

# 水中粪大肠菌群检测方法研究

林娜

(浙江诚德检测研究有限公司,浙江 宁波 315000)

**摘要:**以水中粪大肠菌群为主要研究对象,对水中粪大肠菌检测原理、检测流程以及检测方法进行讨论,具体包括发酵法、滤膜法、纸片快速检测法以及酶底物法,并且对几种水中粪大肠菌群检测方法进行详细对比,从而选出最佳的水中粪大肠菌群检测方法,以期为业内人士提供参考依据。

**关键词:**粪大肠菌群;水体环境;检测方法

中图分类号:R123.1

文献标识码:A

文章编号:1004-7344(2023)47-0175-03

## 0 引言

粪大肠菌群不仅存在于排泄物或人、动物肠道内,在各地水体环境中也检测出粪大肠菌群,这种情况会导致整个水体环境被污染,诱发肠道病原菌感染<sup>[1]</sup>。做好粪大肠菌群的检测工作,不仅能充分掌握监测水源区域粪大肠菌群的 actual 污染情况,而且也能第一时间开展预测、以及流行病的控制提供有利条件。

## 1 粪大肠菌群检测原理及检测流程

### 1.1 发酵法原理及其检测流程

发酵法适用于地表水、地下水、生活污水和工业废水中粪大肠的测定。首先,针对发酵法检测原理来讲,经上文的分析可以明确,粪大肠菌群能都对乳糖起到分解作用的同时,产酸产气,在多管发酵阶段,乳糖蛋白胨培养基颜色会发生变化,并逐渐出现气泡。其次,针对发酵法检测流程来讲,粪大肠菌群主要是借助乳糖蛋白胨多管进行发酵,在实验培养阶段,应从以下5点入手:①开展无菌实验,科学合理的对其进行消毒和灭菌处理,避免实验环境存有细菌。阳性及阴性对照实验,确保阳性菌株呈阳性反应,阴性菌株呈阴性反应。②筹备水样样本,组建实验组,以水样污染程度为基础,科学合理的明确接种量。通常情况下,可采用10mL、1mL、0.1mL。③准备三倍乳糖蛋白胨培养液或者单倍乳糖蛋白胨培养液,如果接种体积为10mL的情况下,则可应用三倍乳糖蛋白胨培养液,而针对单倍乳糖蛋白胨培养液来讲,更加适宜应用在接种体积≤1mL的情况下。④针对初发酵实验来讲,充分混匀被检测水样,并将其装入培养液试管中,值得注意的是,要确保储存试管和5份培养液全部完成灭菌与消毒处理。并

且将其放置在(37.0±0.5)℃的条件下培养(24±2)h。如果在培养的过程中发现产酸产气的现象,则证明阳性反应。⑤复发酵实验,对初发酵实验呈阳性反应的试管轻微摇晃,在恒温为(44.5±0.5)℃条件下培养(24±2)h。值得注意的是,在复发酵阶段,培养基中可能会出现其他种类菌落。若想确保目标菌落的纯度,要将其他菌落放置在温度为(45.5±0.5)℃条件下的EC肉汤培养基中单独培养(24±2)h,在培养的过程中,要观察其是否存在阳性产气现象,如果存在,则表明滋生了粪大肠菌群。在发酵阶段,通过最大可能数MPN值与指数关系开展科学、精准的精算工作<sup>[2]</sup>。

$$C = \frac{MPN \times 100}{f} \quad (1)$$

式中:C——样品中粪大肠菌群数,MPN/L;MPN——每100mL样品中粪大肠菌群,MPN/100mL;f——实际水样最大接种量,mL;100——10×10mL,其中10将MPN值的单位MPN/100mL转换为MPN/L,10mL为MPN表中最大接种量,mL。

现阶段,在我国粪大肠菌群的众多检测方式中,乳糖蛋白胨多管发酵法的应用较为常见,且在全世界范围内的应用都较为普遍。对此,世界各地研究人员在乳糖蛋白胨多管发酵法方面达成一致,此类检测方式成为国际标准检测方式。乳糖蛋白胨多管发酵法的优势为成本低、技术要求不高、不需要投入大量的人力、结果精准性较高等;劣势为实验操作过程烦琐、检测时间长,在获得实验结果之后,需要专人验证实验结果是否精准<sup>[3]</sup>。

在采用乳糖蛋白胨多管发酵法的过程中,对于实

验团队人员数量也有着一定的要求,因此,基层机构难以确保乳糖蛋白胨多管发酵法的应用效果。随着我国科技水平日新月异的发展,也带动了乳糖蛋白胨多管发酵法的进一步发展,并且逐渐发展为五管法、十二管法、以及十五管法。

## 1.2 滤膜法原理及其检测流程

滤膜法适用于地表水、地下水、生活饮用水和工业废水中粪大肠菌群的测定,但当样品浑浊度较高时,应选用其他方法。首先,滤膜法原理如下。实验人员要做好实验环境与仪器的灭菌、消毒等工作,将微孔滤膜放入过滤器内,倒入水样,利用抽滤法对水样进行过滤。在抽滤后,细菌被截留在滤膜上。将滤膜与培养基表面充分结合在一起,并科学合理的开展接种作业,将其放置在恒温为(44.5±0.5)℃环境下实施培养,在整个培养的过程中,实验人员应对其进行全面的观察。如果培养基滋生粪大肠菌群的情况下,要求实验人员其判断是否满足粪大肠菌群特点,做好菌落计数,测定样品中粪大肠菌群浓度。

其次,滤膜法检测流程如下。①对检测水样进行过滤处理,对工具进行灭菌消毒之后,借助工具夹起灭菌滤膜边缘,观察细腻的一面,并将其放在下面,将细腻面的滤膜放入过滤器内紧贴滤床,实施灭菌处理、添加水样。添加水样时根据样品的种类判断接种量,最小的过滤体积为10mL,如接种量小于10mL应逐级稀释。利用吸管提取待检测水样,值得注意的是,对于吸管同样也要进行灭菌消毒后方可使用,开启过滤器阀门实施负压50kPa的抽滤。②培养细菌,在对水样进行过滤之后,对实验仪器中的气体进行抽出,5s之后关闭过滤器阀门。将过滤器下置,带菌落膜放置在MFC培养基表面开展接种作业。在接种的过程中,要防止滤膜吸附菌种的一面朝下,将滤膜紧密贴合在培养基表面,如若不然,则可能会对菌种的正常生长带来不利影响。在培养之后,做好培养皿的密封处理,并将其放入温度为(44.5±0.5)℃培养箱中培养(24±2)h。③对实验数据进行全面统计,计算菌落数量。粪大肠菌群颜色是蓝色或者蓝绿色,与其他菌落颜色对比来讲,粪大肠菌群颜色好区分,再加上在培养环境温度的作用下,其他菌落可能会与培养基试剂发生反应<sup>[9]</sup>。在培养中止之后,通过区分颜色,便可以判断粪大肠菌群菌落,对其数量进行统计之后,以体积与浓度关系为基础,获得每升水样中

大肠菌群菌落的实际数量。计算公式:粪大肠菌群菌落数=  $\frac{\text{滤膜上生长的粪大肠菌群菌落数} \times 1000}{\text{过滤水样量}}$ 。

最后,每次实验都要进行对照实验,分为空白对照和阳性阴性对照。空白对照即每次实验都要用无菌水进行空白测定。阳性及阴性对照即阳性菌株呈阳性反应,阴性菌株呈阴性反应。

## 1.3 纸片快速检测法原理及其检测流程

纸片法适用于地表水、废水中粪大肠菌群的快速测定。首先,纸片快速检测法原理如下。针对实验阶段的滤纸吸收选择性培养基来讲,要确保滤纸和培养基之间贴合的紧密性,做好培养温度与培养时间的把控,培养时间为24h。细菌在繁殖的过程中,难免会形成酸,导致溴甲酚紫指示剂颜色发生变化,与此同时,脱氢酶会促使底物还原为三苯甲腈,颜色成红色,简而言之,如果黄色背景下产生红色斑点的情况下,则可明确样品中是否滋生粪大肠菌群、以及滋生之后的粪大肠菌群浓度。其次,纸片快速检测流程如下。具体来讲,纸片快速检测法和发酵法的流程大同小异。清洁水样取10mL水样量纸片5张,每张接种水样10mL;然后,1mL水样量纸片10张,其中5张接种水样各1mL,另5张各接种1:10的稀释水样1mL。受污染的水样接种3个不同稀释度的1mL稀释水样各5张。接种好的纸片将其放置在温度为(44.5±0.5)℃的恒温培养箱中培养18~24h,观察有无菌落形成。当然每次实验都要进行空白测定,培养后的纸片上不得有任何颜色反应,并使用标准菌株进行阳性、阴性对照实验。菌落阳性反应参考:①纸片上出现红斑或红晕且周围变黄。②纸片全片变黄,无红斑或红晕。菌落阴性反应参考:①纸片部分变黄,无红斑或红晕。②纸片的紫色背景上出现红斑或红晕,而周围不变黄。③纸片无变化<sup>[9]</sup>。记录菌落数量和纸片阳性情况,查MPN值表得到MPN值,按式(2)换算并报告1L水样中粪大菌群数:

$$C=100 \times \frac{M}{Q} \quad (2)$$

式中:C——水样总大肠菌群或粪大肠菌群浓度,MPN/L; M——查MPN表得到的MPN值,MPN/100mL; Q——实际水样最大接种量,mL; 100——10×10mL,其中10将MPN值的单位MPN/100mL转换为MPN/L,10mL为MPN表中最大接种量,mL。

### 1.4 酶底物法原理及检测流程

酶底物适用于地表水、地下水、生活污水和工业废水中粪大肠菌群的测定。首先,酶底物法原理如下。众所周知,大肠菌群菌落能形成 $\beta$ -半乳糖苷酶,并对乳糖起到分解的作用,从而导致培养基有菌区域颜色出现变化。统计阳性反应出现数量,计算样品中粪大肠菌群的浓度值。其次,酶底物法检测流程如下。①根据样品污染程度确定接种量,避免样品培养后出现全部阳性或全部阴性。对于未知样品,可选用多个接种量进行检测。②将被检测水样容量控制在100mL,对量瓶进行消毒、灭菌处理之后,取出100mL测试水样或稀释样品,在水样中添加MMO-MUG粉末,并将粉末与水样充分融合在一起。③将准备好的水样溶液全部倒入97孔定量盘。④如果在定量盘产生气泡的情况下,用手抚平97孔定量盘背面,然后用程控定量封口机封口。⑤将其放置在温度为 $(44.5\pm 0.5)^{\circ}\text{C}$ 环境下培养并观察 $(24\pm 2)\text{h}$ 。在此阶段,如果检测水样颜色发生了变化的情况下,则表明被检测水体滋生了粪大肠菌群,分别记录97孔定量盘中大孔和小孔阳性孔数。从97孔定量盘法MPN中查得每100mL中粪大肠菌群的MPN值后,再根据不同稀释度,按式(3)换算成粪大肠菌群数:

$$C = \frac{\text{MPN} \times 1000}{f} \quad (3)$$

式中:C——样品中粪大肠菌群数,MPN/L;MPN——每

100mL样品中粪大肠菌群,MPN/100mL;f——实际水样最大接种量,mL;1000——将C单位由MPN/mL转换成MPN/L。

同样每次实验都要进行空白对照和阴性阳性对照。空白对照就是用无菌水按步骤进行测定,培养后的97孔定量盘不得有任何颜色反应,否则该次实验判定无效。阴性阳性对照就是用标准菌株制成菌悬液,按步骤进行操作,阳性菌株呈现阳性反应,阴性菌株呈现阴性反应。

### 2 检测方式的检测结果对比

多管发酵法、滤膜法、纸片快速检测法以及酶底物法检测结果如表1所示。通过对表1的分析可以明确,粪大肠菌群不同的检测方式也存在一定的不同。针对发酵法和滤膜法来讲,发酵法流程复杂、限制因素多、可行度低,再加上发酵法所耗实验周期久,因此,发酵法应用不常见,滤膜法更为方便,但滤膜法有其局限性,其对浑浊度较高的样品,无法检测。纸片快速法与发酵法相对比而言,纸片快速法顾名思义,其操作流程简单,不需要确认实验,再加上精准度高,经济实惠等优势,其在对结果要求时间短的粪大肠菌群检测中更为常见。针对酶底物法来讲,其同样操作简单,一次实验即可完成检测,但在技术方面有着一定的难度,同时所需成本较高。

表1 粪大肠菌群不同检测方式的检测对比

检测方式	技术难度	操作步骤	确认实验	检测时间	实验室适用性
多管发酵法	简	繁琐	需要	48-72h	较精准、便宜
滤膜法	简	简易	不需要	22-26h	较精准、便宜
纸片快速检测法	简	简易	不需要	18-24h	较精准、便宜
酶底物法	难	简易	不需要	18-24h	精准、昂贵

### 3 结语

综上所述,在粪大肠菌群检测中,发酵法、滤膜法的应用较为普遍,值得注意的是,粪大肠菌群不同的检测方式,都有其独特的优势与劣势,因此,在粪大肠菌群检测未来发展的过程中,要求业内人士加大不同检测方式的研究力度,尽可能减少检测成本的同时,避免投入大量的检测时间,与此同时,也要注重检测效率和检测结果精准性的提升。

#### 参考文献

[1] 黄河笑,杨涛,李显芳,等.三峡库区市政污泥中粪大肠菌群发酵检测方法适用性研究[J].广东化工,2022,49(3):159-160.

- [2] 何敏,张亚娟,周艳红,等.水中粪大肠菌群检测方法的对比[J].净水技术,2018,37(9):19-22.
- [3] 马娟,高正.不同检测方法对粪大肠菌群检测的敏感性探讨[J].临床医学研究与实践,2016,1(27):143-144.
- [4] 张绮纯,刘森林,李燕,等.水中粪大肠菌群检测方法的研究[J].绿色科技,2016(16):109-110.
- [5] 李宗全,黄芳,许江.总大肠菌群/粪大肠菌群检测方法中酶底物法封口技术的改进[J].环境科学导刊,2014,33(增刊1):90-91.

作者简介:林娜(1995—),女,汉族,浙江宁波人,大专,助理工程师,研究方向为环境微生物检测。