

水中粪大肠菌群快速检测方法 - 固定底物酶底物法与多管发酵法的比较

高瑞坤¹, 汤琳², 付强³ (1.厦门市环境监测中心站, 福建 厦门 361004; 2.上海环境监测中心, 上海 200030; 3.中国环境监测总站, 北京 100012)

摘要: 目的在于比较固定底物酶底物法与多管发酵法用于水中粪大肠菌群(耐热大肠菌群)的检测,使用科立得™(Colilert®)试剂和传统方法检测地表水、水源水及污水水样,比较固定底物酶底物法与多管发酵法用于水中粪大肠菌群(耐热大肠菌群)检测结果的一致性。结果表明,固定底物酶底物法与多管发酵法用于水中粪大肠菌群(耐热大肠菌群)检测结果具有一致性,固定底物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: 粪大肠菌群(耐热大肠菌群); 固定底物酶底物法科立得™(Colilert®); 多管发酵法; 快速检测
中图分类号: X832 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-6002(2008)04-0039-03

Comparison between rapid detection method of Defined Substrate Technology(DST) enzyme substrate technique and multiple-tube fermentation technique in water Fecal bacteria (Thermotolerant coliform bacteria) detection

GAO Rui-kun¹, et al (1. Xiamen Environmental Monitoring Centre, Xiamen 361004, China)

Abstract: In order to compare between rapid detection method of Defined Substrate Technology(DST) enzyme substrate technique and multiple-tube fermentation technique in water Fecal bacteria (Thermotolerant coliform bacteria) detection, use 科立得™(Colilert®) and traditional method to test real water samples are included in this experiment. Results demonstrate that Defined Substrate Technology(DST) enzyme substrate technique shows equivalence with multiple-tube fermentation technique. It is suggested that Defined Substrate Technology(DST) enzyme substrate technique can be used as a standard method for water microbiological safety evaluation.

Key words: Fecal bacteria (Thermotolerant coliform bacteria); Defined Substrate Technology(DST) enzyme substrate technique 科立得™(Colilert®); Multiple-tube fermentation technique; Rapid detection

目前水中粪大肠杆菌群(耐热大肠菌群)检测方法主要有传统的滤膜法及多管发酵法,并且已经列入环保行业标准方法(HJ/T 347-2007),此两种传统方法被国内环境检测部门广泛采用,但上述方法操作时间需2~5天,步骤较为繁琐,需验

证试验,不能对水的卫生学状况做出快速评价,制约了其应用。且多管发酵法每毫升水样中最低检出限为2个粪大肠菌群,而固定底物酶底物法却能抑制200万个异样细菌,精确检测到1个粪大肠菌群。因此,采用快速简便且精确的检测方法

收稿日期:2008-07-08

作者简介:高瑞坤(1963-),男,福建泉州人,工程师。

参考文献:

- [4] Gitelson A, Mayo M, Yacobi Y Z, et al. The use of high spectral radiometer data for detection of low chlorophyll concentrations in Lake Kinneret [J]. J. Plankton Res. 1994,16: 993-1002.
- [5] Hoge F, Swift R. Ocean color spectral variability studies using solar induced chlorophyll fluorescence [J]. Applied Optics. 1987,26:18-2.
- [6] Iluz D, Yacobi Y Z, Gitelson A. Adaptation of an algorithm for chlorophyll - a estimation by optical data in the oligotrophic Gulf of Eilat [J]. Int. J. Remote Sensing. 2003,24(5): 1157-1163.
- [7] Schalles J F, Gitelson A, Yacobi Y Z, Kroenke A E. Chlorophyll estimation using whole seasonal, remotely sensed high spectral - resolution data for an eutrophic lake [J]. J. Phycol. 1998,34:383-39.
- [8] Yacobi Y Z, Gitelson A, Mayo M. Remote sensing of chlorophyll in Lake Kinneret using high spectral resolution radiometer and Landsat TM: Spectral features of reflectance and algorithm development [J]. J. Plankton Res. 1995,17: 2155-2173.

十分必要。固定底物酶底物法可以较好地弥补传统方法的不足。

固定底物酶底物法 (Defined Substrate Technology, DST, 以下简称 DST-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 ONPG (Ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside) 使培养液呈黄色, 以及大肠埃希氏菌产生 β -葡萄糖醛酸酶 (β -glucuronidase) 分解 MUG (4-methyl-umbelliferyl- β -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、粪大肠菌群 (耐热大肠菌群) 及大肠埃希氏菌^[1]。DST-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; DST-酶底物法检测时间较短, 18~24h 即可同时判断水样中粪大肠菌群 (耐热大肠菌群) 的 MPN 值。在美国, 欧洲及大部分亚洲国家广泛应用于水中总大肠杆菌、粪大肠菌群 (耐热大肠菌群) 及大肠埃希氏菌的检测, 并通过美国 EPA, 《水与废水标准检测方法》以及我国《生活饮用水标准检验方法》认证^[2]。

由于 DST-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 DST-酶底物法与多管发酵法用于水样的检测。

1 材料与方 法

材料与试剂: 本试验中酶底物法采用固定底物技术 (DST, defined substrate technology), 其 MMO-MUG 培养基^[3]、试验材料和仪器由爱德士公司提供。其它所用培养基与试剂按《地表水环境质量标准方法》GB3838-2002 准备和配置。

试验方法: 固定底物酶底物法采用 97 孔定量盘, 此方法是一种基于 MPN 的方法。检测所需水样为 100ml。用 100ml 的无菌取样瓶量取 100ml 水样, 加入科立得™ (Colilert®) 试剂, 混摇均匀使之完全溶解, 将水样全部倒入 97 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^[4]。放入 44.5℃ ± 0.2℃ 培养箱中培养 24 小时后进行结果判读, 如果结果为可疑阴性, 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^[4]。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粪大肠菌群 (耐热大肠菌群)。计算有黄色反应的孔穴数, 对照 MPN

表查出其代表的粪大肠菌群 (耐热大肠菌群) 最可能数。

多管发酵法检测大肠菌群和粪大肠菌群方法参见《水质粪大肠菌群的测定 多管法和滤膜法 (试行) HJ/T 347-2007》。

数据统计。数据整理统计方法使用 Excel 和 SPSS10.0 软件。

2 试验结果

采取地表水、污水水样进行检测, 为保证试验结果的精确和方便统计, 水样要求一定的阳性检出率。在本项实验中采用 103 份地表水及污水水样进行粪大肠菌群 (耐热大肠菌群) 的检测, 结果如图 1 和图 2。

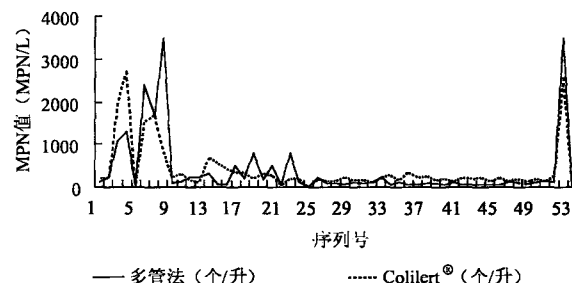


图 1 厦门环境监测站对 53 份样品进行两种方法的比较

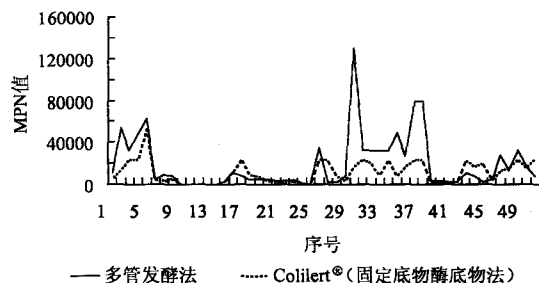


图 2 上海环境监测站对 50 份样品进行两种方法的比较

对两种方法检测的粪大肠菌群 (耐热大肠菌群) 结果进行配对 t 检验, 为了使两组数据呈正态分布, 现对数据进行对数处理后进行 t 检验^[5-7], 结果见表 2、表 2。

表 1 配对变量统计描述

	平均值	分析样本量	标准偏差	标准误差
多管发酵法	2.9933	103	1.0797	0.1085
固定底物酶底物法	3.0613	103	0.9070	0.09115

表 2 进行配对变量间的相关性分析

方法	分析样本量	相关性	P 值
多管发酵法与固定底物酶底物法	103	0.902	0.000

表 2 反映出两组数据的相关性。Correlation 代表 r 值。 $r = 1$ 说明两组数据完全相同^[6]。由

图 1、图 2 可看出, $r = 0.902$, 说明相关性很好。 $P = 0.000$, 说明两组数据的相关性趋于一致^[6]。

表 3 对水样的结果进行线性回归分析

	差异性比较					t	df	P 值
	平均值	标准偏差	标准误差	95% 置信区间				
				下限	上限			
多管发酵法与固定底物酶底物法	-0.068	0.4716	0.04739	-0.1621	0.02602	-1.436	98	0.154

对两种方法检测的粪大肠菌群(耐热大肠菌群)结果进行配对 t 检验, 回归分析结果表明, 回归系数 t 检验 $t = -1.436$, $P = 0.154$, P 值大于 0.05 即差异没有显著意义^[5-7]。可认为固定底物酶底物法与多管发酵法没有区别, 效果是相同的。

3 讨论

通过以上试验证明, 固定底物酶底物法与多管发酵法相比在结果一致性方面无统计学意义上的显著性差异。同时, 固定底物酶底物法操作简便, 检测时间短(24 小时), 实验过程污染的可能性低于多管法, 可精确检测出 1 个粪大肠菌群, 能够较为准确地判断水样的微生物污染状况, 可以作为评价水质微生物污染的快速标准检测方法。

参考文献:

[1] ISO 17994: Water quality - Criteria for establishing

equivalence between microbiological methods [J]. First edition, 2004.

[2] 生活饮用水标准检验方法[S]. GB/T 5750. 2007: 13 - 2006.

[3] 王秀茹. 预防医学微生物学及检验技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 676 ~ 679.

[4] Standard Methods for Examination of Water & Wastewater (HRD) Author: Eaton; Andrew D. (EDT)/ Clesceri; Lenore S. (EDT)/ Rice; Eugene W. (EDT)/ Greenberg; Arnold E. (EDT)/ Franson; Mary Ann H. (EDT). Publish: Amer Public Health Assn.

[5] 罗应婷 杨钰娟. SPSS 统计分析 从基础到实践[M]. 北京: 电子工业出版社, 2008.

[6] 卢纹岱. SPSS for Windows 统计分析(第三版)[M]. 北京: 电子工业出版社, 2006.

[7] SM Committee. 9223 Chromogenic Substrate Coliform Test (2004).

(上接第 45 页)

4 多点校正质量对监测结果的影响

多点校准是观察多个已知浓度点的仪器示值, 通过调节使仪器示值和实际浓度达到最佳拟合程度。它考虑了各校准点误差的差异及多点平均影响, 其目的在于确认仪器线性状况, 以判定监测仪在其量程范围内各点的监测值是否准确。

5 结论

大气自动监测中动态校准装置(包括动态校准仪和零气发生器)是质量控制中的关键设备, 质量流量控制器是动态校准仪中的关键部件和基本流量测定装置^[3]。因此质量流量的精确控制是动态校准仪的核心, 它的精度直接影响自动监测系统质控质量。

本文对动态校准仪中两种气体流量因素进行

分析、比较。认为在分析仪测试条件不变前提下, 不同的配气方法对校准气浓度的准确性影响不一样。研究表明, 校准气(或零空气)流量大小对校准气浓度的准确性影响不显著; 标气流量大小对校准气浓度的准确性影响显著。因此多点校准宜用相对固定标气流量办法, 增加低浓度校准点标气流量, 保证流量控制精度, 减小仪器示值误差, 提高多点校准质量, 确保监测数据准确、可靠。

参考文献:

[1] 国家环境保护局. 空气和废气监测分析方法(第四版)[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2003.

[2] 王静. 空气自动监测系统的标准传递方法[J]. 环境监测管理与技术, 2004, 16(2): 39.

[3] 吴鹏鸣等. 环境空气监测质量手册[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1989. 514.

[4] 中国环境监测总站. 环境水质监测质量保证手册(第二版)[M]. 北京: 化学工业出版社, 1994. 288.