

检测沿岸水域粪大肠菌群的 几种方法比较

倪纯治 曾活水 姚瑞梅 梁子原

(国家海洋局第三海洋研究所, 厦门)

大肠菌群作为水质污染的指示菌已有近80年的历史, 至今仍不失为一个较好的指示菌, 各国仍在继续应用, 并在检测技术上不断改进. 我国《海洋污染调查暂行规范》(1979)^[1]中对大肠菌群的检测也是采用发酵法和滤膜法. 近年来这两种检测技术在培养方法和培养基方面有了新的改进. Standrige 等报道了应用A-1培养基作为多管发酵法的培养基, 用以检测粪大肠菌, 可于24 h内得出结果, 比常规的多管发酵法至少可减少一半时间^[1]. 美国《检测水和废水标准方法》所推荐的方法之一, 即用EC培养液作为复发酵培养基, 它可缩短检测时间^[2]. Reasoner 等报道用7 h粪大肠菌培养基(M-7hFCA)可快速培养粪大肠菌群^[3]. Pagel 等应用M-TEC, 用滤膜法对曾接触含氯污水的粪大肠菌群进行检验得到良好结果^[4]. 上述方法大部分用于检验饮用水及含氯和非含氯排放污水中的粪大肠菌. 为选择适于检测海水中粪大肠菌群的方法, 本试验采用现场海水对四种滤膜法和三种十五管发酵法的检出率、准确度、复苏率和选择性进行比较研究, 拟求在不影响准确度的前提下, 使检测方法更简便、快速. 为制定沿海水域大肠菌群检测方法提供实验依据.

一、材料和方法

(一) 样品来源

海水样来自厦门港、大亚湾沿岸的表层海水. 大肠杆菌纯种: *Escherichia coli* 1.29, *Escherichia coli* 1.353.

(二) 方法及培养基

1. 双层培养法

(1) 检测步骤 1

水样 $\xrightarrow{\text{通过 } 0.45\mu\text{m} \text{ 微孔滤膜}}$ 双层培养基 $\xrightarrow[44 \pm 0.5^\circ\text{C } 18-22\text{h}]{37^\circ\text{C} \text{ 预培养 } 2\text{h}}$ 计数滤膜上蓝色菌落.

(2) 培养基

详见《海洋污染调查暂行规范》(1979)^[1].

本文于1987年10月16日收到, 修改稿于1989年11月20日收到.

1) 国家海洋局, 海洋污染调查暂行规范, 1979.

2. 标准滤膜法

(1) 检测步骤

水样 $\xrightarrow{0.45\mu\text{m微孔滤膜}}$ M-FC 培养基 $\xrightarrow[44 \pm 0.5^\circ\text{C} 22-24\text{h}]{37^\circ\text{C} \text{预培养 } 2\text{h}}$ 计数滤膜上蓝色菌落。

(2) 培养基

M-FC. 胰蛋白胨10.0g, 胨胨5.0g, 酵母膏3.0g, 氯化钠5.0g, 乳糖12.5g, 3号胆盐1.5g, 苯胺蓝0.1g, 含10cm³ 1%玫瑰色酸(溶于0.2mol/dm³氢氧化钠), 琼脂15-18g, pH7.4.

3. 7h滤膜培养法

(1) 检测步骤

水样 $\xrightarrow{0.45\mu\text{m微孔滤膜}}$ M-7hFC 平板培养基 $\xrightarrow[41.5^\circ\text{C} \text{水溶 } 7\text{h}]{}$ 计数黄色菌落。
(平板装入塑料袋扎紧)

(2) 培养基

胰蛋白胨5.0g, 酵母膏3.0g, 乳糖10.0g, 甘露醇5.0g, 氯化钠7.5g, 十二烷基磺酸钠0.2g, 去氧胆酸钠0.1g, 溴甲酚紫0.35g, 酚红0.3g, 琼脂15g, 蒸馏水1000cm³, pH7.3. 上述成分煮沸后直接倾入平板, 不必灭菌。

4. 两种培养温度 M-TEC 培养法

(1) 检测步骤

水样 $\xrightarrow{0.45\mu\text{m微孔滤膜}}$ M-TEC 培养基 $\xrightarrow[44 \pm 0.5^\circ\text{C} 23-24\text{h}]{37^\circ\text{C} \text{培养 } 2\text{h}}$ 计数滤膜上黄色菌落。

(2) 培养基

M-TEC. 胰蛋白胨5.0g, 酵母浸膏3.0g, 乳糖10.0g, 氯化钠7.5g, 磷酸氢二钾3.3g, 磷酸二氢钾1.0g, 十二烷基磺酸钠0.2g, 去氧胆酸钠0.1g, 溴甲酚紫80mg, 溴酚红80mg, 琼脂15-18g, 蒸馏水1000cm³, pH7.3.

5. 一步十五管发酵法

(1) 检测步骤

水样 \rightarrow A-1 培养液 $\xrightarrow[44 \pm 0.5^\circ\text{C} 21-22\text{h}]{37^\circ\text{C} \text{预培养 } 3\text{h}}$ 计数产气管数 \rightarrow 查《MPN表》。

(2) 培养基

A-1. 乳糖5.0g, 胰蛋白胨20.0g, 氯化钠5.0g, 水杨苷0.5g, 三硝基苯x-100 1.0cm³, 蒸馏水1000cm³, pH6.9 ± 0.1.

6. 二步十五管法

(1) 检测步骤

水样 \rightarrow 乳糖蛋白胨培养液 $\xrightarrow{44 \pm 0.5^\circ\text{C}}$ EC 培养液 $\xrightarrow[产气]{44 \pm 0.5^\circ\text{C} 24\text{h}}$ 计数产气管数 \rightarrow

查《MPN表》。

(2) 培养基

初发酵培养液—乳糖蛋白胨培养液, 复发酵培养液—EC培养液, 其组成如下: 胰蛋白胨或胨胨20.0g, 乳糖5.0g, 胆盐混合物或3号胆盐1.5g, 磷酸氢二钾4.0g, 磷酸二氢钾1.5g, 氯化钠5.0g, 蒸馏水1000cm³, pH6.9.

7. 三步多管发酵法

(1) 检测步骤

水样—→乳糖蛋白胨培养液 $\xrightarrow[44 \pm 0.5^\circ\text{C} \ 24\text{h}]{\text{产酸产气或只产酸}}$ 伊红美蓝培养基 $\xrightarrow[44 \pm 0.5^\circ\text{C} \ 24\text{h}]{} \rightarrow$ 乳糖蛋白胨培养液(复发酵) $\xrightarrow[44 \pm 0.5^\circ\text{C} \ 24\text{h}]{\text{产酸产气}}$ 计数产酸产气管数—→查《MPN表》。

(2) 培养基

初发酵和复发酵培养液同二步法的初发酵培养液。平板分离采用伊红美蓝培养基。

二、结 果

1. 四种滤膜法检出率比较

采集厦门港和广东大亚湾海区各种不同类型的海水样(包括沿岸排污口, 非排污口, 河水入海口、海滨浴场及近岸水域等站位), 应用四种滤膜法检测粪大肠菌群细菌。每一样品采用两种稀释度, 每一稀释度做三个重复平板, 其检出数取三个重复滤膜上菌落的平均数。以两种温度法的检出数作对照值, 与其他三种方法进行比较。通过对不同类型的25个海水样品的检测, 结果表明, 四种滤膜法中, 两种培养温度的M-TEC培养基法的检出率均高于其他三方法, 其次是双层培养基法, 如表1所示。

表1 四种滤膜法检出率比较

水样来源	实 验 次	双层培养基法		标准滤膜法		7 h 培养法		两种温度法	
		检出数 (个/滤膜)	检出率 (%)	检出数 (个/滤膜)	检出率 (%)	检出数 (个/滤膜)	检出率 (%)	检出数 (个/滤膜)	检出率 (%)
海滨浴场	8	40.20	72.0	30.88	55.31	38.71	69.34	55.83	100
沿岸排污口	8	51.95	87.53	41.21	69.94	37.34	62.91	59.35	100
沿岸非排污口	5	56.53	72.98	39.58	51.10	44.20	57.06	77.46	100
近岸靠外海	4	32.33	64.98	25.48	51.22	38.45	77.29	49.75	100
平均检出率 (%)		74.37		56.89		66.65		100	

2. 四种滤膜法的准确度比较

粪大肠菌群检出数能否正确反应水质状况, 取决于检测方法的准确度。为比较四种滤膜法的准确度, 并避免现场样品中其他生物和非生物因素的干扰。采用纯种大肠杆菌(*E. coli*)制成菌悬液, 以营养琼脂作参比培养基, 在35℃培养24h的平板计数值作为“对照值”(准确度按100%计)与同时进行的四种滤膜法的计数值作比较, 从而得出相对的准确度。通过两个纯种的五次试验, 四种滤膜上的菌落数无论是以参比培养基滤膜上菌落数比较或以两种温度的M-TEC培养基法作对照(准确度按100%计)与其他三种滤膜法比较, 两

种温度 M-TEC 培养基法的准确度相对较高, 如表 2 所示。

表 2 四种滤膜法准确度比较

序号	菌号	参比平板 计数 (个/cm ³)	检 出 菌 数 (个/cm ³)			
			双 层 法	标 准 法	7 h 法	两种温度法
1	<i>E. coli</i> 1.353	5.9 × 10 ⁵	6.3 × 10 ⁵	5.0 × 10 ⁵	4.0 × 10 ⁵	5.0 × 10 ⁵
2	<i>E. coli</i> 1.29	54 × 10 ⁵	43.3 × 10 ⁵	39 × 10 ⁵	40 × 10 ⁵	48 × 10 ⁵
3	<i>E. coli</i> 1.353	11.2 × 10 ⁵	9.73 × 10 ⁵	7.1 × 10 ⁵	8.0 × 10 ⁵	12.7 × 10 ⁵
4	<i>E. coli</i> 1.29	60 × 10 ⁵	50 × 10 ⁵	38 × 10 ⁵	45 × 10 ⁵	65 × 10 ⁵
5	<i>E. coli</i> 1.353	215 × 10 ⁵	170 × 10 ⁵	180 × 10 ⁵	170 × 10 ⁵	206 × 10 ⁵
检出率 (%)		100	87.18	69.6	73.7	98.23

3. 四种滤膜法复苏率比较

大肠菌群细菌生活在不利的环境中, 如过冷、过热、直射阳光照射, 水样贮存时间过久或盐分过高的环境中, 都会受到一定程度的损害, 使一部分受损的大肠菌群细菌未能生长发育, 从而使计算结果偏低, 将导致对水质的错误评价。因此选择适宜的培养基和培养法, 使受损细菌得以复苏和修复, 以利其生长。为比较四种滤膜法的复苏率, 本试验采用低温的处理条件, 即把现场海水和纯种菌悬液用四种方法进行大肠菌群细菌检测。再把该样品的另一部分贮于 10℃ 48h 后取出再行检测。比较低温处理前后所测菌数, 即可计算复苏率。从表 3 看出, 四种滤膜法中, 两种温度 M-TEC 培养法复苏率最高 (79.37%), 其次是双层培养基法 (72.87%)。

4. 选择性比较

培养基选择性的强弱直接关系到大肠菌群细菌的检出, 本实验从滤膜上杂菌出现的数

表 3 四种滤膜法复苏率比较

样 品 来 源	双 层 法			标 准 法		
	处理前 检出数 (0.1个/cm ³)	处理后 检出数 (0.1个/cm ³)	复 苏 率 (%)	处理前 检出数 (0.1个/cm ³)	处理后 检出数 (0.1个/cm ³)	复 苏 率 (%)
避风坞	14.33	7.33	51.18	11.6	5.33	45.95
海滨浴场	10.67	8.0	79.48	9.0	5.34	59.33
<i>E. coli</i> 1.29	20.7 × 10 ⁶	14.67 × 10 ⁶	70.87	8.33 × 10 ⁶	6.67 × 10 ⁶	80.0
<i>E. coli</i> 1.353	6.67 × 10 ⁶	6.0 × 10 ⁶	89.96	5.75 × 10 ⁶	4.0 × 10 ⁷	86.21
平均复苏率 (%)	72.87			67.87		
样 品 来 源	7 h 法			两种温度法		
	处理前 检出数 (0.1个/cm ³)	处理后 检出数 (0.1个/cm ³)	复 苏 率 (%)	处理前 检出数 (0.1个/cm ³)	处理后 检出数 (0.1个/cm ³)	复 苏 率 (%)
避风坞	12.0	5.67	47.25	14.60	10.67	73.1
海滨浴场	8.0	6.0	75.0	12.0	10.0	83.33
<i>E. coli</i> 1.29	8.47 × 10 ⁶	7.66 × 10 ⁶	88.47	20.7 × 10 ⁶	15.0 × 10 ⁶	72.46
<i>E. coli</i> 1.353	4.17 × 10 ⁶	4.33 × 10 ⁶	63.41	7.0 × 10 ⁶	6.2 × 10 ⁶	88.57
平均复苏率 (%)	68.53			79.37		

* 复苏率计算: (处理后检出数 / 处理前检出数) × 100%。

量以及对对象菌落阳性率的高低(革兰氏阴性、氧化酶阴性及EC管产气)加以衡量,其结果分别列于表4,5.滤膜上出现杂菌数量最少的是两种温度M-TEC培养基法,其次是7h培养基法.而粪大肠菌群的阳性率仍是两种温度M-TEC培养基法和双层培养基法为高.

表4 滤膜上杂菌出现数量比较(个/滤膜)*

试验次数	双层法	标准法	7h法	两种温度M-TEC法
1	2.65	2.8	7.3	1.3
2	8.3	3.15	1.8	2.0
3	5.7	5.7	2.5	4.0
4	4.3	5.1	0	4.0
平均值	5.25	4.19	2.9	2.83

*. 各次均在同一稀释度下进行比较,每一稀释度做三个重复平板.

表5 对象菌落阳性率比较*

序号	被测菌落数(个)	双层法			标准法			7h法			两种温度法		
		革兰氏反应(一)(%)	氧化酶阴性(%)	EC管产气(%)	革兰氏反应(一)(%)	氧化酶阴性(%)	EC管产气(%)	革兰氏反应(一)(%)	氧化酶阴性(%)	EC管产气(%)	革兰氏反应(一)(%)	氧化酶阴性(%)	EC管产气(%)
1	20	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	20	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	20	100	100	60	100	100	40	100	100	80	100	100	90
4	20	100	100	100	100	100	70	100	100	50	100	100	100
5	20	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
平均值		100	100	92.0	100	100	82.0	100	100	86.0	100	100	98.0

*. 被测菌落数即在四种方法的滤膜上各取20个菌落试验阳性率.

5. 预培养时间比较

对两种温度M-TEC培养基法进行不同预培养时间试验,比较滤膜上出现粪大肠菌和杂菌的数量.八次试验结果表明,在37℃培养0.5h,然后转置44±0.5℃培养23—24h,其粪大肠菌检出数最高,杂菌出现数量最少.如表6所示.随着预培养时间的增加,杂菌出现数量随之增多.而粪大肠菌检出数减少.

表6 不同预培养时间比较*

预培养时间(h)	5	2	0.5
实验次数	8	8	8
检出率(%)	89.02	88.24	96.95
出现杂菌数(个/滤膜)	16.54	15.03	12.19

*. 检出杂菌数均为8次实验结果的平均值.

综上所述表明,两种温度M-TEC培养基法的检出数、复苏率、准确度和检出阳性率均优于其他三种方法(表7).当采用滤膜法检测海水中粪大肠菌群时,两种温度M-TEC培养基法是比较好的方法.

表7 四种滤膜法检测结果比较

指标	双层法	标准法	7h法	两种温度法
检出率(%)	74.37	56.88	66.65	100
准确度(%)	81.18	56.05	73.7	98.23
复苏率(%)	72.87	67.87	68.53	79.37
选择性				
杂菌数(个/滤膜)	7.3	5.1	4.23	3.33
氧化酶阴性	100	100	100	100
EC管产气	92.0	82.0	86.0	98.0
革兰氏阴性	100	100	100	100

6. 三种多管发酵法检出率比较

采集不同类型海水样, 用三种十五管发酵法进行 27 样次的粪大肠菌群检测, 以二步法的检出数作对照, 比较其检出率, 结果列于表 8。

从表 8 可见, 一步十五管发酵法在 27 样次实验中, 仅有河水入海处水样的大肠菌群检出率高于其他两方法的检出率, 其余各类水样的检出率均比其他两方法低。而二步十五管法的检出率则高于三步法, 因此其检出率是二步法 > 三步法 > 一步法。

表 8 三种十五管法对海水中粪大肠菌群检出率比较*

水样来源	实验次数	检 出 菌 数 (0.01个/cm ³)		
		一 步 法	二 步 法	三 步 法
海滨浴场	6	34.0	413.0	413.0
河水入海处	3	15.67	12.0	12.0
近岸排污口	8	3 460.0	6 852.5	6 852.5
近岸非排污口	5	869.89	1 971.11	1 871.11
近外海水	5	145.0	252.0	252.0
平均检出率 (%)		61.54	100	98.73

* 检出率表示各种类型海水样各样次的平均值。

7. 三种十五管法准确度比较

本试验采用大肠杆菌纯种制成菌悬液, 涂布于营养琼脂的参比培养基上, 35℃培养 24 h 以后进行平板计数, 以该计数值作为对照, 并以同样菌液进行适宜稀释后, 分别接种于三种方法的十五管中, 44 ± 0.5℃培养 24 h 后计数阳性管数, 并查《MPN 表》, 得其含菌数, 以该数值与参比培养基上的菌数比较, 计算准确度。表 9 表明二步十五管法准确度相对较高 (91.66%), 三步法次之 (88.25%), 而一步法较低 (48.33%)。

表 9 三种十五管发酵法准确度比较

序号	菌 号	参比平板计数 (0.01个/cm ³)	菌 数 (0.01个/cm ³)		
			一 步 法	二 步 法	三 步 法
1	<i>E. coli</i> 1.29	5.4 × 10 ⁷	1.3 × 10 ⁷	4.9 × 10 ⁷	4.9 × 10 ⁷
2	<i>E. coli</i> 1.353	5.9 × 10 ⁷	1.3 × 10 ⁷	5.4 × 10 ⁷	5.4 × 10 ⁷
3	<i>E. coli</i> 1.353	5.8 × 10 ⁷	1.3 × 10 ⁷	5.4 × 10 ⁷	5.4 × 10 ⁷
4	<i>E. coli</i> 1.29	3.6 × 10 ⁷	8.0 × 10 ⁷	3.3 × 10 ⁸	3.3 × 10 ⁷
5	<i>E. coli</i> 1.29	6.08 × 10 ⁷	5.4 × 10 ⁷	5.4 × 10 ⁷	5.4 × 10 ⁷
6	<i>E. coli</i> 1.29	6.67 × 10 ⁷	4.6 × 10 ⁷	4.9 × 10 ⁷	4.9 × 10 ⁷
7	<i>E. coli</i> 1.29	16.0 × 10 ⁷	13 × 10 ⁷	17 × 10 ⁷	14.0 × 10 ⁷
8	<i>E. coli</i> 1.353	21.5 × 10 ⁷	17 × 10 ⁷	21 × 10 ⁷	21.0 × 10 ⁷
准确度 (%)		100	48.33	91.66	88.25

8. 三种十五管法复苏率比较

采集现场水和纯种大肠杆菌以三种方法进行检测, 同时把该样品置冰箱 10℃ 48 h 以后取出, 再次检测, 比较两次的检测数, 计算复苏率, 结果列表于 10。

通过以上三方面 39 次实验, 二步十五管法在检出率、准确度、复苏率均优于三步法和

一步法。其检测步骤比三步法更简单、快速。可认为在多管发酵法中，二步十五管法是检测海水中大肠菌群细菌的较好方法。

表 10 三种十五管法复苏率比较

水 样 来 源	一 步 法			二 步 法			三 步 法		
	处理前 检出数 (0.01个 cm ³)	处理后 检出数 (0.01个 cm ³)	复苏率 (%)	处理前 检出数 (0.01个 cm ³)	处理后 检出数 (0.01个 cm ³)	复苏率 (%)	处理前 检出数 (0.01个 cm ³)	处理后 检出数 (0.01个 cm ³)	复苏率 (%)
厦门港	2 300.0	1 300	56.52	3 300.0	2 100	63.63	3 300.0	2 100	63.63
海滨浴场	170.0	90.0	52.92	230.0	170	73.91	230.0	170	73.97
大亚湾	8.0	6.0	75.0	17.0	11.0	64.0	17.0	11.0	64.0
<i>E. coli</i> 1.353	17.0 × 10 ⁷	7.0	41.17	23 × 10 ⁷	11 × 10 ⁷	48.69	23 × 10 ⁷	9 × 10 ⁷	39.13
<i>E. coli</i> 1.29	46.0 × 10 ⁶	13 × 10 ⁶	28.0	49 × 10 ⁶	17 × 10 ⁶	34.7	49.0 × 10 ⁶	14 × 10 ⁶	28.8
平均复苏率 (%)	50.72			56.97			53.89		

9. 滤膜法与发酵法比较

对选出的两种温度 M-TEC 培养基法和二步十五管法的比较实验表明, 发酵法对大肠菌群的检出数高于滤膜法, 且较稳定。若以发酵法的检出数为对照, 按 100% 计, 则滤膜法的检出数为发酵法的 92.40%。

表 11 滤膜法与发酵法检出数比较

序 号		1	2	3	4	5	6	7	8	9	平均检出率 (%)
滤膜法	检出数(0.01个/cm ³)	933	2 900	3 134	1 667	1 067	1 730	2 060	4 330	34 300	92.4
	检出率 (%)	71.77	100	100	50.52	97	32.04	38.15	100	98	
发酵法	检出数(0.01个/cm ³)	1 300	1 300	1 300	3 300	1 100	5 400	5 400	3 500	35 000	100
	检出率 (%)	100	44.53	41.48	100	100	100	100	80.83	100	

三、讨 论

在《海洋污染调查暂行规范》中对大肠菌群的检测所采用的滤膜法(双层培养基法)和发酵法(三步十五管法), 主要是根据美国《水和废水标准检测法》第14版(1976)和我国《生活饮用水水系检验方法》第2版(1983)经采用现场海水样品进行多次验证而选用的方法。本试验采用了包括该两方法在内的四种滤膜法和三种发酵法进行比较检测, 由于这种比较是以其中一方法的检出数作对照值而进行的, 因此其结果也是相对稳定的。结果表明, 无论在粪大肠菌检出率、准确度、复苏率和选择性等方面, 两种温度 M-TEC 培养基法均优于其他三种滤膜法, 其检测过程只需用一种培养基, 同样能在 24 h 内得结果, 比双层培养基法简便、快速。而二步十五管法则优于其他两种十五管法, 它比三步十五管法简单、快速, 因此推荐该两法作为检测沿岸水域粪大肠菌群的方法。

四、结 语

1. 所比较的四种滤膜法中, 采用两种温度 M-TEC 培养基法检测沿岸水域粪大肠菌时, 可得到较好的结果。其检测的最佳条件为水样经 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤后, 滤膜紧贴于培养基表面, 在 37°C 预培养 0.5h , 尔后转置 $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 培养 $23-24\text{h}$, 计数滤膜上的黄色菌落, 计算水样含菌数。

2. 在三种所比较的发酵法中, 二步十五管发酵法的检出率、准确度、复苏率均优于其他二法, 检测过程简便、快速。检测最佳条件是样品以三个不同稀释度分别接种于装有培养基的十五管中, 于 $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 培养 24h , 把产酸产气管转接于 EC 培养液中, $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 培养 24h , 记录产气管数, 并查《MPN》表, 计算水样含菌数。

参 考 文 献

- [1] Standrige, J. H. and J. J. Delfino, Alternative technique for fecal coliform organism enumeration in chlorinated waste water, *Appl. Environ. Microbiol.*, **42** (1981), 918.
- [2] *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*, New York, 1981.
- [3] Reasoner, D. J. et al., Rapid seven hour fecal coliform test, *Appl. Environ. Microbiol.*, **38** (1979), 229-236.
- [4] Pagel, J. E. et al., Comparison of four membrane filter methods for fecal coliform enumeration, *Appl. Environ. Microbiol.*, **43** (1982), 787-793.