

优化生活饮用水中微生物检测的处理方法

罗晓慧*, 左柱敏, 赵大庆, 李惠静, 麦苗
(广西壮族自治区贺州市食品药品检验所, 贺州 542800)

摘要: **目的** 优化生活饮用水微生物检测中总大肠菌群、耐热大肠菌群、大肠埃希氏菌滤膜法的稀释及过滤方法, 并验证方法可行性。**方法** 待测水样稀释 1 倍, 旋转加入稀释液过滤, 再依据国家标准 GB/T 5750.12-2006 《生活饮用水标准检验方法 微生物指标》滤膜法的条件, 培养、验证; 同时按照该方法处理能力验证待测水样, 检验并上报结果。**结果** 总大肠菌、耐热大肠菌、大肠埃希氏菌菌落在滤膜上生长均匀, 可计数, 能力验证结果 $|Z|$ 均小于 2。**结论** 通过能力验证证实本实验稀释方法合理, 过滤手段有效, 适用于复杂水样总大肠菌群、耐热大肠菌群、大肠埃希氏菌的检测。

关键词: 生活饮用水; 总大肠菌群; 耐热大肠菌群; 大肠埃希氏菌; 滤膜法; 稀释方法; 能力验证

Optimization of treatment method for microbial detection in drinking water

LUO Xiao-Hui*, ZUO Zhu-Min, ZHAO Da-Qing, LI Hui-Jing, MAI Miao
(Hezhou Institute for Food and Drug Control, Hezhou 542800, China)

ABSTRACT: Objective To optimize the dilution and filtration methods of total coliform, heat-resistant coliform and *Escherichia coli* in the detection of microorganisms in drinking water, and verify the feasibility of the method. **Methods** The water sample to be tested was diluted 1 time, added to the dilution solution by rotation, and then cultured and verified according to the conditions of the national standard GB/T 5750.12-2006 *Standard test method for drinking water standards microbiological index*. The processing capacity of this method was performed to verify the water sample, and the results were reported. **Results** Total coliform, heat-resistant coliform and *Escherichia coli* colonies grew uniformly on the filter membrane and could be counted. The results of capacity verification showed that $|Z|$ were all less than 2. **Conclusion** Through the verification of capability, it is proved that the dilution method of this experiment is reasonable and the filtration method is effective. It is suitable for the detection of total coliform bacteria, heat-resistant coliforms and *Escherichia coli* in complex water samples.

KEY WORDS: drinking water; total coliform; thermostable coliform; *Escherichia coli*; membrane filter technique; dilution method; proficiency testing

1 引言

随着扶贫工作的深入开展, 各地农村生活水平得到很大的改善, 但是绝大多数农村仍然没有自来水厂, 生活饮用水以山泉水、水库水或地下水为主。通过检验检测机

构或卫生部门对农村生活饮用水质的监控, 发现菌落总数和大肠菌群合格率往往偏低^[1-3]。微生物指标是判定饮用水水质是否适合饮用的重要依据, 其中, 大肠菌群是重要的检验项目^[4,5]。大肠菌群是食品是否被粪便污染的理想指示菌, 耐热大肠杆菌和大肠埃希氏菌可作为致病菌指标^[6]。

*通讯作者: 罗晓慧, 中级工程师, 主要研究方向为食品药品检验检测、食品营养与卫生。E-mail: 2696928710@qq.com

*Corresponding author: LUO Xiao-Hui, Intermediate Engineer, Hezhou Institute for Food and Drug Control, No.196, Xiyue Road, Hezhou 542800, China. E-mail: 2696928710@qq.com

因此提高生活饮用水中总大肠菌群、耐热大肠菌群、大肠埃希氏菌的检测水平,对监控农村生活饮用水水质安全愈发重要。

现行有效的检测饮用水中大肠菌群的国家标准为 GB/T 5750.12-2006《生活饮用水标准检验方法 微生物指标》^[7],标准中规定了生活饮用水和水源中总大肠菌群、耐热大肠菌群、大肠埃希氏菌的检测方法--滤膜法。滤膜法操作步骤较为简单,检验周期较短,成本较低,运用十分广泛^[8,9]。但对于山泉水、水库水或地下水等复杂水样来说,标准未作出明确的稀释、过滤方法。运用标准中规定的滤膜法测定水样,常会出现因稀释倍数不适当、过滤方法不恰当,带来的菌落聚集成片、难以观察、无法计数或结果不准确等问题。

本研究将探讨复杂水样的稀释与过滤方法的优化方案,并使用能力验证,证实方法是否可行、有效^[10-12],为提高滤膜法测定复杂水样中总大肠菌群、耐热大肠菌群、大肠埃希氏菌含量的准确性提供参考。

2 材料与方法

2.1 菌株、样品、仪器与培养基

菌种为大肠埃希氏菌(ATCC 25922,广州环凯生物科技有限公司)。

样品为冻干粉末(中国检验检疫科学研究院测试评价中心)。

EZ-fit3 微生物过滤系统(德国默克密理博公司);ZF-2 暗箱式三用紫外分析仪(上海光豪分析仪器有限公司);SW-CJ-2FD 超净工作台(广州瑞智净化设备有限公司);YXQ-LS-50SII 立式压力蒸汽灭菌器(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);HH.S21-8 电热恒温水浴锅(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);SPX-150B-Z 生化培养箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);L3201LED4 荧光显微镜(广州粤显光学仪器有限公司)。

主要培养基为肉汤培养基、品红亚硫酸钠培养基、乳糖蛋白胨培养液、MFC 培养基、EC 培养基、MUG 营养琼脂培养基、革兰氏染色液(广东环凯生物科技有限公司);培养基配制用水为超纯水。

2.2 方法

2.2.1 阳性菌液的制备

将大肠埃希氏菌(ATCC 25922)从磁珠保存管中接出,置于灭菌肉汤中,37℃培养 24 h。对照麦氏比浊管,使用灭菌生理盐水制备约 100 CFU/100 mL 的菌悬液,即为阳性菌液。

2.2.2 待测水样的制备

按照能力验证参试指导书的方法处理 2 份冻干样品,无菌操作,使用灭菌生理盐水对冻干粉再水化,充分溶

解、混匀,得到 220 mL 待测水样。

2.2.3 试验方法

按照 GB 4789.1-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 总则》^[13]及 GB/T 5750.12-2006《生活饮用水标准检验方法微生物指标》^[7](以下简称 GB/T 5750.12-2016)的要求开展检测。阳性菌液分别过滤 50、20、10、1 mL 菌液,不够 100 mL 的使用灭菌生理盐水补齐,并按照 2.2.4 的方法进行培养、验证、计数。

对照组则按照优化方法:使用生理盐水将阳性菌液稀释一倍,混匀,得到对照菌液。过滤对照菌液 100、40、20、2 mL,并在过滤 2 mL 菌液前,往滤杯中加入 10 mL 灭菌生理盐水。倒入菌液后沿滤杯壁旋转加入生理盐水补齐 100 mL,立即过滤。按照 2.2.4 的方法进行培养、验证、计数。

2.2.5 能力验证待测水样的测定

能力验证待测水样根据以上试验得出的最优方法进行稀释、过滤。由于待测水样量有限,总大肠菌群和大肠埃希氏菌检验操作由 2 名实验人员独立操作,耐热大肠菌群由一名实验人员独立操作。

(1) 总大肠菌群测定

过滤菌液后的滤膜夹取,滤膜截留细菌面朝上,紧贴在品红亚硫酸钠培养基上,平皿倒置于恒温培养箱内 37℃培养 24 h。挑取特征菌落进行革兰氏染色,再接种乳糖蛋白胨培养液,于 37℃培养 24 h,有产酸产气为阳性,并计算结果。

(2) 耐热大肠菌群

过滤菌液后的滤膜夹取,滤膜截留细菌面朝上,紧贴在 MFC 培养基上,用防水胶带封贴每个平皿,并放入塑料袋内,浸到 44.5℃恒温水浴里,培养 24 h。对可疑菌落接种 EC 培养基,44.5℃培养 24 h,如产气为阳性,并计算结果。

(3) 大肠埃希氏菌

2.2.4 中培养的有典型菌落生长的滤膜,细菌截留面朝上转移到 NA-MUG 平板上,于 36℃培养 4 h。培养后将平板在暗处用波长为 366 nm 功率为 6 W 的紫外光灯照射,有荧光产生为阳性,计算结果。

以上方法均使用生理盐水及空白滤膜做空白试验。

3 结果与分析

3.1 2 种不同处理的结果

根据 2.2.3 的实验方法,得到阳性菌液与对照菌液的结果见表 1。

3.2 能力验证结果

根据 3.1 结果,发现对照菌液的特征菌落生长较为分散,梯度呈现较好,因此能力验证待测水样采用对照菌液稀释、过滤方法处理。根据 3.1 结果与能力验证待测水样水质情况分析,将待测水样先稀释 1 倍,再依次过滤 100、10、1 mL。

表 1 阳性菌液与对照菌液结果
Table 1 Results of positive and contrast bacterial fluids

项目	试验	50°	20°	10°	1°	生理盐水/CFU	空白滤膜/CFU
阳性菌液	1	多不可计	27	16	0	0	0
	2	多不可计	20	9	0	0	0
对照菌液	1	多不可计	25	14	1	0	0
	2	多不可计	30	16	2	0	0

注: *: 过滤液折算成待测水样原液的体积(mL), 培养后的特征、并证明为总大肠菌群的菌落数。

表 2 总大肠菌群菌结果
Table 2 Results of total coliforms

样品	实验员	50°	5°	0.5°	结果/ (CFU/100 mL)	生理盐水	空白滤膜	上报结果 (CFU/100 mL)	Z 值
样品 1	检验员 1	多不可计	多不可计	17	34	0	0	3.6×10^3	-0.9
	检验员 2	多不可计	多不可计	19	38	0	0		
样品 2	检验员 1	多不可计	多不可计	12	24	0	0	2.6×10^3	-1.6
	检验员 2	多不可计	多不可计	14	28	0	0		

注: *: 过滤液折算成待测水样原液的体积(mL), 培养后的特征、并证明为总大肠菌群的菌落数。

表 3 耐热大肠菌群结果
Table 3 Results of thermostable coliform bacteria

样品	实验员	50°	5°	0.5°	结果/ (CFU/100 mL)	生理盐水	空白滤膜	上报结果 (CFU/100 mL)	Z 值
样品 1	检验员 1	多不可计	多不可计	10	20	0	0	2.0×10^3	-1.3
样品 2	检验员 1	多不可计	多不可计	8	16	0	0	1.6×10^3	-1.6

注: *: 过滤液折算成待测水样原液的体积(mL), 培养后的特征、并证明为耐热大肠菌群的菌落数。

表 4 大肠埃希氏菌结果
Table 4 Results of *Escherichia coli*

样品	实验员	50°	5°	0.5°	结果/ (CFU/100 mL)	生理盐水	空白滤膜	上报结果 (CFU/100 mL)	Z 值
样品 1	检验员 1	多不可计	多不可计	9	18	0	0	1.9×10^3	-0.9
	检验员 2	多不可计	多不可计	10	20	0	0		
样品 2	检验员 1	多不可计	多不可计	5	10	0	0	1.1×10^3	-1.8
	检验员 2	多不可计	多不可计	6	12	0	0		

注: *: 过滤液折算成待测水样原液的体积(mL), 培养后的特征、并证明为大肠埃希氏菌的菌落数。

3.2.1 总大肠菌群能力验证待测水样结果

对于总大肠菌群的测定, 2 名检验员结果接近, 结果满意。详见表 2。

3.2.2 耐热大肠菌群

对耐热大肠菌群的检测结果详见表 3。

3.2.3 大肠埃希氏菌

对于大肠埃希氏菌的测定, 2 名检验员结果接近, 结果满意。详见表 4。

3.3 分析

根据过滤系统的使用说明, 滤膜计数的最佳菌落数为小于 50 CFU/片, 因此本实验选取阳性菌量小于 50 CFU 的水样进行。本实验先使用未经稀释的阳性菌液和经稀释的对照阳性菌液进行对比试验。对照阳性菌液为阳性菌液先经 1 倍稀释, 并且在过滤水样量较少的情况下(2 mL), 在滤杯内先倒入一定量无菌生理盐水, 再加水样, 再补齐

100 mL, 防止菌落聚集。经过对比试验, 发现阳性菌液滤膜上菌落生长分散性较差, 特别是滤杯边缘滤膜上的菌落, 有聚集成片现象; 稀释梯度菌落数比例不明显。对照阳性菌液菌落生长分散性较好, 易于观察菌落特征和挑取, 在低稀释度时可测出含菌量; 同时旋转加入稀释液, 一定程度上避免了滤杯边缘滤膜菌落聚集的现象。

因此, 选用对照菌液的处理及过滤方法, 测定能力验证待测水样, 结果比较满意, 证实方法可行。

4 结论与讨论

本论文提出了一种生活饮用水中总大肠菌群、耐热大肠菌群、大肠埃希氏菌滤膜法处理优化的方法, 并通过参加能力验证证实该方法有效。虽然证实方法可行, 但本实验仍有些不足: (1) 受限于使用的过滤系统滤杯的定量, 未能实现成比例的梯度取样; (2) 由于能力验证提供样品有限, 未能实现更为合适的梯度取样, 结果 μ 偏大。因此在实际运用时, 要根据待测水样的来源, 对稀释倍数进行初判, 再运用本论文优化的方法, 以提高检验结果的准确性, 从而提高实验室的检验检测能力。

参考文献

- [1] 彭佳艳, 赵永, 郑维斌, 等. 2014~2016年保山市农村饮用水卫生状况监测分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(15): 4175-4179.
Peng JY, Zhao Y, Zhen WB, *et al.* Monitoring and analysis of drinking water hygiene status in rural areas of Baoshan city from 2014 to 2016 [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(15): 4175-4179.
- [2] 王舒, 李继芳, 崔仲明. 2017年辽宁省农村饮用水中微生物污染状况调查[J]. 中国卫生工程学, 2018, (6): 255-256.
Wang S, Li JF, Cui ZM. Investigation on microbial pollution in rural drinking water in Liaoning province in 2017 [J]. *Chin J Public Health Eng*, 2018, (6): 255-256.
- [3] 覃昆飞, 曾肖寒, 郑巨瑞. 2015年-2017年贵港市覃塘区农村饮用水水质监测结果分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2018, 28(19): 2417-2419.
Qin KF, Zeng XH, Zhen JR. Analysis of the monitoring results of rural drinking water quality in Qintang district, Guigang during 2015-2017 [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2018, 28(19): 2417-2419.
- [4] 扎丽帕·热合曼, 董宪春. 生活饮用水水质微生物检验分析的重要性[J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(77): 175.
Zharipa RHM, Dong XC. Importance of microbial testing and analysis of drinking water quality [J]. *World's Latest Med Inf Abstract*, 2017, 17(77): 175.
- [5] 朱静鸿, 龚云伟, 赵红. 399份生活饮用水微生物指标检测与分析[J]. 中国卫生产业, 2015, 23(37): 37-39.
Zhu JH, Gong YW, Zhao H. Detection and analysis of microbial indicators in 399 samples of drinking water [J]. *China Health Ind*, 2015, 23(37): 37-39.
- [6] 何国庆, 张伟. 食品微生物检验技术[M]. 北京: 中国质检出版社, 中国标准出版社, 2013.
He GQ, Zhang W. Food microbiological testing technology [M]. Beijing: China Quality Inspection Press, China Standards Publishing House, 2013.
- [7] GB/T 5750.12-2006 生活饮用水标准检验方法 微生物指标[S].
GB/T 5750.12-2006 Standard examination methods for drinking water--Microbiological parameters [S].
- [8] 史梦雨. 生活饮用水中总大肠菌群的两种方法比较[J]. 中国城乡企业卫生, 2017, 10(10): 139-140.
Shi MY. Comparison of two methods for total coliforms in drinking water [J]. *Chin J Urban Rural Enter Hyg*, 2017, 10(10): 139-140.
- [9] 冯雪娇. 关于水中总大肠菌群检测方法的探讨[J]. 黑龙江科技信息, 2013, (14): 32.
Feng XJ. Discussion on detection method of total coliforms in water [J]. *Heilongjiang Sci Technol Inf*, 2013, (14): 32.
- [10] 汪桃花, 代真真, 王新文, 等. 能力验证对提升实验室技术水平的影响[J]. 现代食品, 2018, (16): 19-22.
Wang TH, Dai ZZ, Wang XW, *et al.* Impact of proficiency testing in technical level of the laboratory [J]. *Mod Food*, 2018, (16): 19-22.
- [11] 劳嘉倩. 浅谈食品检测实验室质量控制技术[J]. 广东化工, 2018, 21(45): 56-57.
Lao JQ. Technology of quality control in food testing laboratory [J]. *Guangdong Chem Ind*, 2018, 21(45): 56-57.
- [12] 袁磊, 乔荣霞, 杨洪, 等. 2017年食品检验实验室能力验证结果分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 20(9): 5504-5510.
Yuan L, Qiao RX, Yang H, *et al.* Proficiency testing results and analysis of food laboratories in 2017 [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 20(9): 5504-5510.
- [13] GB 4789.1-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 总则[S].
GB 4789.1-2016 National food safety standard-General rules for food microbiological-Inspection [S].

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



罗晓慧, 中级工程师, 主要研究方向为食品药品检验检测、食品营养与卫生。
E-mail: 2696928710@qq.com