

高灵敏度大肠菌群测试片法与多管发酵法 检测海水中粪大肠菌群的比较研究

韩朝国,董炜峰,杨毕铖,李蔚萍

(国家海洋局厦门海洋环境监测中心站 厦门 361008)

摘要:粪大肠菌群是海水浴场水质状况的重要检测指标,传统检测方法以多管发酵法为主,其方法较为成熟,但耗时较长、操作繁琐;高灵敏度大肠菌群测试片法获国际官方认证,我国也已将其纳入标准方法。文章以厦门海水浴场的水质检测为例,开展2种方法的对比实验,结果表明:2种方法对粪大肠菌群的检测结果基本一致;高灵敏度大肠菌群测试片法具有简便、快速和省力的优点,更加适用于日常检测工作。

关键词:高灵敏度大肠菌群测试片法;多管发酵法;粪大肠菌群;海水浴场;海水质量

中图分类号:X834

文献标志码:A

文章编号:1005-9857(2017)10-0068-04

A Comparative Study on the Detection of Fecal Coliform in Seawater by High Sensitivity Coliform Test Slice Method and Multi-tube Fermentation Method

HAN Chaoguo, DONG Weifeng, YANG Bicheng, LI Weiping

(Central Marine Environmental Monitoring Station of Xiamen, SOA, Xiamen 361008, China)

Abstract: Fecal coliform is an important detection index for the quality of seawater baths, the traditional method is mature and based on the multi-tube fermentation, but it takes a long time and the operation is tedious. High sensitivity coliform test method has been accepted by the international authorities, and this method has been incorporated into the standard method in China. This paper took the water quality test of Xiamen seawater bathing as an example, to carry out the comparison experiment of two methods. The study showed that the two methods of fecal coliform test results are consistent well. High sensitivity coliform test method has the advantages of easy operation, high efficiency and labor-saving, and more suitable for daily testing as well.

Key words: High-sensitivity coliform test piece, Multi-tube fermentation, Fecal coliform, Seawater bath, Seawater quality

粪大肠菌群主要来源于人类和其他动物排泄的粪便,随着雨水和污水等的排放进入海水中,对

沿海的海水浴场造成污染,进而对人体产生危害。粪大肠菌群是海水浴场水质检测的指标之一,是评价海水浴场质量的重要依据。

目前在我国海水浴场中检测粪大肠菌群含量的方法主要是依据《海洋监测规范》(GB 17378.7—2007)^[1]的多管发酵法。国内于 20 世纪 80 年代初即开始运用多管发酵法对海水中的粪大肠菌群进行初步研究和检测,该方法具有较为成熟、原理简单、利于推广和费用低等优点^[2],但也存在一些缺点:实验操作步骤繁琐,需进行初发酵和复发酵 2 个过程;培养周期长,1 个培养过程需要 48 h;前期的培养液配置和培养后的样品处理等都需耗费大量人力。因此,很难适应现代化快速检测海水浴场水质的需求。

Petrifilm™ 高灵敏度大肠菌群测试片法经过长期的研究、改进和使用,目前已趋于成熟,是国际上获得官方认证的方法^[3-4];其具有操作简便、培养时间短和节省人力等优点^[5],但也存在对环境要求较高和测试片价格较高等缺点。测试片法目前主要运用于食品、生活饮用水、疾病防控等领域的粪大肠菌群检测,我国也出台了相应的方法和标准^[6],很多学者都对其进行了相关研究,然而在海洋环境检测中将测试片法运用于粪大肠菌群检测的研究相对较少。在 2013 年发布的《海洋监测技术规范》(HY/T 147.5—2013)^[7]中首次将测试片法作为标准方法用于检测海洋环境中的粪大肠菌群,同时测试片直接计数法也被作为仲裁法。本研究比较高灵敏度大肠菌群测试片法和多管发酵法的检测结果,为今后快速检测海洋环境中的粪大肠菌群提供参考依据。

1 实验操作

1.1 药品试剂和实验仪器

本研究采用的药品试剂主要包括:高灵敏度大肠菌群测试片(厦门泰京生物技术有限公司)、乳糖蛋白胨培养基(北京奥博星生物技术有限公司)、E-TEC 琼脂培养基(北京奥博星生物技术有限公司)和碳酸钠溶液(称取 10.6 g 碳酸钠溶于蒸馏水,并定容到 100 mL 自制)。

采用的实验仪器主要包括:高压灭菌锅

(HIRAYAMA,型号 HV-50)和电热恒温培养箱(上海荣丰科学仪器有限公司,型号 LRH-250)。

1.2 操作方法

分别按照《海洋监测规范》(GB 17378.7—2007)^[1]中的多管发酵法和《海洋监测技术规范》(HY/T 147.5—2013)^[7]中的测试片法,对 3 个站、7 个航次和 21 个样品的粪大肠菌群进行测定。

1.2.1 多管发酵法

多管发酵法的原理是大肠菌群在 37℃ 或 44℃ 条件下繁殖时能使乳糖发酵,并能使乳糖蛋白胨培养液在变黄的同时产生气泡^[8];海水检验采用 44℃ 培养法。

(1)初发酵实验。采用无菌操作的方法,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 3 倍浓缩乳糖蛋白胨培养液的试管中;等量吸取 1 mL 经充分摇匀的水样,分别加入 5 支各盛有 10 mL 已灭菌的单倍浓缩乳糖蛋白胨培养液的试管中;吸取 1 mL 水样注入盛有 9 mL 已灭菌的清洁海水的试管中并摇匀。另换吸量管等量吸取此种稀释水样 1 mL,分别加入 5 支各盛有 10 mL 已灭菌的单倍浓缩乳糖蛋白胨培养液的试管中;充分混匀后,将试管置于 44℃ 恒温箱中培养 24 h。

(2)复发酵实验。经培养 24 h 后,将产酸产气和只产酸的发酵管用无菌环转接入 EC 培养液中,摇匀后置于 44℃ ± 0.5℃ 恒温培养箱中培养 24 h ± 2 h。

(3)结果判读。在此期间所得产气的阳性管即证实有粪大肠菌群存在;依据阳性管数,查最近似值(MPN)表可得每 100 mL 水样中粪大肠菌群的最近似值,将此数值乘以 10,即求得每升水样中粪大肠菌群数。

1.2.2 测试片法

测试片法的原理是,大肠菌群测试片是预先制备好的培养基系统,含有标准的平板计数培养基、冷水可溶性凝胶和特异性指示剂^[9];其在 44.5℃ 条件下可繁殖发酵乳糖而产生气泡,同时产酸使指示剂变红色,以检验粪大肠菌群。

(1)接种和培养。将测试片置于超净工作台

上,揭开上层膜,用移液器吸取样品 5 mL 垂直滴加在测试片中央处,每个样品做 2 个平行,将上层膜缓慢盖下以避免气泡产生;将压板放置在上层膜中央处轻轻压下,使样液均匀覆盖于圆形培养面上,静置 2~5 min 使其凝固;置于 $44.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ 。

(2)菌落计数和判读。用目视和放大镜来计数,将计数结果乘以 200 即求得每升水样中粪大肠菌群数。在测试片上,红色有气泡的菌落可确认为粪大肠菌群,圆形培养面边缘上和边缘外的菌落不作计数;出现大量气泡、大量不明显小菌落或培养区呈暗红色,表明浓度过高需要稀释。

表 1 样品检测结果

| 日期 | 站位 D29 | | 站位 D30 | | 站位 D31 | |
|------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| | 多管发酵法/ (个·L ⁻¹) | 测试片法/ (CFU·L ⁻¹) | 多管发酵法/ (个·L ⁻¹) | 测试片法/ (CFU·L ⁻¹) | 多管发酵法/ (个·L ⁻¹) | 测试片法/ (CFU·L ⁻¹) |
| 2016-04-21 | 460 | 460 | 230 | 340 | 1 100 | 600 |
| 2016-05-06 | 230 | 340 | 220 | 540 | 270 | 600 |
| 2016-05-12 | 460 | 200 | 330 | 200 | 490 | 260 |
| 2016-05-19 | 330 | 200 | 330 | 340 | 330 | 200 |
| 2016-05-23 | 9 200 | 6 800 | 9 200 | 7 600 | 16 000 | 7 600 |
| 2016-05-30 | 3 500 | 2 400 | 2 200 | 1 200 | 3 500 | 2 600 |
| 2016-06-06 | 5 400 | 3 000 | 3 500 | 3 400 | 5 400 | 3 300 |

由表 1 可以看出,同一个样品通过高灵敏度大肠菌群测试片法和多管发酵法检测粪大肠菌群的结果数据存在差异,主要是 2 种方法的结果表示存在差异;高灵敏度大肠菌群测试片法的结果表示是 CFU/L,即每升样品中含有的细菌菌落总数,1 个菌落可能由 1 个细菌形成,也可能由 1 簇细菌形成;多管发酵法的结果表示是个/L,即用概率论推算出样品中菌数最近似的数值;因此高灵敏度大肠菌群测试片法测得的结果可能偏低,检测结果也显示如此。但 2 种方法的检测结果基本在 1 个数量级上,且测试片法测得的结果都落在大肠菌群检数表的 95% 可信限值内,因此采用 2 种方法检测粪大肠菌群的结果基本一致。同时可以看出,2 种方法在不同时段和不同站位的检测结果相关性不高,无显著差异。

1.3 站位布设

采样地点选取厦门环岛东路黄厝海水浴场。该浴场由于沙滩长度较长、地势较平坦,游泳爱好者和人员流动较多,适合作为采样点。在黄厝海水浴场均匀布设 3 个采样站位,从北到南分别为 D29、D30 和 D31。

2 结果分析

按照上述实验操作方法,采用多管发酵法和高灵敏度大肠菌群测试片法,分别对 3 个站位、7 个航次和 21 个样品进行检测(表 1)。

3 结论

通过对 2 种方法的实验对比,高灵敏度大肠菌群测试片法和多管发酵法的检测结果基本一致。高灵敏度大肠菌群测试片法的优点为:易于操作,只需简单培训就能掌握操作方法;培养时间短,较多管发酵法可从 48 h 缩短至 24 h;节省人力,不需试剂配制和培养液处理等工作,可大幅度减少实验人员的工作量。

海水浴场的水质直接影响游客的身心健康,以粪大肠菌群为指示物的微生物污染情况是国内外浴场水质评价的重要指标之一^[10]。从长远看,海水浴场的水质检测工作需要更加快速、简便、有效的检测手段^[11],高灵敏度大肠菌群测试片法能满足这一需求。

参考文献

- [1] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.海洋监测规范第 7 部分:近岸污染生态调查和生物监测:GB 17378.7—2007[S].北京:中国标准出版社,2007.
- [2] 高铭泽.浅谈粪大肠菌群的几种检测方法[J].科研,2015(27):274,286.
- [3] 刘秀梅,卢行安,顾其芳,等.AOAC991.14 Petrifilm™ 大肠菌群测试片法与 GB4789.3 大肠菌群计数法的比较研究[J].中国食品学报,2010,10(6):167—172.
- [4] 卢行安,顾其芳,袁宝君,等.AOAC Petrifilm™ 菌落总数测试片法与食品中菌落总数测定国标方法的比较研究[J].中国食品学报,2011,11(3):164—167.
- [5] 高献礼,李超,李英,等.3M 测试片法和国标法检测香料香精中大肠菌群结果的比较[J].食品研究与开发,2006,27(6):132—133.
- [6] 俞漪.食品微生物测试片标准法和国标法的比较研究[J].农产品加工学刊,2012,10(10):138—140,148.
- [7] 国家海洋局.海洋监测技术规程第 5 部分:海洋生态:HY/T 147.5—2013[S].北京:中国标准出版社,2013.
- [8] 张少峰,刘国强,魏春雷.粪大肠菌群检测方法的研究进展[J].海洋通报,2008,27(3):102—106.
- [9] 谭和平,叶德萍,沈兴中,等.生活饮用水 3M Petrifilm™ 菌落总数测试片法的不确定度评定[J].中国测试,2012,38(1):52—55.
- [10] 李铭中,李哲民.大连市棒棰岛海水浴场夏季水质状况分析及建议[J].环境与可持续发展,2014,39(6):181—183.
- [11] 孙霞,蒋廉华,卢新.3 种方法检测食品中菌落总数的比较[J].中国卫生检验杂志,2014,24(9):1250—1251,1254.

保护渤海海洋环境 构建平衡生态系统

——《渤海山东海域海洋保护区生物多样性图集》书评

为全面、系统地了解渤海山东海域海洋保护区海洋环境和保护物种的现状,由山东省海洋环境监测中心牵头组织,滨州、东营、潍坊和烟台等市级海洋环境监测和预报中心积极配合,历时 4 年对渤海山东海域内的国家级海洋保护区的生物多样性开展本底调查,首次系统编写了《渤海山东海域海洋保护区生物多样性图集》。该系列图集包括《陆生植被》《常见鸟类》《常见底栖生物》《浮游生物》和《常见游泳动物》共 5 册,其中前 4 册已由海洋出版社出版发行,第 5 册《常见游泳动物》即将出版。

第 1 册《陆生植被》图集共调查渤海山东海域海洋保护区内常见的陆生植被 323 种。每个物种按照全株、茎(枝)、叶(叶序)、花(花序)、果(果序)等典型特征进行图像拍摄,并对典型植物全株进行视频拍摄,读者可扫描书中二维码进行查阅。

第 2 册《常见鸟类》图集共调查渤海山东海域海洋保护区内常见的鸟类 119 种。重点介绍常见鸟类的分类学地位、主要识别特征、分布区域和保护等级,每个物种均以多张图片展示,丰富了该区域鸟类生物多样性的研究。

第 3 册《常见底栖生物》图集共调查渤海山东海

域海洋保护区内常见的底栖生物 174 种。重点介绍常见底栖生物的分类学地位、主要识别特征、分布区域和习性,每个物种均以多张图片展示,对部分易混淆物种进行典型局部特征的放大拍摄,并对典型物种进行视频拍摄,读者可扫描书中二维码进行查阅。

第 4 册《浮游生物》图集共调查渤海山东海域海洋保护区内常见的浮游生物 150 种。重点介绍常见浮游生物的分类学地位、主要识别特征、分布区域和习性,每个物种均以多张图片展示,对部分典型浮游植物物种进行电镜拍照,对浮游动物和鱼卵、仔稚鱼样品进行视频拍摄,读者可扫描书中二维码进行查阅。

本套图集的编写和出版得到山东省渤海海洋生态修复及能力建设、山东省科技发展和山东省海洋生态修复重点实验室等项目的资助,不仅为海洋保护区的能力建设提供基本资料,而且可作为科研工作者开展物种鉴定的重要参考,对于渤海山东海域的生态文明建设具有开创性意义。(赵娟 海洋出版社)