

口腔综合治疗台水路系统中假单胞菌属污染状况的检测

周如玉,平逸帆,张元,时玉洁,王娟*,张光东*

(南京医科大学口腔疾病研究江苏省重点实验室,南京医科大学附属口腔医院牙体牙髓科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:采用细菌培养技术与 Miseq 测序技术检测牙科综合治疗台水路系统(dental unit waterlines, DUWLs)中的假单胞菌属,以综合评估假单胞菌属在 DUWLs 中的污染情况。**方法:**选择南京医科大学附属口腔医院 25 台口腔综合治疗台作为研究对象。在医院开诊前收集三用枪水样 400 mL,平均分为 2 份,一份用于细菌培养。另一份用于提取细菌基因组总 DNA,经细菌通用引物 PCR 扩增后构建宏基因组文库,用于 Miseq 测序和生物信息学分析。**结果:**25 个样本在不同浓度条件下经细菌培养法均未检出假单胞菌属。16 个样本成功构建宏基因组文库,经 Miseq 测序均检测到假单胞菌属存在,检出率为 100%,假单胞菌属在 16 个样本中的丰度为(3.02±2.12)%。**结论:**DUWLs 中存在低水平的假单胞菌属污染,但假单胞菌属大部分可能处于死亡或“活的非可培养”状态,不具有较大的生物危害性。与传统细菌培养法相比,Miseq 测序技术在特定病原菌的检测方面表现出了较高的敏感性,但无法区分样本中细菌的活性,若要将高通量测序技术用于活性病原菌的检测还需要进一步的研究。

[关键词] 口腔综合治疗台水路系统;假单胞菌属;Miseq 测序技术

[中图分类号] R194.4

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)04-452-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20170414

Determination of the contamination of *Pseudomonas* spp. in dental unit waterlines

Zhou Ruyu, Ping Yifan, Zhang Yuan, Shi Yujie, Wang Juan*, Zhang Guangdong*

(Jiangsu Key Laboratory of Oral Diseases, Department of Endodontics and Operative Dentistry, the Affiliated Stomatology Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the contamination of *Pseudomonas* spp. in dental unit waterlines (DUWLs) and water samples using bacterial culture technique as well as Miseq sequencing technology. **Methods:** Water samples were collected from 25 dental units (DU) at the Affiliated Stomatology Hospital of Nanjing Medical University. Before the opening of the clinic, a water sample of 400 mL was collected from each DU using triple change syringe. Each sample was divided into two parts. One part of the water samples was used for bacterial culture. The other one was used for extraction of the total bacterial DNA, which was subjected to PCR amplification using bacterial universal primers. The PCR products of each sample were constructed using Miseq sequencing technology to complete the sequencing analysis and biological information analysis. **Results:** No *Pseudomonas* spp. was detected by bacterial culture in 25 samples under the condition of different concentrations. The metagenomic libraries were successfully constructed by 16 samples. The detection rate of *Pseudomonas* spp. was 100%. The relative abundance of *Pseudomonas* spp. in 16 samples was accounted for (3.02±2.12)%. **Conclusion:** Low level of contamination of *Pseudomonas* spp. existed in DUWLs. Most clones of the *Pseudomonas* spp. in DUWLs were dead or in viable but nonculturable (VBNC) condition. Thus, *Pseudomonas* spp. presented a low biohazard risk in DUWLs. When compared to bacterial culture, Miseq sequencing technology is more accurate in detecting particular pathogens. However, Miseq sequencing technology has limitation on identification of viable bacterial from dead ones, which may lead to false positive results. It needs further researches using high-throughput sequencing technology for selectively detecting viable pathogens.

[Key words] dental unit waterline; *Pseudomonas* spp.; Miseq sequencing technology

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(04):452-457]

[基金项目] 国家自然科学基金(81300868);江苏省高校大学生实践创新训练计划(201410312010Z)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: candy1249@126.com; egd_zhang@njmu.edu.cn

牙科综合治疗台水路系统(dental unit waterlines, DUWLs)由相互连接的细孔管道组成,为手机、三用枪、超声洁牙手柄等设备提供用水,在牙科治疗过程中用于冷却和冲洗。近年来,许多研究证实

DUWLs 在使用过程中极易被微生物污染, 微生物可在管道内壁形成生物膜, 成为治疗用水的持续污染源^[1-2]。管道水中的微生物可通过口腔直接进入、气雾吸入、直接身体接触等多种方式感染患者及牙科医务工作者, 尤其是免疫缺陷的患者^[3-5]。假单胞菌属是一类广泛分布于土壤及水中的革兰阴性菌, 极易在潮湿的环境中滋生、繁殖, 对消毒剂、紫外线等多种消毒方式具有很强的抵抗力。同时, 它也存在于人类的皮肤、肠道和呼吸道, 是人体的正常菌群之一。但当机体免疫力低下时, 假单胞菌属容易造成机体继发感染, 临床上常见的有皮肤和皮下组织感染、中耳炎、脑膜炎、呼吸道感染、尿道感染、败血症等。以往多次研究均证实了 DUWLs 中假单胞菌属的存在^[6-7]。Martin^[8]曾报道 2 例肿瘤患者在口腔治疗后出现因铜绿假单胞菌感染所致的口腔脓肿, 并从这 2 例患者的脓液中分离出与 DUWLs 管道水中同源的铜绿假单胞菌。

近年来, 高通量测序技术已经成为微生态学研究领域中较为先进的检测手段。与传统分子生物学技术相比, 它具有操作简便、通量高、精度高的优点, 对样本中低浓度的菌群也有着较高的灵敏度。已有研究利用 454 焦磷酸测序技术发现和人体相关的微生物数量约为人体自身细胞数量的 10 倍^[9]。Miseq 是 Illumina 公司于 2010 年新推出的适用于临床实验室的高通量测序平台, 该技术可以从整体上对环境样本微生物群落构成进行分析, 同时拥有较长的读长与高数据量产出的特点, 数据量产出更多, 测序深度更大, 覆盖率更高, 使测序得到的变异信息更加准确^[10]。据此, 本研究拟采用细菌培养技术与 Miseq 测序技术检测 DUWLs 中的假单胞菌属, 以了解 DUWLs 中假单胞菌属的污染程度, 为探索控制口腔科院内感染的策略提供依据, 确保为患者提供优质的水源及医生安全的工作环境。

1 材料和方法

1.1 材料

封口膜(BEMIS 公司, 美国); CFC 假单胞菌琼脂培养基(Oxoid 公司, 英国); 铜绿假单胞菌标准株(南京便诊生物科技有限公司); 细菌基因组 DNA 小量纯化试剂盒、rTaq DNA Polymerase(大连宝生物工程有限公司); AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒(Axygen 公司, 美国)。口腔综合治疗台(Sinora 公司, 德国); SCAN/200 全自动菌落分析仪(Interscience 公司, 法国); GeneAmp 9700 PCR 仪(ABI 公司, 美国); Quan-

tiFluor™-ST 蓝色荧光定量系统(Promega 公司, 美国); Miseq 高通量测序仪(Illumina 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 样本选择

选择南京医科大学附属口腔医院牙体牙髓科及牙周科口腔综合治疗台共 25 台, 其中牙体牙髓科 15 台, 标记为 E1~E15; 牙周科 10 台, 标记为 P1~P10。所有口腔综合治疗台均进行口腔常规门诊治疗, 其水路系统均连接过滤自来水作为水源水。

1.2.2 水样采集和分组

采样时, 戴用无菌手套手执三用枪枪柄, 在开诊前置换上高压灭菌的三用枪头, 启动三用枪水路开关, 空放三用枪水流 30 s, 再使用灭菌试剂瓶采集三用枪水样 400 mL, 封口膜封口。采集另一椅位水样时更换另一灭菌过的三用枪头。取得水样后迅速转移至微生物实验室超净工作台中, 水样涡旋震荡 15 s, 于 4℃ 下, 6 000 r/min 离心 3 min, 收集菌体沉淀, 2 000 μL 灭菌 ddH₂O 重悬, 均分至 2 个 1.5 mL 灭菌离心管中, 分别用于细菌培养和 Miseq 测序。

1.2.3 细菌培养和计数

在超净工作台中分别将样品梯度稀释 10 倍、100 倍, 分别吸取各样品及稀释液 100 μL 均匀涂布于直径 90 mm 的 CFC 假单胞菌琼脂培养基上, 37℃ 需氧恒温培养箱倒置培养 48 h。每份样品同时做 3 个平行样, 并以相同方法将铜绿假单胞菌标准株接种于同批次 CFC 假单胞菌琼脂培养基作为阳性对照。培养结束后, 使用 SCAN/200 全自动菌落分析仪进行菌落计数, 计算每毫升水样中含菌落总数。

1.2.4 Miseq 高通量测序

使用细菌基因组 DNA 小量纯化试剂盒按说明书提取样本中的细菌基因组 DNA, 并通过 $D(260 \text{ nm})$ 的值和 $D(260 \text{ nm})/D(280 \text{ nm})$ 的比值评估提取 DNA 的浓度和质量。采用细菌通用引物 515F (5'-GT-GCCAGCMGCCGCGG-3') 及 907R (5'-CCGTCAATTCM-TTTRAGTTT-3') 扩增对应于 16S rRNA 的 V4~V5 区。PCR 反应体系 20 μL: 10× Buffer 4 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 1.6 μL, 上游、下游引物各 0.8 μL, rTaq 酶 0.2 μL, BSA 0.2 μL, DNA 模板 10 ng, 其余为无菌 ddH₂O。扩增反应程序为: 95℃ 预变性 3 min; 95℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 27 个循环; 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用 Quanti-Fluor™-ST 蓝色荧光定量系统进行检测定量。由上海美吉生物医药科技有限公司利用 Illumina Miseq PE300 平台进行高通量测序及数据分析。

1.2.5 数据分析

每个样本随机抽 30 000 条优化序列利用 Mothur 软件(version 1.30, <http://www.mothur.org/>), 绘制稀释性曲线。通过 Usearch 软件平台(version 7.1, <http://drive5.com/uparse/>) 在 97% 的相似水平下对非重复序列(剔除单序列)进行 OTU 聚类。基于优化处理的 OTUs, 计算细菌多样性指数。采用 RDP classifier 算法, 选取置信度 0.7 为临界阈值, 对 97% 相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析, 分别在门和属水平统计每个样品的群落组成。通过 16S 细菌数据库 Silva (Release119, <http://www.arbsilva.de/>) 进行比对。

2 结果

2.1 细菌培养检测结果

25 个样本在 1、10、100 倍稀释浓度下均未检出假单胞菌属。

2.2 Miseq 测序检测结果

25 个样本中, 16 个样本成功构建宏基因组文库。经过数据优化, 16 个样本共得到 602 743 条优化序列, 其中牙体组 379 503 条, 序列平均长度 394 bp; 牙周组 223 240 条, 序列平均长度 393 bp。99.82% 的序列长度为 301~400 bp。每个样本至少抽取 30 000 条序列进行分析。

稀释性曲线显示(图 1), 在 5 000 条序列前, OTU 数量随取样深度增加大幅增加; 在 5 000~15 000 条序列时, OTU 数量的增加趋于平缓; 当取样深度达到 25 000 条序列时, 各组的 OTU 数量进入平台期, OTU 量基本达到饱和。香农-威纳 (Shannon-Wiener) 曲线(图 2)显示随着测序量的增加, 香农-威

纳指数 (Shannon-Wiener diversity index) 不断增加; 当取样深度达到 5 000 条序列时, 各组曲线均进入了平台期。16 组的平均测序覆盖深度 (coverage 指数) 均大于 99.10%, 表明测序数据量合理, 能够覆盖样本 97% 的物种, 可以进行下一步分析。

在属水平, 共检出 63 个不同的属水平序列, 包括 42 个菌属, 3 个暂定种以及 18 个未被分类或是尚未被培养出的菌属(图 3), 另有一些丰度极低的序列, 不能归为任何菌属, 纳入其他(others)。丰度值大于 1% 的菌属包括: *Candidatus Bacilloplasma*、*Candidatus Hepatoplasma*、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、厌氧芽胞杆菌属 (*Anoxybacillus*)、施莱格尔氏菌属 (*Schlegelella*)、*Reyranelle*、*Dysgonomonas*、*Tepidimona*、丙酸菌属 (*Propionibacterium*)、噬甲基菌属 (*Methylophilus*)、埃希菌属 (*Escherichia-Shigella*)、*Silanimonas*、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)。

16 个样本共检测出了 7 种条件致病菌属: 假单胞菌属、噬甲基菌属、埃希菌属、不动杆菌属、军团菌属 (*Legionella*)、链球菌属 (*Streptococcus*)、黄杆菌属 (*Flavobacterium*)。其中, 假单胞菌属在 16 个样本中的检出率为 100%, 丰度最高 8.32%, 最低 0.52%, 平均 $(3.02 \pm 2.12)\%$, 检出丰度是 7 个条件致病菌属中最高的。即使在丰度高达 8.32% 的样本中, 培养法也未检测出假单胞菌的存在。

3 讨论

假单胞菌属广泛分布于各种自然环境中, 水、土壤、空气、人的体表和体内都有这种细菌的存在。作为一种条件致病菌, 假单胞菌属在一般情况下不会造成人体感染。但当宿主正常免疫防御机制被改变

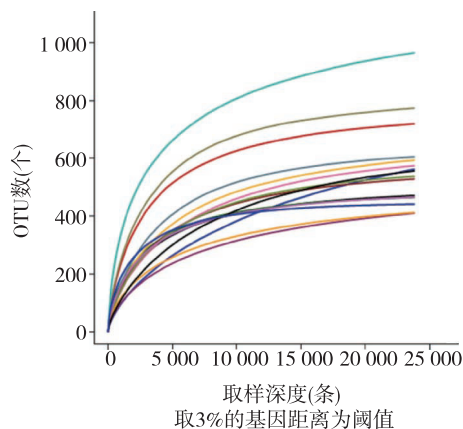


图 1 16 个样本的稀释性曲线(取 3% 的基因距离作为阈值)
Figure 1 Rarefaction analysis of 16 samples at 3% divergence

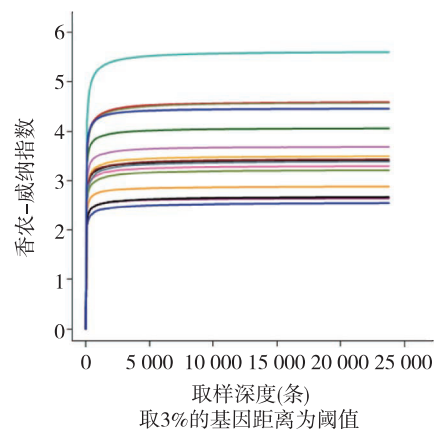


图 2 16 个样本的香农-威纳曲线(取 3% 的基因距离作为阈值)
Figure 2 Shannon-Wiener analysis of 16 samples at 3% divergence

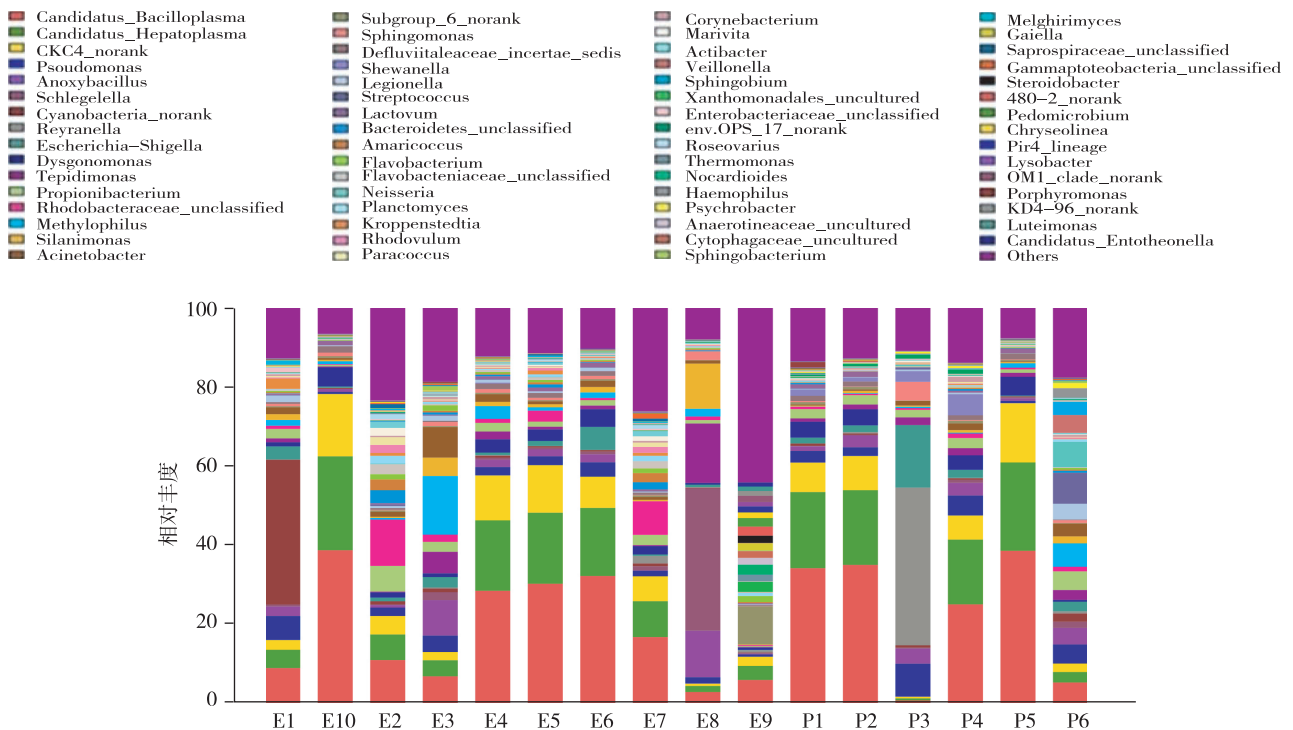


图 3 16 个样本菌群在属水平上的分类

Figure 3 Dominant bacterial community of 16 samples at the genus level

或受损时,假单胞菌属可造成局部感染,严重时可导致重症感染或败血症的发生。Blake^[11]早在 1963 年首次报道了 DUWLs 中的微生物污染,国外牙科行业逐渐开始重视细菌污染问题,并就此作了一系列研究,研究表明 DUWLs 中可分离出多种条件致病菌,假单胞菌属是最常见的机会致病菌之一^[12]。目前,已有文献报道疑似因假单胞菌属污染 DUWLs 导致患者在牙科治疗后发生感染的病例^[8]。本研究采用 CFC 假单胞菌琼脂培养基对 25 个 DUWLs 水样进行了细菌培养,在不同浓度条件下均未检出假单胞菌属的存在;而在高通量测序成功的 16 个样本中均检测到了假单胞菌属的存在,丰度从 0.52%~8.32% 不等。与培养法相比,Miseq 测序技术表现出了更高的敏感性,能够检测出难以培养的、丰度低的细菌。

培养法是目前应用最广泛的水源性病原菌检测方法^[13-14],但自然界的环境状态十分复杂,很难做到完全还原。培养法通常根据细菌种类选择培养基、制定培养条件,人为制造一个相对适宜细菌生长、繁殖的环境。对于数量较多、容易培养的菌种,通常都能使用培养法进行检测。但当样本中细菌含量较低或是细菌基因发生突变时,细菌就难以在培养基上形成菌落,容易造成“假阴性”的检测结果。班海群等^[15]在 2007—2009 年对我国 30 所口腔医院共 1 368 份水样进行细菌培养检测,多所医院检出了铜绿假单

胞菌。而 Göksay 等^[16]对土耳其伊斯坦布尔市的 59 个 DUWLs 水样进行了细菌培养,仅在其中的 14 个样品中检测出了假单胞菌属,检出率为 24%。Barbeau 等^[17]指出 DUWLs 中可培养的微生物菌落数仅占其总量的 4% 或更少。活的非可培养(viable but non-culturable, VBNC)状态是细菌为了适应不良生存环境而形成的一种自我保护状态。处于 VBNC 状态的病原菌,虽然并不具备在培养基上产生新菌落的能力,但其毒性因子依然能够高表达,具有潜在传播疾病的风险。当周围环境适应生长时,又能继续生长、分裂,可在培养基上形成菌落。

导致 VBNC 状态出现的 3 个最常见因素是寡营养状态、低渗透压环境以及消毒剂的使用^[18]。Khan 等^[19]通过建立一个寡营养、低渗透压环境将铜绿假单胞菌成功诱导进入 VBNC 状态。Bedard 等^[20]将铜绿假单胞菌暴露在游离氯浓度为 2 mg/L 的溶液中 24 h 即可诱导细菌进入 VBNC 状态。Peneau 等^[21]证实荧光假单胞菌被含氯消毒剂处理后可被诱导进入 VBNC 状态,在适宜条件下又可恢复分裂生长。考虑到本研究的 25 个样本水源均来自市政供水,过滤的自来水多使用氯化法进行消毒;由于氯气极易溶于水,自来水中往往存在一定浓度的氯。其次,经处理后的自来水中细菌所需的营养物质含量极低,细菌处于一个相对寡营养的状态。细菌在自来水中长期

处于低渗透压环境,其生长、繁殖也都因此受到了抑制。所以,寡营养状态、低渗透压环境以及低氯浓度这 3 个因素可能共同导致 DUWLs 中的假单胞菌属处于 VBNC 状态。以上种种因素可能是该方法未能检出假单胞菌属的主要原因。

近年来,高通量测序技术发展迅速,特别是第二代测序技术的出现,使得环境微生物多样性研究步入了测序的时代。高通量测序技术已经成为微生物生态学研究较先进的检测手段。与传统分子生物学技术相比,它具有操作简便、通量高、精度高的优点,对样本中低浓度的菌落也有着较高的灵敏度。本研究采用的 Miseq 测序技术是 Illumina 公司新推出的适用于临床实验室的高通量测序平台,采用 Illumina 成熟的 TruSeq 边合成边测序技术。使用的边测序边合成技术和双向测序技术在确保了每个循环反应只能延伸一个正确互补的碱基,大大提高准确率的同时,又可在短时间内获得大量数据;具有通量高、速度快、精度高、准确率高^[10]的优点。因此,即使是含量极低、难以培养的菌种,也可以通过高通量测序技术从分子层面进行检测,从而有效避免“假阴性”检测结果。与传统培养法相比,高通量测序技术无需考虑细菌状态、细菌数量及培养条件,表现出了更高的敏感度。

高通量测序技术也存在一定缺陷,高通量测序的检测结果可能同时包含了正常状态的活菌、VBNC 状态的细菌和已经失去活性的死菌,在一定程度上高估了 DUWLs 中活性假单胞菌属的数量。假单胞菌具有很强的生存能力,对寡营养环境和低浓度消毒剂都有比较强的抵抗力,即使是定期使用消毒剂或是使用独立水源的 DUWLs 也多次检出过假单胞菌属^[17]。但是部分活力较弱的细菌,可能由于无法适应不良环境,在进入 DUWLs 前或进入不久后就失去了活性。正常情况下,死菌的 DNA 分子会在环境中存留数天至数周后才能被完全降解。因此,死细胞 DNA 或自由状态的 DNA 也能参与 PCR 扩增^[22],进而经由高通量测序检出,存在一定的“假阳性”风险。高通量测序对送样的 DNA 质量有一定的要求,就 Miseq 测序平台而言,一般要求参与测序的 DNA 总量不小于 50 ng。与其他自然环境样本相比,本研究选取的 DUWLs 中的细菌污染程度较低,细菌总量较少。因而有 9 个样品提取的细菌总 DNA 量无法达到构建文库的要求,导致了高通量测序失败。在其余 16 个样本中高通量测序检测出了复杂的菌群构成,包括 9 个菌门、42 个菌属以及数个未知菌

属。在检出的 42 个菌属中,31 个菌属的丰度值均低于 1%。在假单胞菌属检测方面,假单胞菌属平均序列丰度为 3.02%,检出率为 100%。Costa 等^[6]采用 454 焦磷酸测序检测法国普瓦捷市 7 个 DUWLs 水样的细菌多样性及确定其潜在的细菌致病序列。该研究共检出 394 个属水平序列,优势菌属为:寡养单胞菌属(8±16)%、军团菌属(6±13)%、盐单胞菌属(3±2)%以及假单胞菌属(2±3)%。其假单胞菌属的丰度与本研究结果较为相似,但在细菌群落构成上与本研究存在较大差异。DUWLs 出水的微生物组成同时取决于 DUWLs 水源的水质情况以及管道内部形成的生物膜;其中,水源的水质状况是决定 DUWLs 出水水质的主要原因。通常认为水源中的微生物及矿物质含量越高,越容易在管道内壁上沉积,越利于有机分子黏附及细菌黏附增殖,形成细菌生物膜^[23];相应地,DUWLs 出水中微生物种类及数量就越多。水源水质状况可能是不同地区 DUWLs 细菌群落差异的主要原因。

目前已有多个报告指向 DUWLs 中的微生物可能是牙科患者术后感染的原因,但尚无直接证据表明 DUWLs 中的细菌污染会导致水源性传染病的发生。Jensen 等^[24]评估了免疫功能低下的囊肿纤维化患者在牙科治疗时受铜绿假单胞菌感染的风险,发现即使是极易被感染的囊肿纤维化患者,其因接触牙科治疗用水导致新发生的铜绿假单胞菌感染率也仅 1%~2%。但是文章最后提出频繁的牙科治疗可能导致感染风险的显著增高。有文献报道能导致健康人发生感染的铜绿假单胞菌浓度需大于 1.5×10^6 cfu/mL^[8]。本研究中 25 个样本通过培养法未检出假单胞菌属,其中 16 个测序成功的样本检出的假单胞菌属丰度仅为 3.02%左右,提示 DUWLs 中的假单胞菌属多数处于死亡或 VBNC 状态。牙科患者及医护人员在牙科治疗时可接触到的活性假单胞菌属数量极少,远小于致病量。因此,健康人群在接触 DUWLs 水后受到假单胞菌属感染的可能性极低。本研究的结果有助于更好地了解与牙科治疗相关的潜在传染性风险,并更好地管理 DUWLs 的水质质量。

本研究调查的两个口腔科室的 DUWLs 水样中假单胞菌属含量较少,在环境总细菌中占比较低,可能绝大部分处于死亡或是 VBNC 的状态,不具备较大的生物危害性。但考虑到目前口腔科免疫系统缺陷的患者日益增多,仍然应该加强 DUWLs 水质监控。与传统培养法相比,高通量测序技术可以更敏感地检测出环境中的假单胞菌属,但也存在不能区分

死菌和活菌的缺陷,存在一定的“假阳性”风险。如何使用高通量测序技术选择性地检测环境中的活性细菌还需要进一步研究。

[参考文献]

- [1] Francolini I, Donelli G. Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2010, 59(3): 227-238
- [2] 俞雪芬, 卢洁霞. 一种牙科综合治疗台无菌化供给系统的微生物实验研究[J]. *口腔医学*, 2016, 36(1): 22-24
- [3] Lal S, Singhrao SK, Bricknell M, et al. Monitoring Dental-Unit-Water-Line output water by current in-office test Kits [J]. *Curr Microbiol*, 2014, 69(2): 135-142
- [4] Szymańska J. Evaluation of mycological contamination of dental unit waterlines [J]. *Ann Agric Environ Med*, 2005, 12(1): 153-155
- [5] Güngör ND, Kadaifçiler DG, Peker OÖ. Investigation of the bacterial load and antibiotic susceptibility of dental units [J]. *Environ Monit Assess*, 2014, 186(3): 1847-1853
- [6] Costa D, Mercier A, Gravouil K, et al. Pyrosequencing analysis of bacterial diversity in dental unit waterlines [J]. *Water Res*, 2015, 81(14): 223-231
- [7] Costa D, Mercier A, Gravouil K, et al. Occurrence and diversity of both bacterial and fungal communities in dental unit waterlines subjected to disinfectants [J]. *Pathog Dis*, 2016, 74(7): 1-11
- [8] Martin MV. The significance of the bacterial contamination of dental unit water systems [J]. *Br Dent J*, 1987, 163(5): 152-154
- [9] Gill SR, Pop M, Deboy RT, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome [J]. *Science*, 2006, 312(5778): 1355-1359
- [10] Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(26): 11971-11975
- [11] Blake GC. The incidence and control of bacterial infection in dental spray reservoirs [J]. *Br Dent J*, 1963, 115: 413-416
- [12] Szymańska J, Sitkowska J, Dutkiewicz J. Microbial contamination of dental unit waterlines [J]. *Ann Agric Environ Med*, 2008, 15(2): 173-179
- [13] EPA US. Water quality standards for coastal and Great lakes recreation waters [S]. 2006
- [14] 中华人民共和国地面水环境质量标准 [C]//上海市饮用水水源地战略研讨会论文集. 2004
- [15] 班海群, 张宇, 张流波. 全国 30 所医院口腔科用水污染状况分析 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2011, 21(6): 1094-1097
- [16] Göksay D, Cotuk A, Zeybek Z. Microbial contamination of dental unit waterlines in Istanbul, Turkey [J]. *Environ Monit Assess*, 2008, 147(1/3): 265-269
- [17] Barbeau J, Tanguay R, Faucher E, et al. Multiparametric analysis of waterline contamination in dental units [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(11): 3954-3959
- [18] Oliver JD. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2010, 34(4): 415-425
- [19] Khan NH, Ahsan M, Taylor WD, et al. Culturability and survival of Marine, freshwater and clinical pseudomonas aeruginosa [J]. *Microbes Environ*, 2010, 25(4): 266-274
- [20] Bdard E, Charron D, Lalancette C, et al. Recovery of Pseudomonas aeruginosa culturability following copper and chlorine-induced stress [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2014, 356(2, SI): 226-234
- [21] Peneau S, Chassaing D, Carpentier B. First evidence of division and accumulation of viable but nonculturable pseudomonas fluorescens cells on surfaces subjected to conditions encountered at meat processing premises [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(9): 2839-2846
- [22] Wang SS, Levin RE. Discrimination of viable Vibrio vulnificus cells from dead cells in real-time PCR [J]. *J Microbiol Methods*, 2006, 64(1): 1-8
- [23] 关素敏, 贺建军. 牙科综合治疗台水路污染及其对策 [J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2013, 23(10): 669-673
- [24] Jensen ET, Giwerzman B, Ojeniyi B, et al. Epidemiology of pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis and the possible role of contamination by dental equipment [J]. *J Hosp Infect*, 1997, 36(2): 117-122

[收稿日期] 2016-12-07