

24孔最大可能数法快速检测水质粪大肠菌群

汪浩, 陈仙花, 麻明祥

(温岭市环境保护局, 浙江 温岭 317500)

摘要:设计了一种 24孔最大可能数法,用玫红酸抑制杂菌,快速检测水质粪大肠菌群。方法能在 24 h内检测不同程度污染水样中 $10^3 \text{ L}^{-1} \sim 10^7 \text{ L}^{-1}$ 的粪大肠菌群,回收率为 76 % ~ 108%,批内 RSD为 24.0% ~ 34.0%。与多管发酵法的比较试验表明,两种方法相关性良好,且在添加玫红酸条件下等效。提出方法还需要更多不同性质及来源水样的检测结果来验证。

关键词:粪大肠菌群; 24孔最大可能数法; 玫红酸; 多管发酵法; 水质

中图分类号: Q93-335 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-2009(2010)02-0061-03

Cochran 提出用最大可能数法估算细菌密度^[1]。该方法先估计细菌真实密度的上下限 (\hat{q}_h 和 \hat{q}_l),通过公式 $V_H = 1/\hat{q}_l$ 和 $V_L = 1/\hat{q}_h$ 计算取样体积的最高值 (V_H)和最低值 (V_L)。选择合适的稀释倍数后,决定稀释度的数目及每个稀释度的取样体积,使最大取样体积不小于 V_H ,最小取样体积不大于 V_L 。将一系列稀释度的水样放入合适的培养基,观察是否有细菌生长,然后根据长有细菌的各个接种量的数目间接计算细菌密度。国外一些学者创造的 96 孔微板法^[2]、酶底物法^[3],以及近年来国内有些学者发展的纸片法^[4]、EC 培养液直接培养法^[5]均基于最大可能数法。

玫红酸在标准滤膜法^[6]里被加入 MF-C 培养基中,用以抑制杂菌,至今尚未有报道将其添加到乳糖蛋白胨培养液中,用于水质粪大肠菌群的检测。今设计一种 24孔最大可能数法(以下简称 24孔法)快速检测水质粪大肠菌群,并在乳糖蛋白胨培养液中分别添加或不加玫红酸,与多管发酵法的测定结果进行了比较。

1 试验

1.1 主要仪器与试剂

PHW-120S 型恒温培养箱; 601 数显超级恒温水浴; 12孔板 (Costar); 24孔板 (Costar); Eppendorf 移液枪 (100 μL ~ 1 000 μL); Eppendorf 移液枪 (10 μL ~ 100 μL)。

10 g/L 玫瑰色酸溶液:称取一定质量玫红酸(上海试剂厂生产)溶解于 0.2 mol/L 氢氧化钠溶液中,煮沸灭菌,待冷却后于冰箱中 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

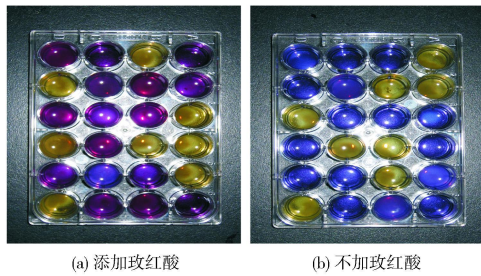
该试验主要采用下列 6 种培养基:①3 倍浓度乳糖蛋白胨培养液;②双倍浓度乳糖蛋白胨培养液;③双倍浓度乳糖蛋白胨培养液,每 100 mL 培养液中添加 2 mL 10 g/L 玫瑰色酸溶液;④单倍浓度乳糖蛋白胨培养液;⑤单倍浓度乳糖蛋白胨培养液,每 100 mL 培养液中添加 1 mL 10 g/L 玫瑰色酸溶液;⑥ EC 培养液。乳糖蛋白胨培养液与 EC 培养液由杭州微生物试剂公司提供。

1.2 试验方法

通常将最初采集的水样稀释一定倍数后制成待测水样,污染程度低的水样可直接分析。多管发酵法参见文献[6]。24孔法分别选择 1 mL、0.1 mL、0.01 mL 3 个接种量。对于 1 mL 接种量,将 24 mL 待测水样平均加入 2 个 12孔板的 24孔中,每孔含 1 mL 培养基②或③;对于 0.1 mL 接种量,将 2.4 mL 待测水样平均加入 1 个 24孔板的 24孔中,每孔含 1 mL 培养基④或⑤;对于 0.01 mL 接种量,先将待测水样稀释 10 倍,再将 2.4 mL 稀释水样平均加入 1 个 24孔板的 24孔中,每孔含 1 mL 培养基④或⑤。接种完毕,将细胞培养板置于 44.5 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 24 h,变黄小孔被视为粪大肠菌群阳性[见图 1(a)(b)]。使用 BAM-MPN 程序计算器(下载链接: <http://vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-a2.html>),结合水样稀释倍数,可计算水样中粪大肠菌群密度。

收稿日期: 2009-09-09; 修订日期: 2010-01-12

作者简介:汪浩(1981-),男,浙江温岭人,助理工程师,硕士,从事环境监测工作。



(a) 添加玫红酸 (b) 不加玫红酸

图 1 水样观测结果

Fig 1 Result of observation of water samples

2 结果与讨论

2.1 方法检测范围

该方法采用 1 mL、0.1 mL、0.01 mL 3 个系列的稀释度作为接种量, 根据 Cochran 的理论, 可用来估算水中 $10^3 \text{ L}^{-1} \sim 10^5 \text{ L}^{-1}$ 的粪大肠菌群。对于粪大肠菌群密度为 $10^5 \text{ L}^{-1} \sim 10^7 \text{ L}^{-1}$ 的水样, 可将样品稀释 100 倍后测试。因此, 该方法检测的粪大肠菌群密度范围为 $10^3 \text{ L}^{-1} \sim 10^7 \text{ L}^{-1}$ 。

2.2 方法准确度与精密度

准确度试验方法是将已知浓度的粪大肠杆菌菌悬液加入 8 g/L 氯化钠溶液中, 配制 5 个不同密度的水样, 用 24 孔法 (乳糖蛋白胨培养液中添加玫红酸) 检测后计算回收率, 结果见表 1。

表 1 准确度试验结果

Table 1 Test results of accuracy

水样	实测值 / L^{-1}	加标值 / L^{-1}	回收率 / %
1	1 596	1 500	106
2	6 217	6 000	104
3	10 332	12 000	86.1
4	43 721	40 500	108
5	70 220	92 300	76.1

精密度试验方法是将粪大肠杆菌菌悬液配制 5 个不同密度的水样, 用 24 孔法 (乳糖蛋白胨培养液中添加玫红酸) 检测, 每个水样检测 10 次, 结果见表 2。

从理论上讲, 对于最大可能数法, 如果一个系列的稀释度设计得比较好, 则方法精密度应该不变, 且与细菌的真实密度无关^[1]。经过对数处理的细菌密度估值的理论标准偏差 (δ_{\lg}) 可用公式 $0.55/\sqrt{n}$ 计算^[2,7], 当 $n=24$ 时, $\delta_{\lg}=0.112$ 对应的 RSD 值为 26.0%。表 2 中 RSD 值在 24.0% ~

表 2 精密度试验结果

Table 2 Test results of precision

水样	1	2	3	4	5
测定值 / L^{-1}	2 457	6 217	11 034	17 981	78 480
	2 457	6 217	9 328	15 257	70 220
	2 179	5 634	8 424	15 257	62 922
	1 858	5 634	7 608	12 985	62 922
	1 858	3 841	6 217	12 985	56 538
	1 596	3 841	6 217	10 332	51 000
	1 357	3 173	5 634	9 328	46 218
	1 015	3 173	5 634	9 328	42 085
	1 015	3 173	4 669	6 874	40 605
	1 015	2 993	4 669	6 874	40 605
平均值 / L^{-1}	1 681	4 390	6 943	11 720	55 160
RSD / %	34.0	31.1	30.3	32.1	24.0

34.0% 之间波动, 可能与试验过程中难以避免的取样体积偏差、操作与分析误差等因素有关。

2.3 24 孔法与多管发酵法比较

24 孔法 (添加或不加玫红酸) 与多管发酵法的测定结果比较见表 3。将 3 组数据作对数处理后进行相关性分析, 结果表明, 24 孔法 (添加或不加玫红酸) 与多管发酵法相关性良好, r 值分别为 0.993 与 0.997。用 SPSS 13.0 软件对数据作配对 t 检验, 结果表明, 对于 24 孔法 (添加玫红酸) 与多管发酵法, $t=0.137$, $P=0.893$ 。对于 24 孔法 (不加玫红酸) 与多管发酵法, $t=13.06$, $P=0$ 。 P 值 > 0.05 即表明两组数据的差异无显著性意义, 因而可以说 24 孔法 (添加玫红酸) 与多管发酵法在检测粪大肠菌群方面效果相同。

2.4 方法应用价值探讨

由表 3 可见, 有 7 个水样 24 孔法 (添加玫红酸) 的粪大肠菌群估值低于多管发酵法。从理论上讲, 传统的 5 管法由于重复数少, 对于特定细菌含量的估值有高于实际数值的倾向, 如果增加每个稀释度的重复数, 则获得的估值越接近于实际数值^[8]。24 孔法的重复数是 5 管法的 4.8 倍, 尽管在乳糖蛋白胨培养液中添加了玫红酸, 但获得的粪大肠菌群估值并未明显低于多管发酵法 (有 8 个水样的检测结果高于多管发酵法)。玫红酸曾被报道是一种非常有效的能特异抑制革兰氏阳性菌的染料^[9], 有可能无法抑制在水样中存在的一些非粪大肠菌群的干扰, 如气单胞菌属被认为会干扰总大肠菌群的检测^[3]。该方法的试验结果与一些学者的研究一致^[10-12], 显示最大可能数法倾向于

表 3 24 孔法与多管发酵法测定结果比较 L^{-1} Table 3 Testing result comparison of 24 well most probable number method and multi tube fermentation technique L^{-1}

水样	24 孔法 (添加玫红酸)	24 孔法 (不加玫红酸)	多管发酵法
1	266 400	361 600	170 000
2	185 000	282 900	140 000
3	235 600	494 000	240 000
4	219 200	456 800	220 000
5	387 400	552 000	350 000
6	311 300	582 400	280 000
7	4 522	7 953	5 400
8	936 600	1 706 500	920 000
9	98 300	249 800	140 000
10	33 630	63 980	43 000
11	79 530	137 770	94 000
12	104 500	185 900	130 000
13	1 798 100	3 518 300	1 600 000
14	10 301	13 230	9 200
15	1 570 000	2 208 000	1 400 000

获得高于实际的特定细菌的估值, 这很大程度上是由于方法缺乏绝对的特异性。因此, 从精确测定水中粪大肠菌群的角度讲, 24 孔法 (添加玫红酸) 有一定的局限性。由于玫红酸仅能抑制革兰氏阳性菌生长, 与其说该方法能精确测定水中粪大肠菌群, 不如说能准确检测水中某一类能够在 44.5°C 及添加 0.1 g/L 玫红酸条件下正常生长的肠道细菌, 在此将其定义为“粪大肠菌群”。对“粪大肠菌群”的准确检测有可能也可以反映水质受粪便污染的程度。

3 结语

该研究设计的 24 孔法 (乳糖蛋白胨培养液中添加玫红酸), 能达到的回收率为 $76\% \sim 108\%$, 批内 RSD 为 $24\% \sim 34\%$ 。方法操作简便, 成本低, 能在 24 h 内检测不同程度污染水样中 $10^3\text{ L}^{-1} \sim 10^7\text{ L}^{-1}$ 的粪大肠菌群, 并获得与多管发酵法一致的测定结果。该方法要成为一种新的检

测水质粪大肠菌群的方法, 还需要更多不同性质及来源水样的检测结果来验证。

[参考文献]

- [1] COCHRAN W G. Estimation of bacterial densities by means of the “most probable number” [J]. *Biometrics* 1950(6): 105–116
- [2] MAULA, BLOCK J C. Microplate fecal coliform method to monitor stream water pollution [J]. *Appl Environ Microbiol* 1983, 46(5): 1032
- [3] American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater [M]. 21st ed Washington DC: American Public Health Association, 2005
- [4] 赵凌宇. 粪大肠菌群快速测定——纸片法的应用 [J]. *环境监测管理与技术*, 2007, 19(4): 18–20
- [5] 吕琦, 陈之江. 快速测定地表水中粪大肠菌群 [J]. *环境监测管理与技术*, 2003, 15(6): 37.
- [6] 国家环境保护总局. HJ/T 347–2007 水质 粪大肠菌群的测定 多管发酵法和滤膜法 (试行) [S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [7] HALVORSON H O, ZIEGLER N R. Application of statistics to problems in bacteriology. III. A consideration of the accuracy of dilution data obtained by using several dilutions [J]. *J Bacteriol* 1933(26): 559–567
- [8] 国家环境保护总局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法 [M]. 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002
- [9] BRONFENBRENNER J, SCHLESINGER M J, SOLETSKY D. On methods of isolation and identification of the members of the coliform group of bacteria—the study of bactericidal action of CR indicator [J]. *J Bacteriol* 1920, 5(1): 79–87.
- [10] MCCARTHY JA, DELANEY J E, GRASSO R J. Measuring coliforms in water [J]. *Water Sew Works* 1961(108): 238–245
- [11] THOMAS A, WOODWARD R L. Estimation of coliform density by the membrane filter and the fermentation tube methods [J]. *J Public Health*, 1955(45): 1431–1437.
- [12] VELZ J C. Bacterial enumeration. In: *applied stream sanitation* [M]. New York: Wiley Interscience Publishers Inc., 1970: 572–593

本栏目责任编辑 姚朝英

• 简讯 •

苏、浙、沪建立世博 300 km² 控污圈

为保障上海世博会期间环境质量尤其是空气质量, 江苏、浙江、上海将引入长三角区域联动机制, 划定以世博园区为核心的 300 km² 区域, 严格控制污染物排放。上海市环保局局长张全介绍, 世博期间空气质量监控引入了 3 个层面的联动: 首先世博园区内部有监测点, 实时监控园区内的空气质量; 其次全上海有一个由 40 多个监测站组成的监测系统, 全天候监控企业排放; 第三层面是上海、浙江、江苏合作, 形成以世博园区为核心, 达 300 km² 的“控污圈”, 监控重点企业, 随时采取措施。

摘自 www.jsh.gov.cn 2010-03-22