

酶底物法测定水中粪大肠菌群的方法验证 及与其他主要方法的对比

王恩霞 谭海廷 邢峰杰

潍坊市市政公用事业服务中心 山东 潍坊 261041

摘要: 粪大肠菌群是判断水质污染程度的重要指示菌,对监测地表水水质和污水处理厂出水水质等具有重要意义。本文通过对实际水样低中高三种浓度、有证标准样品进行酶底物法精密度和准确度检测、对照试验等方式进行了酶底物法检测粪大肠菌群的方法验证,同时结合传统的多管发酵法和滤膜法进行对比,分析这三种方法的优缺点和适用性,更好的做好水质监测工作。

关键词: 粪大肠菌群;酶底物法;方法验证;精密度;准确度;对比

粪大肠菌群是水质污染的重要监测指标之一,目前国内检测水中粪大肠菌群的方法主要有滤膜法、多管发酵法、酶底物法等。酶底物法与其他传统的多管发酵法和滤膜法相比,具有好多优势,比如操作简单、试验时间短、不需要进行确认实验,并且读数相对比较直观,容易操作、灵敏度高等优点。许多专家研究发现这三种方法检测粪大肠菌群的结果存在一致性,在统计学意义上无显著性差异^[1,2],同时研究发现酶底物法能更好的适用于应急检测^[3]。所以笔者通过实验对该方法进行了验证,为更好的做好监测工作提供支持。

1 材料与方

1.1 仪器设备与试剂

上海博迅实业有限公司医疗设备厂生产的GSP-9080MBE隔水式恒温培养箱,上海申安医疗器械厂生产手提式高压蒸汽灭菌器(DSX-24L),美国爱德士公司(IDXX)生产的科立得试剂(MMO-MUG培养基)及配套97孔定量盘、97孔阳性比色盘、120mL无菌采样瓶、程控定量封口机(Quanti-Tray2000)等。

1.2 样品来源

1.2.1 标准样品:三种不同浓度的混合菌饮用水(环境水)大肠菌群质控样,中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC)的大肠埃希氏标准菌株(CICC10389)和产气肠杆菌标准菌株(CICC10293)。

1.2.2 实际样品:地表水(潍坊市樱前街虞河大桥虞河水)、城镇污水处理厂出水(潍坊北控水质净化有限公司出厂水)、生活垃圾填埋场浸出液(潍坊符上镇垃圾处置采样点)。

1.3 验证方法与原理^[4]

1.3.1 需验证方法: HJ1001-2018《水质 总大肠菌群、粪大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定 酶底物法》

1.3.2 原理:在44.5℃培养24h能产生β-半乳糖苷酶(β-D-galactosidase),分解选择性培养基中的邻硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷酶(ONPG)生成黄色的邻硝基苯。通过97孔定量盘中黄色孔的数量,查MPN表分别计算出样品中粪大肠菌群的浓度值。

2 验证过程及分析

2.1 仪器设备试剂等确认:检测人员经培训考核持证上岗,具备相应的检测能力;检测所用仪器如电热恒温干燥箱、隔水式恒温培养箱、手提式压力蒸汽灭菌器、净化工作台等均由潍坊市计量测试所校准,并在有效期内使用;具有无菌室、净化工作台等检测所需的无菌环境;所用的培养基是爱德士公司生产的科立得DST试剂,在有效期内使用,且使用前已进行了培养基符合性验证,经外观检测、无菌性测试、大肠埃希氏菌标准菌株阳性测试,验证结果合格;HJ1001-2018《水质 总大肠菌群、粪大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定 酶底物法》为现行有效标准。

2.2 精密度和准确度检测:

2.2.1 实际样品精密度检测:

分别对低浓度(地表水,浓度均值为 1.6×10^2 MPN/L)、中浓度(污水出厂水,浓度均值为 1.2×10^4 MPN/L)、高浓度(污水出厂水经人工污染后制成的菌悬液,浓度均值为 2.2×10^6 MPN/L)三种不同浓度粪大肠菌群的样品进行了6次重复测定,实验室内相对标准偏差分别为2.3%、1.6%、2.4%,测定结果在标准中6家实验室内相对标准偏差范围内。具体结果如表1所示:

表1 实际水样低、中、高三种浓度精密度测定结果

区分	重复测定1	重复测定2	重复测定3	重复测定4	重复测定5	重复测定6	平均值	标准偏差	相对标准偏差
低浓度水样	180	150	160	140	140	180	160	0.04993	2.3%
中浓度水样	13000	12000	9100	12000	13000	10000	12000	0.06374	1.6%
高浓度水样	2400000	3000000	1100000	2100000	2400000	2400000	2200000	0.1500	2.4%

注：微生物检测数据为偏态分布，其测定结果全部经以10为底对数转换后进行计算。
水样测定值单位：MPN/L

2.2.2 有证标准样品精密度和准确度检测：

对误差范围为-0.98%~1.8%。测定结果在标准中6家实验

对浓度为8080MPN/L的粪大肠菌群有证标准样品进行了6次重复测定，实验室内相对标准偏差为1.1%，相

室内相对标准偏差和相对误差范围内。具体结果如表2所示：

表2 有证标准样品精密度和准确度测定结果

区分	重复测定1	重复测定2	重复测定3	重复测定4	重复测定5	重复测定6	标准偏差	相对标准偏差
有证标样	9500	7900	9300	8800	7400	9400	0.04504	1.1%
真值	8080							
相对误差	1.8%	-0.25%	1.6%	0.95%	-0.98%	1.7%	/	/
相对误差范围	-0.98%~1.8%						/	/

注：1、微生物检测数据为偏态分布，其测定结果全部经以10为底对数转换后进行计算。
2、有证标样真值为8080MPN/L ± 1050MPN/L，可接受范围为1360~51200 MPN/L。
3、水样测定值单位：MPN/L

2.3 实际样品检测

采集样品后立即放到冷藏箱中冷藏保存运输，在6h内检测，并同时检测运输空白，检测运输过程中水样是否被污染，保证采集样品的有效性。

2.3.1 样品采集保存与运输

使用无菌采样瓶进行样品采集，采样时不能用样品洗涤样品瓶，采样后立即进行无菌包扎。并放入冷藏箱内；采样量不能少于250mL。对于含有活性氯的样品，在采样瓶灭菌前加入0.10g/mL的硫代硫酸钠溶液去除余氯，每125mL容积加入0.1mL硫代硫酸钠溶液，以消除活性氯对细菌的抑制作用。对于重金属含量比较高的水样，可以在采样瓶灭菌前加入乙二胺四乙酸二钠溶液。

2.3.2 水样检测

分别用地表水（潍坊市樱前街虞河大桥虞河水）、城镇污水处理厂出水（潍坊北控水质净化有限公司出水）、生活垃圾填埋场浸出液（潍坊市符山镇垃圾处置采样点）进行粪大肠菌群的检测，平行双样测定结果相对偏差为2.3%、1.1%和0.9%。具体结果如表3所示：

表3 实际水样平行样测定结果

类别	平行样1（单位：MPN/L）	平行样2（单位：MPN/L）	相对偏差
地表水	220	250	2.3%
城镇污水处理厂出水	1300	1200	1.1%
生活垃圾填埋场浸出液	780	730	0.9%

注：微生物检测数据为偏态分布，其测定结果全部经以10为底对数转换后进行计算。

2.4 空白试验

用无菌水进行空白试验，结果为未检出，符合方法中空白检测要求。

标菌悬液，按照标准要求操作，结果为1.0 × 10⁶MPN/L，符合方法中阳性要求。

2.5 阴性阳性对照试验

2.6 质量控制：每三个月进行阴性阳性对照实验；每次试验要进行空白对照试验；每批次培养基要用标准菌株或者有证质控样进行符合性验证；每批次水样不小于10%的平行样。

2.5.1 阴性对照：取1个产气肠杆菌标准菌株瓷珠放至100mL无菌管网水中，充分摇匀后制成一定浓度的目标菌悬液，按照标准要求操作，结果为未检出，符合方法中阴性要求。

3 方法比对

2.5.2 阳性对照：取1个大肠埃希氏菌标准菌株瓷珠放至100mL无菌管网水中，充分摇匀后制成一定浓度的目

3.1 有证标准样品的比对试验

对浓度为7060MPN/L（可接受范围1190~44800MPN/

L)和8080MPN/L(可接受范围1360~51200MPN/L)的粪大肠菌群有证标准样品用酶底物法和多管发酵法分别进

行了6次重复测定,结果如图1图2和表4所示:

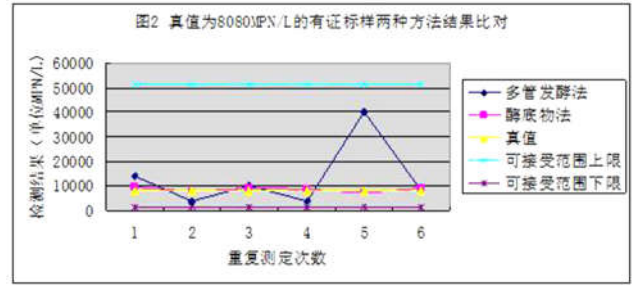
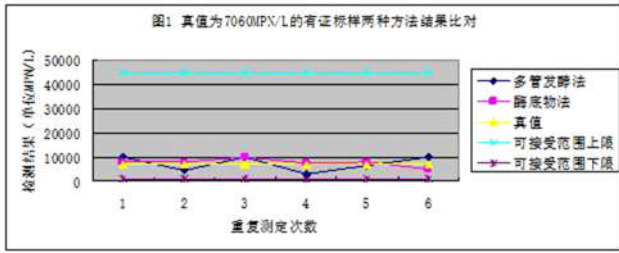


表4 两种浓度有证标样两种方法重复测定6次结果比对

区分	真值为7060MPN/L有证标样			真值为8080MPN/L有证标样		
	标准偏差	相对标准偏差	相对误差范围	标准偏差	相对标准偏差	相对误差范围
多管发酵法	0.2145	5.6%	-9.7%~3.7%	0.2397	6.3%	-7.8%~6.1%
酶底物法	0.1025	2.6%	-4.1%~3.9%	0.0891	3.3%	-0.98%~1.8%

通过图1和图2和表3示,两种方法的六次重复测定结果均在可接受范围内,酶底物法相对更接近真值,且六次重复测定的波动更小。酶底物法两种浓度6次重复测定的相对标准偏差小于酶底物法,相对误差范围方面,酶底物法的波动范围也更窄。由此可以看出,酶底物法的精密度要优于多管发酵法。

结束语

综上所述,在方法验证过程中,人员、设备、培养基试剂、方法和环境条件均符合方法要求。同时用酶底物法检测水中的粪大肠菌群,通过对低中高三种浓度实际水样精密度的检测、有证标准物质的精密度和准确度的检测、实际水样及其平行样的检测、空白对照和阴性阳性对照试验,结果都在标准要求的范围内,实验室按以上要求可以检测出准确数据,满足方法要求。

酶底物法、多管发酵法和滤膜法检测粪大肠菌群,各有优缺点,酶底物法检测过程简单容易操作精密度高,对操作人员要求相对较低,封闭培养,不容易污染环境,适合大批量水样检测,但是成本较高;多管发酵法需要进行验证试验,试验周期长,实验过程复杂繁

琐,不适合大批量水样检测,但是适用范围较广,此方法适用于不同污染程度的水样,成本也相对较低;滤膜法要求滤膜上生长的最佳菌落数为20~60CFU^[5],所以适用于污染程度较低和比较清洁的水样,因此在实际工作中,我们可以根据水样污染程度和客观条件来选择合适的的方法来开展监测工作。

参考文献

- [1]何敏.张亚娟.周艳红等.水中粪大肠菌群检测方法比对[J].净水技术,2018,37(9):19-22
- [2]马原.刘虹.几种粪大肠菌群检测方法的比较[J].黑龙江环境通报.2010.34(3)43-45.
- [3]汤琳,李备军等,粪大肠菌群酶底物法在环境应急监测中的应用[J]环境监测管理技术,2013(6):56-59.
- [4]国家生态环境部,HJ1001-2018《水质 总大肠菌群、粪大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定 酶底物法》.[S]北京:中国标准出版社,2018.
- [5]国家生态环境部,HJ347.1-2018《水质 粪大肠菌群的测定 滤膜法》.[S]北京:中国标准出版社,2018.