

荧光观察方法检测水中大肠埃希氏菌的应用

鲍晓凤, 刘胜桃*, 秦思文, 刘丽云, 张淑丽, 关蕴杰, 王秀艳, 廉 杰

(蒙牛乳业(沈阳)有限责任公司, 沈阳 110122)

摘 要: 目的 比对 2 种荧光观察方法检测生活饮用水中大肠埃希氏菌的适用性、灵敏度及稳定性。**方法** 使用全自动菌落计数器与传统多管发酵法 2 种方法对大肠埃希氏菌 EC-MUG 肉汤管进行荧光观察测试、分析。

结果 仪器法较传统法灵敏, EC-MUG 肉汤管培养 4 h 后使用仪器即可观察到蓝色荧光, 6 h 后呈现深蓝色荧光, 而传统法在 6 h 时荧光现象微弱呈淡蓝色, 10 h 后荧光现象逐渐明显呈现蓝色。分别使用传统法与仪器法观察 10 组水样结果无差异。**结论** 观察水中大肠埃希氏菌荧光现象时可使用仪器法和传统法, 但仪器法更有优势, 灵敏度高, 操作简单, 值得推广。

关键词: 生活饮用水; 大肠埃希氏菌; 荧光; 检测

Application of fluorescence observation methods in the detection of *Escherichia coli* in water

BAO Xiao-Feng, LIU Sheng-Tao*, QIN Si-Wen, LIU Li-Yun, ZHANG Shu-Li,
GUAN Yun-Jie, WANG Xiu-Yan, LIAN Jie

(Mengniu Dairy Industrial (Shenyang) Co., Ltd., Shenyang 110122, China)

ABSTRACT: Objective To compare the applicability, sensitivity and stability of the 2 kinds of fluorescence observation methods for the detection of *Escherichia coli* in drinking water. **Methods** Automatic instrumental method and traditional multi-tube fermentation method were used to observe and analyze the fluorescence of *Escherichia coli* EC-MUG broth tube. **Results** The instrumental method was more sensitive than traditional method. The instrumental method showed that blue fluorescence could be observed after 4 h, while it was more obvious after 6 h. Traditional method showed that blue fluorescence gradually became light blue after 6 h, while it was gradually obvious after 10 h. There was no difference between traditional method and instrumental method in stability test. **Conclusion** Instrumental method and traditional method can be used to observe the fluorescence of *Escherichia coli* in water, but the instrumental method has more advantages, higher sensitivity and simpler operation, which is worth popularizing.

KEY WORDS: drinking water; *Escherichia coli*; fluorescence; detection

1 引 言

大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)又称大肠杆菌或普通大肠杆菌,存在于人和温血动物的肠道中^[1],是一种条件致病菌,当其数量超过一定限度时,容易在人体肠道内繁

殖,导致肠道的正常菌群紊乱,从而引起腹泻等疾病^[2,3]。在粪便污染、卫生处理等方面常选用大肠埃希氏菌为指标^[4]。截至 2003 年,美国已有 19 个州采用大肠埃希菌作为评价水质好坏的指标^[5]。2006 年,欧盟强制将大肠埃希菌作为水质微生物的检测指标^[6],我国实行 GB 5749《生活

*通讯作者: 刘胜桃, 助理工程师, 主要研究方向为乳及乳制品微生物学。Email: 573209185@qq.com

*Corresponding author: LIU Sheng-Tao, Assistant Engineer, Mengniu Dairy Industrial (Shenyang) Co., Ltd., No.121, Shenbei Road, Shenbeixin District, Shenyang 110122, China. E-mail: 573209185@qq.com

饮用水卫生标准》，其中微生物指标有：菌落总数、总大肠菌群、大肠埃希氏菌和耐热大肠菌群^[7]。实验室依据《生活饮用水标准检验方法 微生物指标》^[8]中多管发酵法检测生活饮用水大肠埃希氏菌，其检测原理为 4-甲基伞形酮- β -D-葡萄糖醛酸苷可作为检测大肠埃希氏菌的底物微生物体内特有的酶能分解特定的显色或荧光底物，产生有颜色的产物或发出荧光，可通过测定该有色产物或荧光从而测定微生物的数量^[9]。此方法中荧光反应实验结果直接影响样品中大肠埃希氏菌的含量，传统方法要求在暗处对 EC-MUG 肉汤管进行荧光现象观察，此步骤易受可见光影响，导致试验管荧光现象不明显，为了简化实验流程，提高实验效果的辨识度，采用全自动菌落计数仪观察荧光现象，其优势为拥有 1000 万像素的超高分辨率真彩摄像头，366 nm 紫外灯光源，可超清晰展现试管内培养物的荧光现象，本文对传统荧光现象观察方法及仪器观察法 2 种方法展开对比分析，以便了解仪器法观察大肠埃希氏菌荧光现象的应用效果。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 菌种与样品来源

大肠埃希氏菌(*Escherichia coli* ATCC 25922)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC 6538)来自于美国标准菌种保藏中心；鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium* CICC 22956)、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes* CICC 10293)来自于中国工业微生物菌种保藏管理中心。

2.1.2 主要仪器与试剂

HR40-IIA2 生物安全柜(青岛海尔特种电器有限公司)；SSW-600-2S 恒温水箱(上海一恒科技有限公司)；CzoneG6T 全自动菌落计数仪(杭州迅数科技有限公司)。

乳糖蛋白胨培养液(CM122, 北京陆桥技术股份有限公司)；EC-MUG 培养基(CM1516, 北京陆桥技术股份有限公司)。

2.2 方法

2.2.1 工作菌株培养

将大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌、产气肠杆菌标准储存菌株，分别加入 10 mL 胰蛋白胨大豆肉汤中，于(36±1) °C 培养 18~24 h 后划线哥伦比亚血平板，于(36±1) °C 培养 18~24 h 使用 API 20E 对大肠埃希氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、产气肠杆菌进行生化鉴定^[10]，API STAPH 对金黄色葡萄球菌进行生化鉴定^[11]。将确认的典型菌落作为测试菌株使用。

2.2.2 含菌 EC-MUG 肉汤的制备

将检查无自发荧光的 EC-MUG 肉汤，分装每管 10 mL 于 115 °C 高压灭菌 20 min，分别接种菌含量为 10⁸ CFU/mL 大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌、产气肠杆菌工作菌悬液，每管接种 10 μ L。

2.2.3 CzoneG6T 抑菌圈测量及全自动菌落计数仪参数设置

仪器光源系统包含 366 nm 紫外光，为菌落荧光激发测试和研究提供平台^[12]，可用于大肠埃希氏菌等的荧光激发和统计分析，及可调节的曝光时间，曝光时间参数设置范围在 0.203~60000 ms 之间，需注意曝光时间设置过低易导致拍摄图片过暗从而在图片上观察不到荧光，通常将仪器曝光时间范围设定为 4800~10000 ms，本研究曝光时间设定为 8000 ms。

2.2.4 操作步骤

将接种以上 4 种测试菌株的 EC-MUG 肉汤管于 (44.5±0.5) °C 培养(24±2) h 后分别使用传统方法(在暗处使用 366 nm 波长紫外光照射观察肉汤管的荧光反应)及仪器法(将肉汤管置于仪器内拍摄暗箱使用 366 nm 波长紫外光照射，观察结果并做空白对照^[13]，调节软件曝光时间 8000 ms，使用拍摄功能，使样品管清晰呈像观察其荧光现象。

3 结果与分析

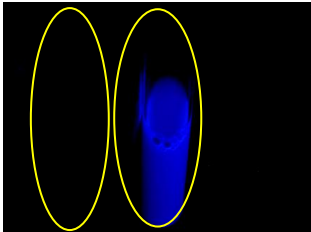
3.1 适用性实验

使用传统方法及仪器法对大肠埃希氏菌进行荧光反应观察，同时选择不产荧光的金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌、产气肠杆菌作为阴性对照，如表 1 所示。

表 1 适用性实验结果
Table 1 Results of applicable experiment

序号	测试菌	培养时间/h	传统方法	仪器法
1	大肠埃希氏菌	24±2	灰蓝色荧光	蓝色荧光
2	金黄色葡萄球菌	24±2	无荧光	无荧光
3	鼠伤寒沙门氏菌	24±2	无荧光	无荧光
4	产气肠杆菌	24±2	无荧光	无荧光

2 种方法在 366 nm 波长紫外光下均可使大肠埃希氏菌产生荧光，因仪器法观察可减少可见光的影响，观察背景处于完全黑暗的状态，使样品管的荧光现象更加明显，故样品管产生深蓝色荧光(图 1)，而传统方法观察由于观察环境不能完全隔绝可见光的干扰，故观察试验管的荧光为灰蓝色(图 2)，非目标菌金黄色葡萄球菌^[14]、鼠伤寒沙门氏菌^[15]、产气肠杆菌在 2 种条件下观察均不产生荧光现象。



注：试验管(右)产荧光，对照管(左)无荧光。

图 1 仪器法观察大肠埃希氏菌

Fig.1 Observation of *Escherichia coli* by instrumental method

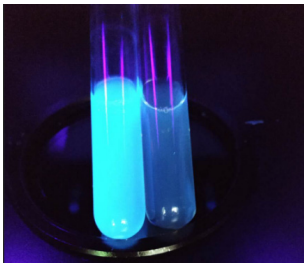


图 2 传统方法观察大肠埃希氏菌

Fig.2 Observation of *Escherichia coli* by traditional method

3.2 灵敏度实验

在相同条件下培养 EC-MUG 肉汤管, 每隔 2 h 分别用传统方法及仪器法进行观察, 同时进行菌落计数, 确定其菌含量, 追踪 24 h 结果, 观察 EC-MUG 肉汤管荧光现象, 如表 2 所示。

表 2 灵敏度实验结果

Table 2 Result of sensitivity test

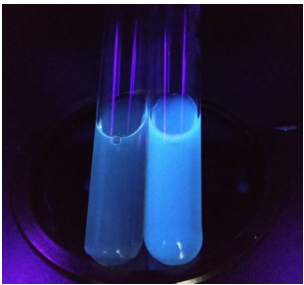
序号	培养时间/h	菌含量 (CFU/mL)	传统方法	仪器法
1	0	1300	—	—
2	2	9800	—	—
3	4	55000	—	++
4	6	680000	+	+++
5	8	1800000	+	+++
6	10	20000000	++	+++
7	12	120000000	++	+++
8	14	330000000	+++	+++
9	16	550000000	+++	+++
10	18	580000000	+++	+++
11	20	700000000	+++	+++
12	22	750000000	+++	+++
13	24	820000000	+++	+++

注: “+++”产深蓝色荧光; “++”产蓝色荧光; “+”产淡蓝色荧光; “—”无荧光可见。

传统方法在培养 6 h 后可略微观察到浅蓝色荧光现象(图 3), 12 h 时荧光现象逐渐明显, 使用仪器法进行观察在培养 4 h 后即可观察到蓝色荧光(图 4), 培养至 6 h 即可观察到深蓝色的荧光现象(图 5)。

3.3 对比实验

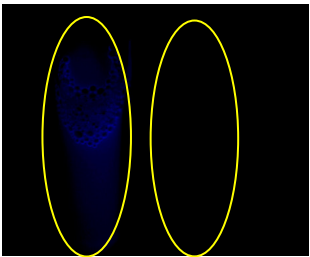
取 10 组生活饮用水, 其中 9 组分别添加不同浓度的大肠埃希氏菌悬液, 1 组为空白样品, 依据 GB/T 5750.12-2006 《生活饮用水标准检验方法 微生物指标》^[8] 大肠埃希氏菌多管发酵法进行检测, 荧光反应实验分别使用传统方法及全自动菌落计数仪进行观察, 如表 3 所示。2 种方法观察 EC-MUG 肉汤管得出结论一致, 检测结果无差异。



注: 试验管(右)产荧光, 对照管(左)无荧光。

图 3 培养 6 h 传统方法观察效果

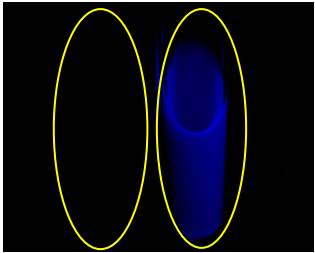
Fig.3 Observation effect of 6 h cultured by traditional method



注: 试验管(左)产荧光, 对照管(右)无荧光。

图 4 培养 4 h 仪器法观察效果

Fig.4 Observation effect of 4 h by instrumental method



注: 试验管(右)产荧光, 对照管(左)无荧光。

图 5 培养 6 h 仪器法观察效果

Fig.5 Observation effect of 6 h cultured by instrumental method

表 3 对比实验结果

Table 3 Contrast experimental results

序号	样品名称	传统方法检测结果 (MPN/100 mL)	仪器法检测结果 (MPN/100 mL)
1	加标水样 1	1100000	1100000
2	加标水样 2	79000	79000
3	加标水样 3	11000	11000
4	加标水样 4	35000	35000
5	加标水样 5	5400	5400
6	加标水样 6	790	790
7	加标水样 7	2300	2300
8	加标水样 8	430	430
9	加标水样 9	33	33
10	空白水样 10	< 2	< 2

4 结 论

通过适用性、灵敏度、稳定性实验得出以下结论:

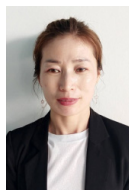
(1) 传统方法和仪器法均可用于水样中大肠埃希氏菌荧光反应实验, 2种荧光观察方法只针对目标菌大肠埃希氏菌能够观察到特征性荧光, 仪器专为荧光观察设计了拍摄暗箱, 隔绝了外界可见光的干扰, 故仪器法观察到的荧光现象更为清晰明显; (2) 灵敏度方面仪器法也较传统方法存在优势, 可提前观察到荧光现象; (3) 通过检测10组样品中大肠埃希氏菌进行对比, 2种方法得出检测结果无差异; (4) 仪器法在操作方面较传统方法更有优势, 操作简单, 相对传统方法可提前2h观察到荧光现象, 对于初学者更易于实验结果的辨别, 且仪器法图像可长期保存, 使实验记录完整可追溯, 值得推广。

参考文献

- [1] 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.
Zhang SF, Liu GQ, Wei CL. Methods and research progress of fecal coliforms detection [J]. Marine Sci Bull, 2008, 27(3): 102-106.
- [2] 丁程成. 欧美水质大肠菌群相关检验标准探究[J]. 环境科技, 2010, 23(1): 67-69.
Ding CC. Research on western relevant inspection standards of coliform group in water body [J]. Environ Sci Technol, 2010, 23(1): 67-69.
- [3] 张倩华. 农村生活饮用水水质检测结果分析[J]. 当代医学, 2012, 18(12): 161-162.
Zhang QH. Analysis of rural drinking water quality test results [J]. Contemp Med, 2012, 18(12): 161-162.
- [4] 邓婷, 梁漪莲, 骆琼, 等. 两种方法对水中总大肠菌群和大肠埃希氏菌检测的对比分析[J]. 食品工程, 2017, (1): 52-54.
Deng T, Liang YL, Luo Q, et al. Two methods' comparative analysis of detecting total coliform bacteria and *E. coli* bacteria in water [J]. Food Eng, 2017, (1): 52-54.
- [5] Michael PD, Marilyn CE. The fecal coliform assay, the results of which have led to numerous misinterpretations over the years, may have outlived its usefulness [J]. Am Soc Microbiol, 2006, 32: 123-126.
- [6] Garcia AT, Prats J, Servais P. Comparison of culturable fecal coliform and *E. coli* enumeration in freshwaters [J]. Can J Microbiol, 2007, 53: 798-801.
- [7] GB 5749-2006 生活饮用水卫生标准[S].
GB 5749-2006 Sanitary standard for drinking water [S].
- [8] 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 test methods for drinking water-Microbiological indicators [S].
- [9] 张小东, 鄢庆彬, 邹文政. MUG 单管定量检测法对大肠埃希氏菌的检测[J]. 集美大学学报, 2009, 14(4): 1-6.
Zhang XD, Yan QP, Zou WZ. Detection of *Escherichia coli* by MUG single tube quantitative detection method [J]. J Jimei Univ, 2009, 14(4): 1-6.
- [10] 王平, 陶红, 曹武. API20E 鉴定系统在肠杆菌科细菌检验中的应用[J]. 微生物学杂志, 1999, 19(3): 62.
Wang P, Tao H, Cao W. API20E application of identification system in enterobacteriaceae bacteria test [J]. J Microbiol, 1999, 19(3): 62.
- [11] 钟玮, 冯震, 鲍英, 等. 金黄色葡萄球菌的 API-STAPH 生化鉴定及核糖体分型分析[J]. 中国抗生素杂志, 2013, 38(5): 354-358.
Zhong W, Feng Z, Bao Y, et al. Identification of *Staphylococcus aureus* by API-STAPH test and ribosomal typing analysis [J]. Chin J Antibiot, 2013, 38(5): 354-358.
- [12] G6 全自动菌落计数分析仪[J]. 食品安全导刊, 2010, (7): 33.
G6 automatic colony count analyzer [J]. China Food Saf Magaz, 2010, (7): 33.
- [13] 许琰, 孙双福, 崔琳. 水中大肠埃希氏菌多管发酵法测定方法探讨[J]. 上海预防医学, 2013, 25(6): 340-342.
Xu Y, Sun SF, Cui L. Study on the determination method of *Escherichia coli* in water by multi-tube fermentation [J]. Shanghai J Prev Med, 2013, 25(6): 340-342.
- [14] 苏德模, 徐维洁, 刘 鹏. MUG 快速检定药品中大肠杆菌的方法研究[J]. 药物分析杂志, 1994, 14(5): 37-39.
Su DM, Xu WJ, Liu P. MUG study on the method of rapid identification of *Escherichia coli* in drugs [J]. Chin J Pharm Anal, 1994, 14(5): 37-39.
- [15] 袁月明, 俞慕华, 袁梦. 水中大肠菌群和大肠埃希氏菌检测方法的比较[J]. 河南预防医学杂志, 2009, 20(3): 185-186, 216.
Yuan YM, Yu MH, Yuan M. Comparison of detection methods of coliforms and *Escherichia coli* in water [J]. Henan J Prev Med, 2009, 20(3): 185-186, 216.

(责任编辑: 苏笑芳)

作者简介



鲍晓凤, 硕士, 工程师, 主要研究方向为乳及乳制品微生物学。
E-mail: baoxiaofeng@mengniu.cn



刘胜桃, 助理工程师, 主要研究方向为乳及乳制品微生物学。
E-mail: 573209185@qq.com