

DOI: 10.19853/j.zgjsps.1000-4602.2021.01.006

宾馆建筑热水系统内军团菌的存在水平及归趋研究

杨文畅^{1,2}, 李伟英^{1,2}, 黄圣洁¹, 陈继平^{1,2}

(1. 同济大学 环境科学与工程学院, 上海 200092; 2. 同济大学 长江水环境教育部重点实验室, 上海 200092)

摘要: 建筑热水供应系统是建筑给水系统的重要组成部分, 其水质安全与民众健康息息相关。对我国华东地区一所宾馆的热水系统进行了一年的水质监测, 借助分子生物学、MiSeq 高通量测序技术, 探究水中军团菌存在水平、影响因素及其归趋特点。结果表明, 该宾馆热水系统存在军团菌感染风险。研究期间军团菌检出率为 100%, 检出浓度为 $2.27 \times 10^3 \sim 4.12 \times 10^5$ copies/mL, 占细菌总数的比例为 0.28% ~ 38.11%。军团菌浓度与季节间具有显著相关性, 夏季高于其他季节, 除冬季外其余季节各采样点军团菌浓度较为相近。建筑热水系统对微生物具有筛选富集作用。水中军团菌浓度与浊度、DOC 呈显著正相关性, 与 pH 值呈显著负相关性, 可通过降低浊度和有机物浓度、满足水质标准前提下合理调控 pH 值等措施控制军团菌增殖, 保障水质安全。

关键词: 宾馆; 热水系统; 军团菌

中图分类号: TU991 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4602(2021)01-0034-06

Level and Trend of *Legionella* in Hotel Hot Water System

YANG Wen-chang^{1,2}, LI Wei-ying^{1,2}, HUANG Sheng-jie¹, CHEN Ji-ping^{1,2}

(1. College of Environmental Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092, China;
2. Key Laboratory of Yangtze River Water Environment <Ministry of Education>, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract: Building hot water supply system is an important part of building water supply system, and its water quality safety is closely related to public health. Water quality of a hot water system in a hotel in East China was monitored for one year. With the help of molecular biology and MiSeq high-throughput sequencing technology, the existing level, influencing factors and trend characteristics of *Legionella* in water were explored. The results showed that there was a risk of *Legionella* infection in the hotel hot water system. The detection rate of *Legionella* at the sampling points during the study period was 100%, and the detected concentration was between 2.27×10^3 copies/mL and 4.12×10^5 copies/mL, accounting for 0.28% - 38.11% of the total bacteria. There was a significant correlation between the concentration of *Legionella* and the season. The concentration of *Legionella* in summer was higher than that in other seasons, and the concentrations at each sampling point were similar except in winter. The building hot water system had a selection and enrichment effect on microorganisms. The concentration of *Legionella* in water was positively correlated with turbidity and DOC, and negatively correlated with pH

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(51979194); 中国工程院院地合作项目(2019-CQ-ZD-1)

通信作者: 李伟英 E-mail: 123lwyktz@tongji.edu.cn

value. Therefore, *Legionella* proliferation could be controlled and water quality safety could be guaranteed by reducing turbidity and organic concentration and reasonably adjusting pH value under the premise of meeting water quality standards.

Key words: hotel; hot water system; *Legionella*

建筑给水系统将市政给水管网水引入建筑并输送至用户终端,其水质状况与居民用水安全密切相关^[1]。由于条件致病菌(OPs)具有较强的耐热(耐热水温 $>60\text{ }^{\circ}\text{C}$)和抗消毒能力,可在贫营养的饮用水环境中再生长^[2],常规水处理工艺很难将其完全去除。存活下来的条件致病菌经给水管网的长距离运输,因建筑物内部的给水系统管道比表面积大、间歇停滞、消毒剂残留量低、冷热水循环、管网末梢水停滞时间长等特点^[3],容易发生富集。而建筑热水系统的水温较冷水系统更适宜细菌生长繁殖^[4],通过皮肤接触、吸入气溶胶等途径,容易导致多种人体疾病。此外,我国很多城市的输配水管网敷设年限久远,管道老化和腐蚀现象严重,为生物膜及条件致病菌的生长和繁殖创造了条件,对人类健康尤其是免疫力较弱的婴幼儿和老人的健康产生重大威胁。

军团菌是一种分布广泛的条件致病菌,可引起以发热和呼吸道症状为主的疾病。自1982年我国南京首次报道以来,军团菌病在我国呈散发和小规模局部暴发^[5]。热水供应系统是军团菌的主要污染源之一,造成了严重的人员伤亡和经济损失,逐渐引起各国的重视和国内外学者的广泛关注^[6]。宾馆建筑作为人流量较大的公共场所,有较高的军团菌检出率^[7-8],针对宾馆建筑热水系统中的军团菌进行研究具有重要意义。目前,国内外对建筑给水系统中条件致病菌的研究多集中于个别影响因素或同一种类水样^[9-11],却鲜有根据建筑热水系统流程结合环境影响因素的系统性研究。鉴于此,笔者以建筑热水供应系统为研究对象,选取我国华东地区S市一所宾馆建筑进行长期连续性水质监测与分析,探究建筑热水系统中军团菌的存在水平及其归趋特性,以期建筑防治条件致病菌增长、保障饮用水系统用水安全提供理论基础。

1 试验部分

1.1 建筑给水系统概况

所研究的宾馆建筑内给水系统管材为铜管,采用24 h集中热水供应系统,利用容积式热交换器进行热水系统加热供水,高区容积式水加热器由厨房

水箱进水,供给8F和9F两层;中区和低区容积式水加热器由生活水箱进水,分别供给1F~7F和G~M层。本研究的采样点布置如图1所示。

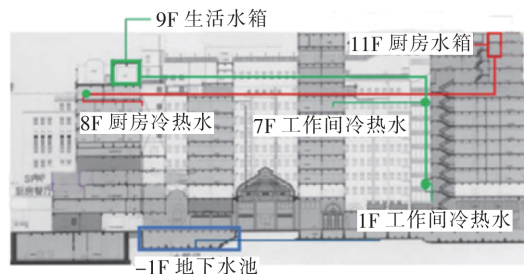


图1 建筑采样点布置示意

Fig. 1 Arrangement of building sampling points

1.2 检测项目及方法

可生物同化有机碳(AOC)采用先后接种法测定^[12];军团菌属和嗜肺军团菌的q-PCR定量采用Taqman探针法;16S rRNA(表征细菌总数)的q-PCR定量采用SybrGreen染料法;余氯采用余氯分析仪测定;水温采用水银温度计测定;浊度采用浊度仪测定;UV₂₅₄采用紫外分光光度计测定;溶解性有机碳(DOC)采用总有机碳分析仪测定;pH值采用pH计测定;溶解性总固体(TDS)采用电导仪测定;生物量采用流式细胞仪测定。除了余氯和温度在现场测试外,其余指标均待水样运回实验室后检测。

1.3 分析方法

运用SPSS软件进行统计学分析,采用非参数Spearman秩相关(RS)分析检验微生物指标及水质理化指标与军团菌存在水平间的相关性,采用非参数Kruskal-Wallis检验军团菌浓度随时间和空间变化的差异是否显著。

2 结果与讨论

2.1 热水系统中军团菌的存在水平

对宾馆建筑热水系统采集的水样进行军团菌和16S rRNA定量PCR检测,得出军团菌和细菌总数在不同季节、不同空间的存在水平,如图2所示。可知,该宾馆建筑水样中的军团菌检出率为100%。沈赞等人^[13]的研究表明,南京市自来水中PCR法军团菌检出率为3.3%,淋浴水中检出率为12.5%;

赵铨等人^[14]研究发现,华中地区主要城市建筑热水中的军团菌检出率为23.4%;张艺馨^[15]的研究指出,北京市建筑热水中的军团菌检出率为85.71%。本研究的宾馆建筑热水系统中军团菌检出率明显高于国内其他地区建筑热水系统,应当引起重视。

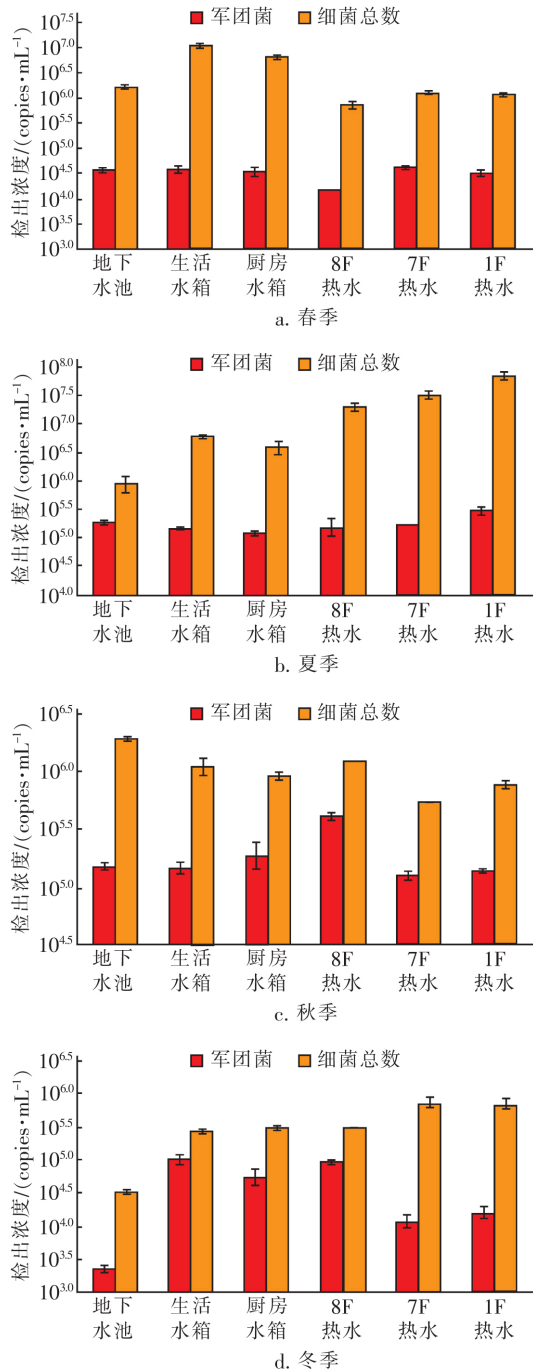


图2 军团菌和细菌总数存在水平

Fig. 2 *Legionella* and total bacteria levels

宾馆热水系统中军团菌的检出浓度为 $2.27 \times 10^3 \sim 4.12 \times 10^5$ copies/mL, 平均浓度为 1.07×10^5

copies/mL, 占细菌总数的0.28%~38.11%, 变化幅度较大, 这表明不同季节军团菌占细菌总数的比例差异较大, 受环境因素影响明显。我国北方城市用户端冷水中的军团菌浓度为 $14.7 \sim 1.07 \times 10^5$ copies/mL, 平均浓度为 6.03×10^2 copies/mL^[16]。相比之下, 该宾馆建筑热水系统中的军团菌检出浓度更相近, 且普遍高于冷水系统, 因此热水系统更适宜军团菌生长。

由图2可见, 除冬季外, 其余季节各采样点间军团菌的存在水平都较为相近, 但细菌总数差异较明显, 水箱水的细菌总数常高于地下水池, 这可能是由于军团菌与其他微生物存在竞争关系, 受到营养物质或其他环境因素的限制; 而冬季水温低, 细菌生长较缓慢, 温度成为限制微生物繁殖的主要因素。冬季军团菌浓度及细菌总数随供水流程变化较明显, 水由地下水池进入水箱后军团菌浓度及细菌总数都升高, 由厨房水箱到供水末梢后两者变化不大, 由生活水箱到供水末梢后军团菌浓度降低而细菌总数有所升高。研究表明, 水龄与军团菌的检出率和存在水平关系密切^[17], 由于龙头水停滞时间较水箱短, 降低了军团菌的存在水平。7F和1F热水的军团菌浓度和细菌总数相近, 表明楼层对热水龙头水中的军团菌存在水平影响不大。

2.2 归趋分析

军团菌和细菌总数的季节性分布如图3所示。

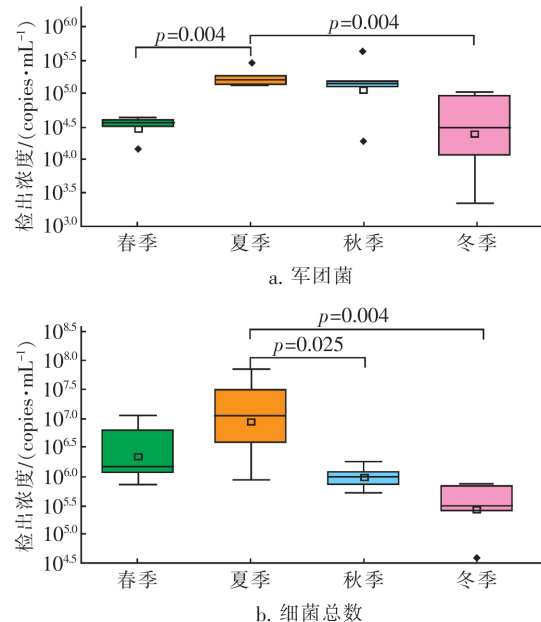


图3 军团菌和细菌总数的季节性分布

Fig. 3 Seasonal distribution of *Legionella* and total bacteria

军团菌浓度和细菌总数与季节均有显著差异 ($p=0.003$, $p=0.002$),而与采样点的差异均不显著 ($p=0.973$, $p=0.877$),表明军团菌和细菌总数的空间变化与军团菌的归趋特点无关。由于宾馆建筑的特殊性,客房入住率和用餐率随季节变化各有不同,客房用水和厨房用水存在不均匀性,宾馆淡季时水箱水停留时间较长,旺季时则较短,造成军团菌和细菌总数存在水平随季节变化显著。除冬季外,各采样点间的军团菌浓度相差不大,在夏季和秋季处于较高水平;细菌总数则在夏季处于较高水平,季节间差异较大,秋季各采样点间的细菌总数相差较小。这可能是由于夏季温度较高,适宜细菌生长,且氯衰减迅速^[16],导致细菌浓度普遍较高。

2.3 军团菌的环境影响因素

根据采样期间水质检测结果和军团菌的存在水平,采用 SPSS 进行相关性分析,结果如图 4 所示[采用 Spearman 等级相关分析,“**”表示在 0.01 级别(双侧置信区间检测)相关性显著,“*”表示在 0.05 级别(双侧置信区间检测)相关性显著]。

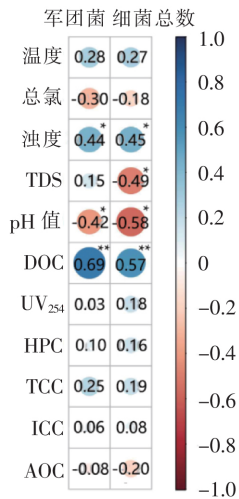


图4 军团菌浓度与环境因素相关性分析

Fig.4 Correlation analysis between *Legionella* concentration and environmental factors

军团菌的存在水平受环境影响的因素多且复杂。由图 4 可见,在建筑热水供应流程中,军团菌浓度和细菌总数均与浊度、DOC 呈显著正相关性,与 pH 值呈显著负相关性。因此浊度在一定程度上可以反映军团菌浓度和细菌总数水平,在对军团菌采取控制措施时也能降低浊度。试验期间 DOC 含量在 1.108 ~ 3.284 mg/L 之间,可以通过减少水中碳源以抑制军团菌的增长。pH 值对军团菌和其他细

菌的存在水平影响明显,较低的 pH 值会促进细菌生长。试验期间各采样点的 pH 值范围在 6.49 ~ 7.64 之间,《生活饮用水卫生标准》(GB 5749—2006) 中规定 pH 值应不小于 6.5 且不大于 8.5,在控制军团菌时可以考虑适当调整 pH 值。

军团菌浓度与其他水质监测指标的相关性不显著,表明军团菌存在水平并非仅受单一指标影响,应结合其他指标综合考虑。其中,与氯的相关性不显著,表明氯对军团菌的去除作用不明显。此外,军团菌浓度与细菌总数呈显著正相关性 ($p=0.029$),表明军团菌与其他细菌间存在关联性,且去除军团菌有利于降低供水系统中的总细菌含量。

研究表明升高温度对军团菌具有较明显的去除效果^[18],本研究中建筑物热水温度在 43.9 ~ 53.6 °C 之间,可适当提高温度以控制军团菌,但也可能导致其进入“活的非可培养”状态 (VBNC)^[19];此外,末梢水的停留时间和军团菌浓度关系密切,宾馆建筑可根据房间入住率的差异,设置自动定期放水装置^[17]或人工定时放水,以降低军团菌的存在风险。

2.4 微生物群落分析

军团菌与水中的其他微生物之间可能存在合作或竞争关系,采用 MiSeq 高通量测序进行微生物群落分析。根据测序结果,水池水箱水中的物种丰度高于热水龙头水,且就整个给水系统而言,物种丰度随供水距离的增加呈逐渐降低的趋势。指数 Sobs、Chao 和 Ace 是反映群落丰度的参数,指数 Shannon、Simpson 是反映群落多样性的参数,其值越大表明物种越丰富。水池水箱水除了微生物群落多样性指数 Simpson 值小于热水龙头水以外, Sobs、Ace、Chao、Shannon 指数值均大于热水龙头水,经 t 检验后两组指数值之间均具有显著性差异。此外,各水样在 97% 相似性水平下的 Shannon 稀释曲线表明,物种丰度排序为地下水池 > 厨房水箱 > 生活水箱 > 8F 热水 > 7F 热水 > 1F 热水,即随着热水供水距离的增加,物种丰度逐渐降低。

Venn 图统计多组样本中所共有和独有的物种数目,比较直观地表现环境样本的物种组成相似性及重叠情况。根据物种 Venn 图分析结果,水池水箱水中含有 412 种菌属,而热水龙头水中只含有 266 种菌属,其中两者共同含有 263 种菌属,这表明水池水箱水中特有的菌属较多,经建筑供水系统筛选作用后菌属种类迅速减少。

样本间物种的丰度分布差异程度可通过统计学中的距离进行量化分析,使用统计算法计算两两样本间的距离。根据 beta 多样性距离矩阵进行层级聚类分析,结果见图5。可以看出,水池水箱水中生活水箱和厨房水箱的物种组成结构的相似性更高,热水龙头水中8F热水和1F热水的相似性更高,而水池水箱水和热水龙头水之间则有明显的差别。这可能是由于厨房水箱和生活水箱都是由地下水池进水,而8F热水和1F热水分别是两个水箱出水的最远端,因此更相似。

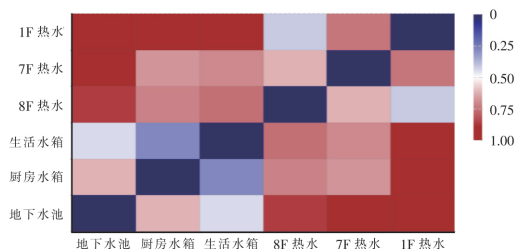


图5 距离 heatmap 图(属级别)

Fig.5 Samples distance heatmap on genus level

根据分类学分析结果,可知不同分组在属水平上的群落结构组成情况,直观地反映各样本在属水平上含有何种微生物及其相对丰度(所占比例),如图6所示。

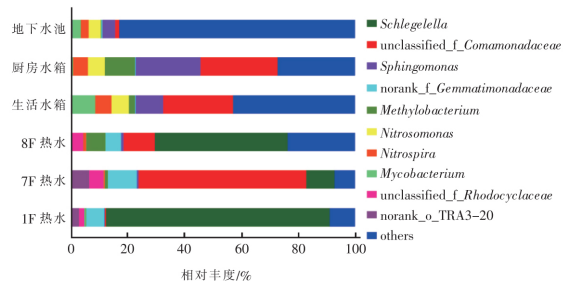


图6 微生物群落结构分析(属级别)

Fig.6 Community barplot analysis on genus level

根据群落结构分析(属级别分类),军团菌属在所有样本中的相对丰度为0.4%。水池水箱水中的细菌属类主要是鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、甲基杆菌属(*Methylobacterium*)、硝化螺旋菌属(*Nitrospira*)、亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)和分枝杆菌属(*Mycobacterium*)等,其他相对丰度小于5%的菌属种类较多,表明水池水箱水中的物种丰度较高,且地下水池水中的物种丰度最高,进入水箱后稍有降低。

热水龙头水中的细菌属类主要是赛托氏菌属

(*Schlegella*)、分枝杆菌属和甲基杆菌属等。赛托氏菌属在水箱出水近端的7F热水中丰度不高,在出远远端的8F和1F热水中丰度升高,其中在最远端的1F热水中丰度达到最高。水池水箱水中的鞘氨醇单胞菌属、硝化螺旋菌属、分枝杆菌属和亚硝化单胞菌属的丰度在热水系统中明显降低,物种组成丰度下降,同时出现了新的优势菌属赛托氏菌属,表明建筑热水系统对微生物产生了筛选富集作用。

3 结论

① 研究期间采样点军团菌检出率为100%,检出浓度为 $2.27 \times 10^3 \sim 4.12 \times 10^5$ copies/mL,占细菌总数的0.28%~38.11%,由此表明,该宾馆建筑物存在军团菌感染风险,应采取适当的控制措施,长期进行水质监测对保障供水安全尤为重要。

② 军团菌的归趋特点为夏季高于其他季节,除冬季外其余季节各采样点军团菌浓度都较为相近;各采样点间军团菌的浓度与其归趋特点无关,但根据MiSeq高通量测序相关分析结果,建筑热水系统对微生物有筛选富集的作用,随热水系统供水流程的延长,军团菌属物种丰度呈逐渐降低的趋势。

③ 细菌浓度受环境影响的机制较复杂,军团菌浓度和细菌总数均与浊度、DOC呈显著正相关性,但与pH值呈显著负相关性。

④ 根据军团菌与环境因素的相关性,可通过降低水中有机物含量和浊度,或在满足《生活饮用水卫生标准》(GB 5749—2006)要求的情况下适当调整水中的pH值等措施控制军团菌生长。

参考文献:

- [1] WANG H, EDEARDS M A, FALKINHAM J O, et al. Probiotic approach to pathogen control in premise plumbing systems: a review [J]. Environmental Science & Technology 2013, 47(18): 10117–10128.
- [2] 李欢, 赵建夫, 王虹. 饮用水输配系统中条件致病菌的健康风险和生长因素[J]. 中国给水排水, 2017, 33(10): 41–45.
LI Huan, ZHAO Jianfu, WANG Hong. Opportunistic pathogens in drinking water distribution systems: health risks and growth factors [J]. China Water & Wastewater 2017, 33(10): 41–45 (in Chinese).
- [3] LING F, WHITAKER R, LECHEVALLIER M W, et al. Drinking water microbiome assembly induced by water stagnation [J]. ISME Journal, 2018, 12(6): 1520–

- 1531.
- [4] LI H, LI S, TANG W *et al.* Influence of secondary water supply systems on microbial community structure and opportunistic pathogen gene markers [J]. *Water Research* 2018, 136: 160–168.
- [5] 陈悦, 沈健民, 何智纯, 等. 上海地区军团菌感染和环境污染状况的调查[J]. *上海预防医学杂志*, 2000 (7): 305–306.
- CHEN Yue, SHEN Jianmin, HE Zhichun, *et al.* Investigation on the status of clinical infection and environmental contamination by *Legionella* in Shanghai [J]. *Shanghai Journal of Preventive Medicine*, 2000 (7): 305–306 (in Chinese).
- [6] VAN KENHOVE E, DINNE K, JANSSENS A, *et al.* Overview and comparison of *Legionella* regulations worldwide [J]. *American Journal of Infection Control*, 2019, 47(8): 968–978.
- [7] PAPADAKIS A, CHOCHLAKIS D, SANDALAKIS V, *et al.* *Legionella* spp. risk assessment in recreational and garden areas of hotels [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2018, 15 (4): 598.
- [8] OZEN N S, ATAMAN S T, EMEK M. Exploring the *Legionella pneumophila* positivity rate in hotel water samples from Antalya, Turkey [J]. *Environmental Science and Pollution Research* 2017, 24(13): 12238–12242.
- [9] JI P, RHOADS W J, EDWARDS M A, *et al.* Impact of water heater temperature setting and water use frequency on the building plumbing microbiome [J]. *ISME Journal* 2017, 11(6): 1318–1330.
- [10] VAN DER LUGT W, EUSER S M, BURIN J P, *et al.* Wide-scale study of 206 buildings in the Netherlands from 2011 to 2015 to determine the effect of drinking water management plans on the presence of *Legionella* spp. [J]. *Water Research* 2019, 161: 581–589.
- [11] WANG H, MASTERS S, HONG Y, *et al.* Effect of disinfectant, water age, and pipe material on occurrence and persistence of *Legionella*, *Mycobacteria*, *Pseudomonas aeruginosa*, and two amoebas [J]. *Environmental Science & Technology* 2012, 46(21): 11566–11574.
- [12] ZHANG J, LI W, WANG F, *et al.* Exploring the biological stability situation of a full scale water distribution system in south China by three biological stability evaluation methods [J]. *Chemosphere* 2016, 161: 43–52.
- [13] 沈赟, 马恺, 叶艳华, 等. 南京市部分公共场所军团菌污染状况的研究[J]. *环境卫生学杂志* 2019, 9(3): 264–268.
- SHEN Yun, MA Kai, YE Yanhua, *et al.* Investigation on contamination status of *Legionella* in partial public places of Jiangsu Province [J]. *Journal of Environmental Hygiene* 2019, 9(3): 264–268 (in Chinese).
- [14] 赵铨, 沈晨, 匡杰, 等. 生活热水水质调研报告[J]. *给水排水* 2019, 45(1): 100–105.
- ZHAO Li, SHEN Chen, KUANG Jie, *et al.* Domestic hot water quality survey report [J]. *Water & Wastewater Engineering* 2019, 45(1): 100–105 (in Chinese).
- [15] 张艺馨. 建筑生活热水中军团菌和非结核分枝杆菌的研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2017.
- ZHANG Yixin. The Research of *Legionella* and Non-tuberculous *Mycobacteria* in Building Domestic Hot Water [D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology 2017 (in Chinese).
- [16] LIU L, XING X, HU C, *et al.* One-year survey of opportunistic premise plumbing pathogens and free-living amoebae in the tap-water of one northern city of China [J]. *Journal of Environmental Sciences* 2019, 77(3): 20–31.
- [17] TOTARO M, VALENTINI P, COSTA A L, *et al.* Rate of *Legionella pneumophila* colonization in hospital hot water network after time flow taps installation [J]. *The Journal of Hospital Infection* 2017, 98(1): 60–63.
- [18] GAVALDA L, GARCIA-NUNEZ M, QUERO S, *et al.* Role of hot water temperature and water system use on *Legionella* control in a tertiary hospital: an 8-year longitudinal study [J]. *Water Research*, 2019, 149: 460–466.
- [19] CERVERO-ARAGO S, SCHRAMMELV B, DIETERSDORFER E, *et al.* Viability and infectivity of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* strains induced at high temperatures [J]. *Water Research*, 2019, 158: 268–279.

作者简介: 杨文畅(1997–), 女, 四川绵阳人, 硕士研究生, 研究方向为建筑热水系统中生物安全与控制技术。

E-mail: 123lwyktz@tongji.edu.cn

收稿日期: 2019–12–01

修回日期: 2020–02–11

(编辑: 刘贵春)