

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

孙宗科 吴榕¹ 丁培 薛金荣 陈西平² 张雅婕³ 张淑红⁴ 遇晓杰⁵

中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所,北京 100021

摘要:目的 比较酶底物法与多管发酵法用于水中大肠菌群的检测方法的优劣和结果的一致性。方法应用加标试验和实际水样检测的方式,比较酶底物法与传统的多管发酵法用于水中大肠菌群检测结果的一致性,以及假阳性率。结果 酶底物法与多管发酵法用于水中大肠菌群检测结果具有一致性($P=0.059$),假阳性率无统计学意义的差别($P=1.000$)。结论 酶底物法可以用作评价水质微生物污染的标准方法。

关键词:大肠菌群 酶底物法 快速检测 给水卫生
中图分类号: R123.5 **文献标识码:** B

Comparison between rapid detection method of enzyme substrate technique and multiple-tube fermentation technique in water coliform bacteria detection

Sun Zong-ke, Wu Rong, Ding Pei, Xue Jin-Rong, et al.

Institute for Environment Hygiene and Health Related Product Safety, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100021, China

Abstract: **Objective** To compare between rapid detection method of enzyme substrate technique and multiple-tube fermentation technique in water coliform bacteria detection. **Methods** Using inoculated and real water samples to compare the equivalence and false positive rate between two methods. **Results** Results demonstrate that enzyme substrate technique shows equivalence with multiple-tube fermentation technique ($P=0.059$), false positive rate between the two methods has no statistical difference. **Conclusion** It is suggested that enzyme substrate technique can be used as a standard method for water microbiological safety evaluation.

Key words: coliform bacteria, enzyme substrate technique, multiple-tube fermentation technique, rapid detection

目前中国对生活饮用水、水源水、地表水等进行卫生学评价,检测的指标为大肠菌群(coliform bacteria)和粪大肠菌群(faecal coliforms),以这两种指标作为粪便污染的指示菌。采用的标准检测方法为膜过滤法(MF)和多管发酵法(MTF)。但这两种方法检测时间相对较长,需2~5天,需验证试验,试验步骤较为繁琐,不能对水的卫生学状况做出快速评价。因此,采用快速简便的检测方法十分必要。酶底物法可以较好的弥补传统方法的不足。

酶底物法(enzyme substrate technique)采用大肠菌群细菌能产生-半乳糖苷酶(-D-galactosidase)分解ONPG(Orthonitrophenyl-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(-glucuronidase)分解MUG(4-methyl-umbelliferyl-D-glucuronide)使培养液在波长366nm紫外

光下产生荧光的原理,来判断水样中是否含有大肠菌群及大肠埃希氏菌。酶底物法可以采用成品的培养基及试剂,操作方便;无需确认试验;酶底物法检测时间较短,18~24h即可同时判断水样中大肠菌群和大肠埃希氏菌的MPN值。

由于酶底物法用于水样定量检测时采用最可能数(MPN, most probable number)的技术和方法,所以,本项试验中比较酶底物法与多管发酵法用于水样的检测。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本试验中酶底物法采用指定受检物检验技术(DST, defined substrate technology),其MMO-MUG培养基、试验材料和仪器由爱德士公司提供,试验菌株来源于中国普通微生物菌种保藏管理中心和中国医学微生物菌种保藏管理中心,细菌鉴定用API 20E由生物梅里埃公司提供。其它所用培养基与试剂按《生活饮用水卫生规范》2001准备和配置。

1.2 试验方法

1.2.1 多管发酵法检测大肠菌群和粪大肠菌群方法参见《生活饮用水卫生规范》2001。

1.2.2 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100ml。用100ml的无菌稀释

基金项目:GB/T 5750《生活饮用水标准检验方法》修订工作项目

作者简介:孙宗科,男,实习研究员

1 农业部食品质量监督检验测试中心(上海)

2 责任作者

3 北京市疾病预防控制中心

4 河北省疾病预防控制中心

5 黑龙江省疾病预防控制中心

瓶量取 100ml 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 37℃ 培养箱中培养 24 小时后进行结果判读,如果结果为可疑阳性,可延长培养时间到 28 小时,超过 28h 之后出现的颜色反应不作为阳性结果。将培养 24 小时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长为 366nm 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 表查出其代表的大肠菌群及大肠埃希氏菌最可能数。

1.2.3 分别应用两种方法对大肠埃希氏菌加表水样和环境水中水样进行检测,比较两种方法结果的一致性,同时比较检测水样的假阳性率。

1.3 数据统计

数据整理统计方法使用 excel 和 SPSS10.0 软件中的 *t* 检验。

2 结果

2.1 大肠埃希氏菌加标试验结果

对大肠埃希氏菌 32 件加标水样进行大肠菌群酶底物法与多管发酵法进行比对实验。

对检出的结果进行配对 *t* 检验,检验结果表明多管发酵法与酶底物法检测结果没有统计学意义上的差别 ($P = 0.384$)。

2.2 水样检测结果

采取地表水水样进行检测,为保证试验结果的精确和方便统计,要求水样有一定的阳性检出率,同时水样的 MPN 值应尽量控制在 100MPN/100ml 以下,以 10 ~ 30MPN/100ml 为宜^[1]。在本项试验中采用 100 件地表水水样同时进行大肠菌群和大肠埃希氏菌(或粪大肠菌群)的检测。

2.2.1 大肠菌群检测结果 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检测结果没有统计学意义上的差别 ($P = 0.059$)。

2.2.2 大肠埃希氏菌检测结果 对两种方法检测的大肠埃希氏菌与粪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检测结果有统计学意义上的差别 ($P = 0.000$),多管发酵法检出的粪大肠菌群要多于酶底物法检出的大肠埃希氏菌。对两种方法检测结果进行线性回归分析,回归分析结果表明:回归系数 (*B*) 为 0.544,标准化回归系数 (*Beta*) 为 0.851,回归系数 *t* 检验 $t = 16.049$, $P = 0.000 < 0.05$,可认为酶底物法检测结果与多管发酵法结果之间有相关关系。

2.3 确认试验

为比较两种方法的假阳性率,对大肠菌群试验结果进行确认试验。取水样进行预试验后,使水样 MPN 值控制在 5 ~ 30MPN/100ml 之间。取 6 个水样进行验证试验,其中多管发酵法阳性管数为 30,酶底物法阳性数为 53。

2.3.1 结果确认试验方法。

2.3.1.1 多管发酵法 将初发酵阳性结果接种亮绿乳糖胆盐肉汤,取阳性结果在麦康凯琼脂平板上划出单菌落,挑取典型菌落接种于胰蛋白胨大豆琼脂培养基 (TSA) 上培养后进行 API 20E 的鉴定。

2.3.1.2 酶底物法 将酶底物法阳性结果在麦康凯琼脂平板上划出单菌落,挑取典型菌落接种于胰蛋白胨大豆琼脂培养基 (TSA) 上培养后进行 API 20E 的鉴定。

2.3.2 确认试验结果 经确认试验表明,多管发酵法 30 管阳性管中全部鉴定为大肠菌群细菌,其中 19 管鉴定为大肠埃希氏菌;酶底物法 53 个孔中有 52 个鉴定为大肠菌群细菌,另一个鉴定为嗜水气单胞菌,其中 19 个孔鉴定为大肠埃希氏菌。两种方法验证的大肠菌群结果如附表。

附表 两种方法验证的大肠菌群阳性结果比较

Table Positive results of both methods			
实验方法	真阳性	假阳性	合计
多管发酵法	30	0	30
Colilert 法	52	1	53
合计	82	1	83

对验证结果经卡方检验 (费歇尔精确概率法, Fisher's Exact Test),在 $\alpha = 0.01$ 水准上, $P = 1.000$,认为多管发酵法和酶底物法对大肠菌群检测结果的假阳性率没有区别。

3 讨论

通过以上试验证明酶底物法与多管发酵法相比从结果一致性和假阳性率方面无统计学意义上的显著性差异,说明酶底物法可以作为评价水质微生物污染的标准方法。在两种方法检测粪大肠菌群(或大肠埃希氏菌)上有统计学意义上的差别,这可能是由于酶底物法检测的指标是大肠埃希氏菌、多管发酵法检测的指标是粪大肠菌群引起的。由回归分析可以看出,酶底物法检测结果与多管发酵法检测结果有直线回归关系。

总大肠菌群细菌主要由以下 4 个菌属细菌组成:埃希氏菌属、柠檬酸菌属、克雷伯菌属和肠杆菌属。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。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;柠檬酸菌属、克雷伯菌属和肠杆菌属所占数量较少。作为粪便污染的指示菌,大肠埃希氏菌检出的意义最大,其次是粪大肠菌群,总大肠菌群的检出意义略差一些^[1]。

酶底物法相对于传统的多管发酵法具有明显的优点:操作简便,检测时间较短 (18 ~ 24h),无需确认试验,可同时检测水中大肠菌群和大肠埃希氏菌的污染状况,能够较为准确地判断水样的微生物污染状况。酶底物法必将成为评价水质微生物污染的快速标准检测方法。

4 参考文献

- 王秀茹. 预防医学微生物学及检验技术. 人民卫生出版社, 2002, 676-679

(2006-04-20 收稿)