而加强,浊度越低,灭活效果越佳.究其原因可能是形成浊度的微粒为贾第鞭毛虫孢囊提供表面防护从而削弱灭活效果,悬浮固体提高了贾第鞭毛虫对消毒剂的抵抗能力.

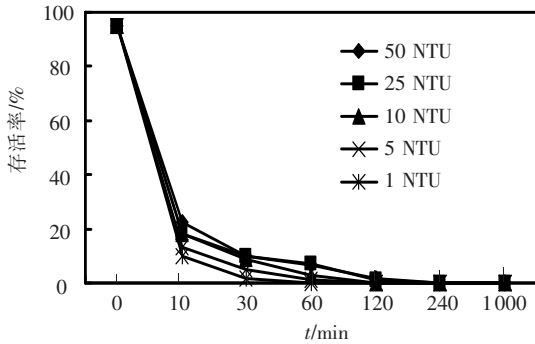


图 5 浊度变化对贾第鞭毛虫活性的影响

2.2.4 pH 值的影响

反应体系 pH 值是影响 ClO_2 杀灭贾第鞭毛虫孢囊效果的因素之一. 温度为 $25\text{ }^\circ\text{C}$, 浑浊度 25 NTU, 贾第鞭毛虫初始含量 3×10^5 个/mL, ClO_2 投加量为 2.0 mg/L 时, 配置不同 pH 值 (4.0、6.0、7.0、8.0 和 10.0) 的反应体系, 连续监测贾第鞭毛虫孢囊存活情况, 数据如图 6 所示.

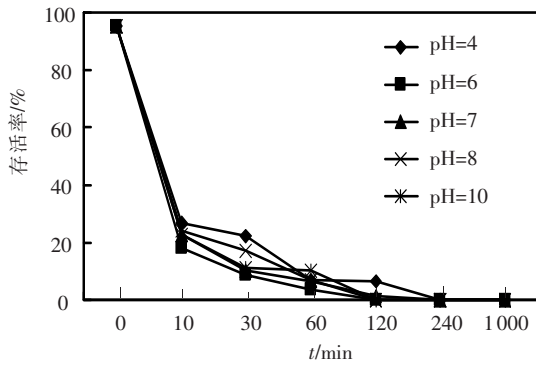


图 6 pH 值变化对贾第鞭毛虫活性的影响

由图 6 可以看出, pH = 6.0 和 pH = 7.0 的灭活效果最佳, 经过 60 min 作用后, 贾第鞭毛虫孢囊存活率下降为 3.25% 和 4.6%. 另外, 碱性条件 (pH = 8.0 和 pH = 10.0) 贾第鞭毛虫孢囊平均存活率为 8.5%, 而酸性条件 (pH = 4.0 和 pH = 6.0) 为 5.4%, 说明酸性条件更适宜 ClO_2 灭活贾第鞭毛虫. 但是 pH 值在 4.0 ~ 10.0 之间贾第鞭毛虫的存活率只变化了 5.25%, 表明 pH 值不是影响 ClO_2 灭活贾第鞭毛虫效果的主要因素.

2.2.5 有机物质量浓度的影响

以腐殖酸分别配制成 DOC 含量为 8.0、4.0、2.0 mg/L 和 1.0 mg/L 溶液, 投加质量浓度为 2.0 mg/L ClO_2 , 浊度为 1 NTU, 灭活 3×10^5 个/mL 贾第鞭毛虫孢囊, 荧光活性染色法测定其结果, 如

图 7 所示, 可见贾第鞭毛虫孢子的存活率随 ClO_2 作用时间的增加而减少, 同时可溶性有机物的质量浓度和存活率呈非线性负相关, 这可能是由于可溶性有机物的存在消耗了一定量的 ClO_2 , 从而降低了 ClO_2 灭活效果.

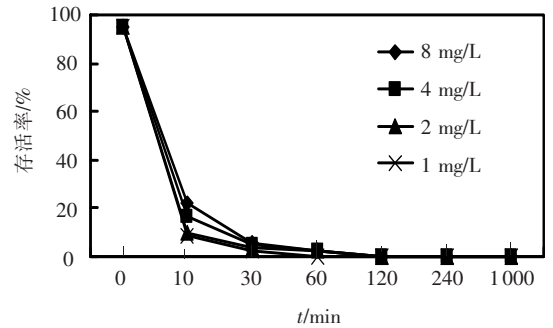


图 7 有机物质量浓度对贾第鞭毛虫活性的影响

3 结 论

1) 荧光活体染色作为评价贾第鞭毛虫孢囊活性方法结果可靠.

2) 当 pH = 7.0, 水温为 $25\text{ }^\circ\text{C}$, 浑浊度为 1 NTU, 投加 2 mg/L ClO_2 , 经过 30 min 作用, 可以达到对水中贾第鞭毛虫的最佳消毒效果 (存活率小于 1%).

3) 浊度是影响 ClO_2 灭活贾第鞭毛虫效果的主要因素.

4) pH 值不是影响 ClO_2 灭活贾第鞭毛虫效果的主要因素, 但酸性条件更适宜 ClO_2 灭活贾第鞭毛虫.

5) 可溶性有机物质量浓度与贾第鞭毛虫存活率呈非线性负相关.

参考文献:

- [1] GRACZYK T K, LUCY F E, TAMANG L, *et al.* Human enteropathogen load in activated sewage sludge and corresponding sewage sludge-end products [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(6): 2013 - 2015.
- [2] GRACZYK T K, CONN D B, MARCOGLIESE D J, *et al.* Accumulation of human waterborne parasites by zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and Asian freshwater clams [J]. *Parasitol Res*, 2003, 89(2): 107 - 111.
- [3] GRACZYK T K, MAJEWSKA A C, SCHWAB K J. The role of aquatic birds in dissemination of human waterborne enteropathogens [J]. *Trends Parasitol*, 2008, 24(2): 55 - 59.
- [4] LETICIA E G, ADRIAN C C. Genotype of *Giardia intestinalis* isolates from children and dogs and its relationship to host origin [J]. *Parasitol Research*, 2006, 97: 1 - 6.