

分析与监测

酶底物法与多管发酵法检测总大肠菌群差异分析

王晋宇¹, 赵旭坤², 郭志宇¹, 陈玲瑚¹

(1. 苏州市自来水公司水质检测中心, 江苏 苏州 215002; 2. 爱德士緬因生物制品贸易
<上海>有限公司, 上海 200336)

摘要: 采用酶底物法和多管发酵法同时检测长江中下游地区地表水中的总大肠菌群, 结果表明, 参照《生活饮用水标准检验方法 微生物指标》(GB/T 5750.12—2006), 酶底物法在肠杆菌属的检出灵敏度上显著高于多管发酵法, 而在埃希氏菌属的检出灵敏度上基本一致, 酶底物法可以作为评价水质微生物污染的快速准确检测方法用于水厂日常的检测工作。

关键词: 总大肠菌群; 多管发酵法; 酶底物法

中图分类号: X832 **文献标识码:** C **文章编号:** 1000-4602(2012)16

Analysis of the Difference between Method of Enzyme Substrate Technique and Multiple Tube Fermentation Technique in Determination of Total Coliforms

WANG Jin-yu¹, ZHAO Xu-kun², GUO Zhi-yu¹, CHEN Ling-hu¹

(1. Water Quality Detection Center of Suzhou City Water Company, Suzhou 215002, China;
2. IDEXX Laboratories (Shanghai) Co. Ltd., Shanghai 200336, China)

Abstract: Total coliforms in surface water of Middle-Lower Yangtze Area were detected by method of enzyme substrate technique and multiple tube fermentation technique. The result showed that according to GB/T5750.12-2006, the sensitivity of detection of Enterobacter by the method of enzyme substrate technique was higher than the method of multiple tube fermentation technique and the sensitivity of detection of Escherichia were essentially consistent. Enzyme substrate technique could be used as a rapid and accurate detection method in routine detection work in the evaluation of microbial contamination in water.

Key words: Total Coliforms; Multiple Tube Fermentation Technique; Enzyme Substrate Technique

总大肠菌群作为国内对地表水进行卫生学评价的主要指标之一, 主要用来评价水体被粪便污染的程度, 并间接地表明水体中存在肠道致病菌的可能性^[1], 也有文献报道^[2]总大肠菌群可以在营养丰富的水体中检出。

国内目前检测地表水中的总大肠菌群主要是多管发酵法, 其检测时间较长, 并且需验证实验, 步骤繁琐, 不能对水的卫生学状况做出快速评价。也有

文献报道^[3,4], 可以采用PCR技术、免疫学等方法检测大肠菌群, 这些方法虽然灵敏度高、特异性强, 但由于检测仪器成本相对较高, 很难在水厂内得以广泛应用。而酶底物法可以采用成品的培养基及试剂, 操作方便, 无需确认实验, 检测时间较短, 18~24 h即可得出结果, 易于在水厂推广。

笔者在实际工作中发现当采用酶底物法和多管发酵法同步检测长江中下游地区太湖水域和长江水

域多个样品时,二者的检测结果有一定差异,于是对两种方法的检测结果进行了比较和分析。

1 试验部分

1.1 材料与试剂

酶底物法采用的科利得试剂以及51孔定量盘均由爱德士公司提供;

多管发酵法采用的乳糖-蛋白胨培养基购自上海盛思生化科技有限公司;

标准菌株购自中国工业微生物菌种保藏管理中心。

1.2 试验方法

多管发酵法和酶底物法检测均参照《生活饮用水标准检验方法 微生物指标》(GB/T 5750.12—2006)。

细菌鉴定:将多管发酵法和酶底物法阳性结果接种于分离培养基,挑取典型菌落接种于LB肉汤培养基培养后,抽提菌株的总DNA作为模板,使用16SrRNA基因的通用引物27F(5'-AGAGTTTGATC-MTGGCTCAG-3')和1492R(5'-GGYTACCTTGT-TACGACTT-3')进行PCR扩增^[5],阳性片段大小约1.5 kb。做50 μL的反应体系:10~50 ng的模板DNA、各引物终浓度为1 ng/μL,各dNTP终浓度为200 μmol/L, MgCl₂终浓度为2.5 mmol/L, 5 μL 10 × PCR Buffer, 2.5 U的TaqDNA聚合酶,补充ddH₂O到总体积50 μL。PCR反应程序:94℃起始变性5 min; 94℃变性1 min, 50℃退火1 min, 72℃延伸1.5 min, 做30个循环; 72℃最后延伸5 min。扩增后序列送上海英俊生物技术公司测序。

2 结果与讨论

2.1 实际水样检测结果

分别采用多管发酵法和酶底物法检测长江中下游地区太湖水域、长江水域的地表水水样中的总大肠菌群,检测结果见图1。从图1可以看出,对于长江水域地表水水样,两种方法检测的总大肠菌群结果基本一致,对两种方法检测的大肠菌群结果进行配对t检验,检验结果表明多管发酵法与酶底物法具有显著的相关性($P < 0.05$),检测结果没有统计学意义上的差异。而对于太湖水域水样,采用多管发酵法的样品基本未检出,无法与酶底物法检测结果相比较。因此,有必要对长江水域和太湖水域地表水样品中的微生物分布情况进行确认。

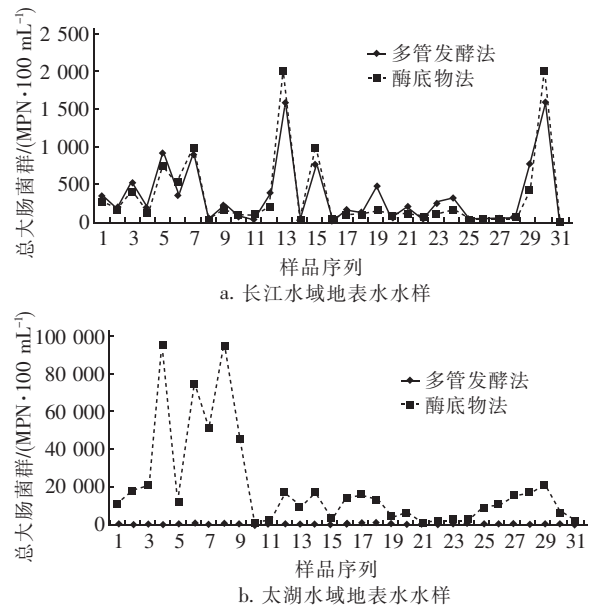


图1 水样检测结果

Fig. 1 Detection Results of Surface Water

2.2 确认试验

分别选取30个长江水域和太湖水域酶底物法和多管发酵法阳性管进行鉴定,结果表明,长江水域30个阳性管中的28个为埃希氏菌属,另外2个为肠杆菌属;太湖水域所有阳性管均鉴定为肠杆菌属。

通过确认试验可以看出,采用乳糖-蛋白胨培养基可以较灵敏地对埃希氏菌属进行鉴定,但是对肠杆菌属的鉴定相对较弱,可能原因是肠杆菌属会发生延迟发酵现象^[6]。而酶底物法采用邻硝基苯β-D-半乳糖苷(ONPG)作为底物,可以诱导细菌产生β-半乳糖苷酶,而具有β-半乳糖苷酶是埃希氏菌属和肠杆菌属的重要特征之一^[7],因此,检测结果会高于多管发酵法。

2.3 大肠埃希氏菌和阴沟肠杆菌标准菌株试验

为了对上述结果进行进一步验证,采用标准菌株分别再次进行总大肠菌群酶底物法与多管发酵法检测,并且将乳糖发酵时间延长至48 h。为保证试验结果的精确和方便统计,采用生理盐水对埃希氏菌属代表菌大肠埃希氏菌(CICC 10305)和肠杆菌属代表菌阴沟肠杆菌(CICC 22927)培养液进行稀释,使得最终水样的MPN值在200 MPN/100 mL以下。检测结果如表1所示。由表1可以看出,采用多管发酵法和酶底物法检测对大肠埃希氏菌进行检测,检出结果基本一致。而采用多管发酵法检测阴沟肠杆菌,培养24 h,所有乳糖发酵管均阴性,培养

48 h 后的结果与酶底物法的检测结果基本吻合,在一定程度上验证了肠杆菌属乳糖发酵延迟的结论。

表1 标准菌株检测结果

Tab. 1 Result of standard strain detection

项目	样品编号	MPN · 100 mL ⁻¹		
		多管发酵法 24 h	多管发酵法 48 h	酶底物法
大肠埃希氏菌 CICC 10305	1	46	70	23.8
	2	70	70	73.8
	3	120	120	94.5
	4	79	79	78.2
	5	79	110	69.7
阴沟肠杆菌 CICC 22927	1	<2	47	109.1
	2	<2	54	88.5
	3	<2	62	94.5
	4	<2	17	53.1
	5	<2	94	165.2

3 结论

酶底物法在肠杆菌属的检出灵敏度上显著高于多管发酵法,而在埃希氏菌属的检出灵敏度上两种方法基本一致。从总大肠菌群检测的灵敏度、操作简便程度以及快捷性上考虑,酶底物法可作为评价水质微生物污染的快速准确检测方法在水厂中得以推广。然而,考虑到多管发酵法成本较低,在国内部分欠发达地区还有一定市场,建议相关部门参照《食品微生物学检验 大肠菌群计数》(GB 4789.3—

2010),将 GB/T 5750.12—2006 中多管发酵法测定总大肠菌群的乳糖发酵时间延长到 48 h,这样检测结果会更准确。

参考文献:

- [1] 关丽梅,钟宁. 三种方法检测水中总大肠菌群的比较探讨[J]. 福建分析测试,2009,18(1):65-67.
- [2] 孙宗科,吴榕,丁培,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.
- [3] 马颖,龙腾锐. PCR 技术检测饮用水中大肠杆菌[J]. 中国给水排水,2004,20(9):93-95.
- [4] 吴卿,赵新华. 饮用水中大肠菌群检测方法研究进展[J]. 中国给水排水,2004,20(9):27-30.
- [5] DeLong E F, Preston C M, Mincer T, et al. Community genomics among stratified microbial assemblages in the ocean's interior[J]. Science,2006,311:496-503.
- [6] 杨毓环,马群飞. 从天然矿泉水水源中检出乳糖迟缓发酵的产气肠杆菌及其卫生学意义[J]. 海峡预防医学杂志,1999,5(1):58-58.
- [7] 田刚,王金良,刘晓兰. β-半乳糖苷酶用于定量肠杆菌测定的探讨[J]. 江西医学检验,1999,17(2):116-116.

E-mail: wangsh4@sina.com

收稿日期:2011-12-06