

粪大肠菌群检测方法及其研究进展

张少峰, 刘国强, 魏春雷

(国家海洋局北海海洋环境监测中心站, 广西 北海 536000)

摘 要: 采取精确、快速、可靠的粪大肠菌群检测方法, 对确保海水浴场和水产养殖的健康发展、控制流行疾病的发生传播, 从而保障公众健康安全及生态平衡有重要的预报价值和科学意义。在参阅国内外大量文献的基础上, 详细归纳了检测粪大肠菌群发酵法、滤膜法、酶底物法、聚合酶链式反应技术、荧光原位杂交技术、自动化检测方法等的各自的优缺点及研究进展, 并认为今后一段时间内粪大肠菌群检测新技术将与传统方法并存, 在新技术支持下的精确、快速、可靠、环保、低廉的检测仪器将会被研发和得到应用与普及。

关键词: 粪大肠菌群; 大肠杆菌; 检测方法; 研究进展

中图分类号: X834 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-6932(2008)03-0102-0005

粪大肠菌群是一类能使乳糖发酵、产酸产气的需氧及兼性厌氧的革兰氏阴性无芽孢杆菌。该菌群一般主要有以下 4 个菌属细菌组成: 埃希氏菌属、产气杆菌属、枸橼酸菌属和副大肠菌属。这些菌属可以在人、畜粪便中检出, 有的也可以在营养丰富水体中检出, 即在非粪便污染的情况下, 也有检出这些细菌的可能性。我国《海洋监测规范》规定, 海水中大肠菌群检测采用 44 °C 培养法检测“粪大肠菌群”, 并把 37 °C 培养检测出的大肠菌群称之为“总大肠菌群”。粪大肠菌群组成与总大肠菌群组成相同, 但主要组成是埃希菌属, 在此菌属中与人类生活密切相关的仅有一个种, 即大肠埃希氏菌; 大肠埃希氏菌又称大肠杆菌或普通大肠杆菌, 它是人和混血动物肠道中的正常寄生细菌。作为粪便污染的最佳指示菌, 大肠埃希氏菌检出的意义最大, 其次是粪大肠菌群, 总大肠菌群的检测意义略差一些^[1]。

粪大肠菌群是水质污染的重要指标之一^[2], 对于评价海水被生活污水和工业废水污染的程度和正确认识海洋生态系统的特征有重要的参考价值。从而为合理评价海水水质类别和海水浴场的游泳适宜度^[3], 进而有效管理利用沿岸水体的休闲及娱乐功能具有重要现实意义; 同时也为海域的环境保护和海洋资源的可持续利用提供技术支持。

沿海城市近岸海域特别是海水浴场和各种养殖水域若遭受到粪大肠菌群的严重污染可能会引起流行疾病发生^[4]。因此精确、快速、可靠的粪大肠菌群检测方法对于准确及时地监测海域粪大肠菌群的污染状况和检测海产品卫生质量, 从而有效预报和控制流行疾病的发生与传播有重要意义。

1 粪大肠菌群检测方法

1.1 发酵法^[5] (multiple-tube fermentation, MTF)

1.1.1 原理 利用大肠菌群繁殖时使乳糖发酵并能使乳糖蛋白胨培养液变黄同时产生气泡的原理。

1.1.2 检测方法 (1) 初发酵实验: 以无菌操作等量吸取 10 mL 经充分摇匀的水样, 分别加入 5 支各盛有 5 mL 已灭菌的三倍浓缩乳糖蛋白胨培养液的试管中; 等量吸取 1 mL 水样, 分别加入 5 支各盛有 10 mL 已灭菌普通浓度的乳糖蛋白胨培养液的试管中; 吸取 1 mL 水样注入盛有 9 mL 已灭菌清洁的陈海水的试管中, 摇匀。然后等量吸取 1 mL 此种稀释液于 5 支盛有 10 mL 已灭菌普通浓度的乳糖蛋白胨培养液的试管中, 于 44 °C 培养 (24 ± 2) h, 产酸产气者视为可疑菌群。(2) 复发酵实验: 将可疑菌群

收稿日期: 2007-06-25; 收修改稿日期: 2007-08-09

基金项目: 中国南部沿海生物多样性管理项目(SCCBD-HT002)

管接种于 EC 培养液中,于 44 °C 培养 (24 ± 2) h,在此期间内所得的产气阳性管即证实有粪大肠菌群存在。依据阳性管数查表^[6],计算每升水样中粪大肠菌群数的最近似值 (most probable number, MPN)。

1.2 滤膜法^[5] (membrane filter, MF)

1.2.1 原理 将水样注入已灭菌的放有微孔滤膜的滤器中,经过抽滤。细菌即被截留在滤膜上,然后将滤膜贴于合适的培养基上进行培养。

1.2.2 检测方法 (1) 水样抽滤:于滤器内先加入约 10 mL 已灭菌的清洁海水,然后再用已灭菌吸量管吸取一定量的充分混匀的待检水样,加入滤器中。在负压 50 kPa 下进行抽滤,快滤完前加入灭菌海水少许以冲洗滤器内壁,使水样内的细菌全部集中于滤膜上。(2) 细菌培养:用灭菌镊子夹取滤膜边缘部分,移放在 M-TEC 培养基上,滤膜截留细菌面向上,滤膜与培养基完全紧贴不能有气泡,然后将平板倒置,放入 37 °C 恒温箱内培养 0.5 h,再移至 44 °C 恒温箱内培养 18 ~ 24 h,粪大肠菌群落呈黄色,计数此类菌落数目。对于疑难的菌落,可取一部分进行涂片、染色、镜检。另一部分接种于 EC 培养液内,经 44 °C 培养 24 h 后观察是否产气,以决定此类可疑菌落是否为粪大肠菌群细菌。然后计算每升水样中粪大肠菌群数的最近似值 (MPN)。

1.3 酶底物法^[7] (enzyme substrate t EC hnique, EST)

1.3.1 原理 酶底物法采用大肠菌群细菌能产生 β-半乳糖苷酶 (β-D-galactosidase) 分解 PG (Orthonitrophenyl-β-D-galactopyranoside) 使培养液呈黄色,以及大肠埃希氏菌产生葡萄糖醛酸酶 (13-glucuronidase) 分解 MUG (4-methY1-umbellifery-β-D-glucuronide) 使培养液在波长 366 nm 紫外光下产生荧光的原理,来定量分析水样中粪大肠菌群数。

1.3.2 检测方法 酶底物法采用 51 孔定量盘法,此方法是一种基于 MPN 的方法。检测所需水样为 100 mL。用 100 mL 的无菌稀释瓶量取 100 mL 水样,加入 (2.7 ± 0.5) g MMO-MUG 培养基粉末,混摇均匀使之完全溶解,将水样全部倒入 51 孔无菌定量盘内,以手抚平定量盘背面以赶除孔穴内气泡,然后用封口机封口。放入 44 °C 培养箱中培养 24 h 后进行结果判读,将培养 24 h 之后的定量盘取出观察,如果孔穴内的水样变成黄色则表示该孔穴中含有大肠菌群。将定量盘在暗处用波跃为 366 nm 的紫外光灯照射,有黄色反应的孔穴如果有蓝色的荧光产生则表示该定量盘孔穴中含有大肠埃希氏菌。计算有黄色反应及有荧光的孔穴数,对照 MPN 表查出其代表的粪大肠菌群最可能数。

1.4 聚合酶链式技术 (polymerase chain reaction, PCR)

1.4.1 原理 大肠菌群中普遍存在 LacZ 基因 (β-半乳糖苷酶基因)^[8] 和大肠杆菌的 UdiA 基因 (β-D-半乳糖苷酶基因),利用 PCR 技术扩增编码约 260 bp LacZ 基因和约 150 bp UidA 基因的 DNA 片段,可以分别检测大肠菌群数和大肠杆菌^[9]。

1.4.2 检测方法 (1) DNA 的提取:根据 Yuli Tsai 的建立的提取细菌 DNA 方法^[10],10 mL 和 1 mL 水样样本 (简称大样本和小样本) DNA 的提取分别用 Degrange^[11] 等人的方法和蛋白酶 K 法。(2) DNA 的定量测定:用紫外分光光度计测定 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 的吸收值,并以此判断 DNA 的纯度和浓度。(3) PCR 扩增反应:预变性、变性、复性、延伸、扩增、延伸。(4) PCR 扩增产物的检测:使用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察电泳结果并拍照,产物分析参照 DNA 分子量标准。(5) 结果比较:纯培养大肠杆菌 DNA 与水样菌体 DNA 的 PCR 扩增产物的电泳结果进行比较,如果两对引物在大肠杆菌和水样标本 DNA 为模板的扩增中,出现了位置相同的扩增条带。根据 DNA 分子量标准推算,两个条带的大小分别约为 260 bp 和 150 bp,这说明设计的引物对大肠杆菌是特异的,也说明在采集的水样中有大肠杆菌和大肠菌群的存在,反之不存在。进而确定水样中粪大肠菌群数的最近似值 (MPN)。

1.5 荧光原位杂交技术 (fluorescent in situ hybridization, FISH)

1.5.1 原理 核酸杂交以碱基配对原理为基础,利用寡核苷酸探针与靶细胞专一性结合进行生物分析。核酸分子杂交的高度特异性和检测方法的高度灵敏性,使核酸杂交技术在环境微生物的检测得到广泛应

用, 并对它们的存在、分布、丰度和适应性可以进行定性和定量分析。

1.5.2 检测方法 选择专门针对 *E.coli* 的 rRNA 的荧光标记探针序列, 可以从一些文献中查到如 EC 1531^[12]、COLINSINTU^[13]、PNA^[14] 等。利用寡核苷酸探针与靶细胞专一性结合进行生物分析。核酸杂交的基本实验步骤为: 细胞固定、杂交(其专一性和严格性依赖于杂交温度和时间、盐浓度、探针长度及其浓度)、洗脱(去除与靶细胞没有结合的和非专一性结合的物质)。杂交细胞通常用落射荧光显微镜检测, 利用 DAPI 等进行负染色后可以测定细胞总数。利用流式细胞仪(flow cytometry)可以对于每一个靶细胞一探针杂交物的荧光强度进行定量测定, 然后确定菌群数^[15]。

1.6 自动化检测方法 (Automatization)

目前世界上检测粪大肠菌群最快的设备当属法国专利产品水质细菌自动在线分析仪, 可在 6 h 自动出一次测量, 有数据库存储等功能, 是一种功能强、经济实用的全自动菌落分析仪^[16]。该分析仪拍摄的微生物菌落图像非常清晰, 可观察菌落最小为 0.08 mm, 并获得菌落直径, 可以利用该功能进行简单的抑菌圈测量, 也可根据统计的日期、编号或备注等对以往统计进行搜索查询, 免除了繁琐的人工记录和人为差错。另外一种相对较快的大肠杆菌检测设备是军事医学科学院研制的水质细菌检验箱, 其基本原理也是使用发酵法^[16], 6 ~ 15 h 后可得到粪大肠菌群数的监测结果。

1.7 其它方法

利用抗体与抗原特异性结合免疫荧光法、利用有色溶液对单色光的吸收程度与溶液及液层厚度间的定量关系的快速比色法及上述方法的改进方法^[17]。

2 各检测方法的优缺点比较

在粪大肠菌群检测方法中发酵法和滤膜法是传统的检测方法, 操作步骤繁杂、干扰因素多, 专一性差, 需要确认实验, 因此检测周期较长, 需 48 ~ 72 h, 不适于大量样品的分析。但传统方法具有原理简单、费用较低、利于推广的优点, 因此仍是常规监测中的主要检测方法。各检测方法的优缺点比较见表 1。

表 1 粪大肠菌群各检测方法优缺点比较
Tab. 1 Comparison of merits and demerits among the test methods on fecal coliforms

检测方法	技术难易	步骤繁杂	确认实验	检测时间	准确度	检测费用
发酵法	易	繁琐	需要	48 — 72 h	较准确	较便宜
滤膜法	易	繁琐	需要	48 — 72 h	较准确	较便宜
酶底物法	难	简易	不需要	18 — 24 h	精确	昂贵
聚合酶链式反应	难	繁琐	不需要	6 — 8 h	较准确	昂贵
荧光原位杂交	难	繁琐	不需要	6 — 8 h	精确	十分昂贵
自动化检测方法	难	简易	不需要	6 — 15 h	较准确	十分昂贵

酶底物法可以较好地弥补传统方法的不足, 该法操作简便, 检测时间 18 ~ 24 h 或更短, 结果可靠, 无需确认试验, 且可以同时检测水中大肠菌群和大肠埃希氏菌的污染状况, 能够较精确地判断水样的微生物污染状况。并且此种方法已经被世界各国国家及地方实验室和世界各国组织机构认可^[18]。

PCR 技术用于大肠菌群的检测仍然处于研究阶段, 技术的复杂性和检测费用较高等原因使此方法目前还不能广泛用于粪大肠菌群的日常检测。将 PCR 技术用于用水样品中粪大肠菌群的检测, 还有许多技术上的限制需要突破。虽然这种方法已经成功地应用于大肠菌群和大肠杆菌的检测, 需要指出的是, 大多数研究者是将其用于加入人工培养的微生物菌株水样的实验分析, 而用于实际环境样品的分析较少。PCR 是一种具有高度专一性的检测和鉴定方法, 但应用于实际环境样品分析, 尤其是对不可培养的、活的或具有

代谢活性的微生物进行检测时, 存在一些限制^[19]。PCR 技术最初主要用于微生物的定性分析, 而不是定量分析, 尽管发展了定量 PCR 技术, 但 PCR 诊断技术的假阴性和假阳性的比例较高, 尚缺乏精度, 有待于进一步改进。

FISH 技术是细胞水平上的一种高度专一性检测方法。它可以在 8 h 内给出定量检测的结果。目前, FISH 技术用于粪大肠菌群计数分析受水样中菌群浓度、缺乏营养物导致细菌处于饥饿状态和胁迫环境等因素的影响, 因此 FISH 技术没有广泛用于粪大肠菌群的常规监测。FISH 技术应用于水样品中微生物学分析尚需进一步研究, 以优化对高浓度、饥饿细胞和胁迫环境中细菌的计数条件^[15]。FISH 目前的灵敏度已经接近或达到 PCR 的水平, FISH 技术有极低的假阳性、假阴性的比例, 可以很好地弥补 PCR 技术的局限。但其操作步骤较烦琐, 技术复杂, 目前仅可以对水样中低浓度菌群进行计数, 不利于大规模推广。

自动化检测方法操作简单、检测快速、准确, 但购买仪器一次投入过大, 也不利于推广普及。

3 前景与展望

本文通过对粪大肠菌群检测方法的综合分析比较, 认为酶底物法、聚合酶链式反应技术、荧光原位杂交技术、自动化检测方法等检测技术将在未来取代发酵法、滤膜法等传统方法, 并且酶底物法极有可能在近期成为评价水质微生物污染的快速标准检测方法之一。随着分子生物学的发展及原理的利用, 微生物的检测方法发生了质的更新, 使微生物的检测技术向更快速、更精确、更简便的方向发展。但虽然有些新的检测技术在理论上是可靠的, 而实际操作中可能会受诸如检测环境条件、微生物的状态以及人为因素等的限制, 因此要实现实际操作应用与普及还需要经历一个长期的反复验证完善过程, 需要在验证的过程中不断改进操作细节, 使新技术的精确度得到认可。

新检测技术的应用普及, 不仅与操作技术的简易程度和精确度有关, 也与检测设备和试剂的费用高低、对环境的影响等方面有关。随着科技进步, 一些对环境副作用小、廉价的试剂将会在新技术中应用, 虽然在今后一段时间内, 传统方法与新技术将并存的局面还难于改变, 但自动化检测方法将是监测工作的发展方向, 在新技术支持下, 精确、快速、可靠、环保、低廉的检测仪器将会被研发和得到应用与普及。

参考文献:

- [1] 王秀茹. 预防医学微生物学及检验技术 [M]. 人民卫生出版社, 2002, 676-679.
- [2] 国家质量技术监督局. 海水水质标准 [S]. 北京: 中国标准出版社, 1998, 15-16.
- [3] 姜欣欣. 采用粪大肠菌群评价海水浴场水质等级及污染源研究 [J]. 生态环保园林, 2005, NO.11, 25-26.
- [4] 潘蔚明. 海洋渔业环境监测中的细菌监测 [J]. 海洋水产科技, 1994, NO.1, 38-41.
- [5] 国家质量技术监督局. 《海洋监测规范》第七部分: 近海污染生态调查和生物监测 [S]. 北京: 中国标准出版社, 1999, 59-65.
- [6] WHO.Guidelines for Drinking Water Quality Vol.3 Drinking Water Quality Guide Control in Small-Community Supplies [S]. Geneva, 1978, p.84.
- [7] 孙宗科 吴榕, 等. 水中大肠菌群快速检测方法—酶底物法与多管发酵法的比较 [J]. 卫生研究, 2006, 35(4), 497-498.
- [8] 何维, 吴鹤龄. 广泛用于基因表达调控研究中的 LacZ 基因 [J]. 遗传, 1995, 17(5), 45-46.
- [9] 明镇寰 黄朴, 等. 聚合酶链式反应(PCR)用于检测环境水体指示菌的研究[J]. 环境科学学报, 1999, 18(5), 540-545.
- [10] Tsai Yuli, Olson B H. Det EC tion of low numbers of baeterlal cells in solis and sedments by polymerase chain reaction [J]. Appl Environ Micmbiol, 1992, 58, 2 292-2 295.
- [11] Degrange V, Rardin R. Det EC tion and counting of Nitrobacter population in soil by PCR[J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61, 2093-2098.
- [12] Poulsen L K, Lan F, Kristensen C S, et al. Spatial distribution of Escherichia coli in the mouse large intestine in ferred from rRNA in situ hybridization [J]. Inf EC t Immun, 1994, 62, 5 191-5 194.
- [13] Regnault B, Martin-Delautre S, Lejay-Collin M, et al. Oligonucleotide probe for the visualization of Escherichia coli / Escherichia fergusonii cells by in situ hybridization: sp EC ificity and potential application [J]. Res Microbial, 2000, 151, 521-533.
- [14] Prescott A M, Fricker C R. Use of PNA oligonucleotides for the in situ det EC tion of Escherichia coli in water [J]. Mol Cell Probes, 1999, 13,

261-268.

- [15] 王建龙. 荧光原位杂交(FISH)技术检测水体中大肠菌群研究 [J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(2), 70-73.
- [16] 宋铭航, 张静. 海水浴场环境自动监测系统研究 [J]. 海洋技术, 2003, 22(4), 12-13.
- [17] 赵菊香. 水质细菌快速检测方法简介 [J]. 水资源保护, 1999, 57(3), 42-44.
- [18] 高瑞坤. 美国环保署的大肠菌群检测技术 [J]. 福建分析测试, 2006, 15(2), 36-37.
- [19] 王建龙. PCR 技术检测水体中大肠菌群的研究 [J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(7), 60-64.

作者简介: 张少峰 (1981 —), 男, 学士, 助工, 主要从事海洋生态环境监测。电子邮箱: unusualcenter@163.com

Test Methods and Research Progress in Fecal Coliforms

ZHANG Shaofeng, LIU Guoqiang, WEI Chunlei

(Beihai Marine Environmental Monitoring Center Station of SOA, Beihai 536000, Guangxi, China)

Abstract: Adopting the exactitude, celerity, credibility test methods of fecal coliforms has important value for forecast and the scientific meaning to ensure the development of bathing beach and aquiculture, and control the occurrence and spread of prevalent diseases, and to ensure the healthiness and safety of the public and zoology balance. Based on abroad reading literatures in and aboard, this article concludes the process and recent advances of testing fecal coliforms, including multiple-tube fermentation, membrane filter, enzyme substrate technique, polymerase chain reaction, fluorescent in situ hybridization and automation, and comparing their advantages and disadvantages. On this basis, we maintain that traditional methods and new technologies will coexist. Supported by new technology, the accurate, celerity, reliable, environmental and low detection equipment will be researched, applied and popularized.

Keywords: fecal coliforms; *E. coli*; test method; research progress