

不同方法及发酵管数量对大肠菌群检测结果的差异性分析

周明辉, 胡 姣, 杨光华, 杨代虎* (合肥师范学院生命科学学院, 安徽合肥 230061)

摘要 [目的]比较不同方法检测同种水样中大肠菌群含量的结果是否具有差异性,以及多管发酵法中发酵管数量对检测结果的影响。[方法]分别采取污染程度由低至高的A、B、C 3种水样,通过多管发酵法、纸片法、滤膜法检测相同水样中大肠菌群的含量,并在多管发酵法中利用9、10、15管发酵检测同种水样,采用SPSS软件对试验数据进行差异性分析。[结果]多管发酵法与纸片法差异不显著,结果具有一致性,而滤膜法与其他2种方法获得结果具有显著性差异。对9、10、15管发酵检测3种水样获得的结果进行方差分析,得到的 P 值分别是0.709、0.964、0.840,均大于0.05,故差异不显著,结果具有一致性。[结论]试验结果为大肠菌群检测方法的研究提供了理论依据。

关键词 检测方法;大肠菌群;水样;方差分析

中图分类号 S-03 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)34-0004-03

Differences of Different Methods and Number of Fermentation Tubes on Coliform Test Results

ZHOU Ming-hui, HU Jiao, YANG Guang-hua, YANG Dai-hu* (College of Life Science, Hefei Teachers College, Hefei, Anhui 230061)

Abstract [Objective] The aim was to compare the difference between the results of different methods to detect the content of coliforms in the same water samples and the effect of the number of fermentation tubes in the multi-tube fermentation method on the detection results. [Method] Three kinds of water samples of A, B and C with low pollution level were adopted, and the contents of coliform bacteria in the same water samples were detected by multi-tube fermentation, paper and filter method. The same kind of water samples were tested by 9, 10, 15 tube fermentation. The results were analyzed by SPSS software. [Result] The difference between the multi-tube fermentation method and the paper method was not significant, the results were consistent, and the filter method was significantly different from the other two methods. P values were 0.709, 0.964 and 0.840, respectively, which were more than 0.05, so the difference was not significant and the results were consistent. [Conclusion] The results provide reference for the detection of coliform bacteria.

Key words Detection method; Coliform bacteria; Water sample; Variance analysis

大肠菌群是指一群需氧及兼性厌氧,在37℃生长时能分解乳糖,培养24~48h产酸产气的革兰氏阴性、无芽孢的杆菌^[1]。这类细菌大多数无致病性,但致病性的细菌侵入人体的一些部位时,可引起腹泻、膀胱炎等^[2-3]。若食品中检出大肠菌群,说明该食品可能被肠道致病菌污染,存在着食物中毒和流行病的危险^[4]。食品中含大肠菌群量的多少,不仅可看出被粪便污染的情况,还反映出了在生产加工过程中的卫生状况,故大肠菌群的检出具有广泛的卫生学意义^[5-6]。

大肠菌群在人与动物的肠道中是一种正常存活的菌群,也是最主要、数量最多的菌群种类,已经成为各类食品进行粪源性污染细菌检测的指标,国际上普遍采用大肠菌群作为水质卫生学指标^[7]。采用适宜的大肠菌群检测方法,能准确及时地监测水域的污染状况,对流行疾病的发生与传播具有重要意义^[8]。世界各国已对大肠菌群的检测技术做了大量的研究工作,检测方法很多,如多管发酵法、滤膜法、纸片法、酶底物法、荧光原位杂交技术、自动化检测方法等^[9-11]。从操作简便性、检测结果准确性以及成本控制方面考虑,目前多管发酵法、滤膜法与纸片法在检测大肠菌群中应用较多,其中多管发酵法根据接种量的不同又可分为9、10、15管发酵^[12-14]。目前对上述3种方法检测同种样品所获结果的差异性研究较少,而对不同发酵管数对同种样品进行检测所获结果的比较就更少,为此,笔者利用3种方法以及不同管数

的多管发酵法检测了污染程度不同的水样,对其所获结果进行了统计学分析,以确定应用范围与差异显著性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 水样。在合肥师范学院内分别取污染程度不同的A、B、C 3份水样。

1.1.2 培养基。乳糖蛋白胨:乳糖5.0g、蛋白胨10.0g、牛肉膏3.0g、氯化钠5.0g、溴甲酚紫16mg、蒸馏水1000mL, pH7.1~7.5。伊红美蓝:乳糖10.0g、蛋白胨10.0g、磷酸氢二钾2.0g、琼脂20.0g、蒸馏水1000mL、2%伊红溶液20mL、0.5%美蓝水溶液13mL, pH7.2~7.4。品红亚硫酸钠:蛋白胨10.0g、牛肉膏5.0g、酵母浸膏5.0g、乳糖10.0g、琼脂15.0~20.0g、磷酸氢二钾3.5g、无水亚硫酸钠5.0g、50g/L碱性品红乙醇溶液20mL、蒸馏水1000mL。

1.1.3 试剂。革兰氏染液、水质大肠菌群检验纸片和0.45μm滤膜。

1.2 方法

1.2.1 水样采集。分别在合肥师范学院竹园广场池塘、柳渠中部、月湖采样,将带塞的已灭菌的取样瓶浸入距水面深10~15cm的水层中,拔去瓶塞,进行取样并备注,置冰箱中备用。

1.2.2 不同试验方法检测3种水样结果比较。多管发酵法与滤膜法依据国标HJ/T 347—2007同纸片法对3种水样进行检测,每种方法检测同批水样时进行5次重复试验,记录试验现象,利用SPSS 13和Graph pad 5.0软件对试验结果进行差异显著性分析。

1.2.3 不同管数发酵检测结果的比较。依据接种量的不同

基金项目 2017合肥师范学院校级质量工程;2017合肥师范学院国家级大学生创新创业项目。

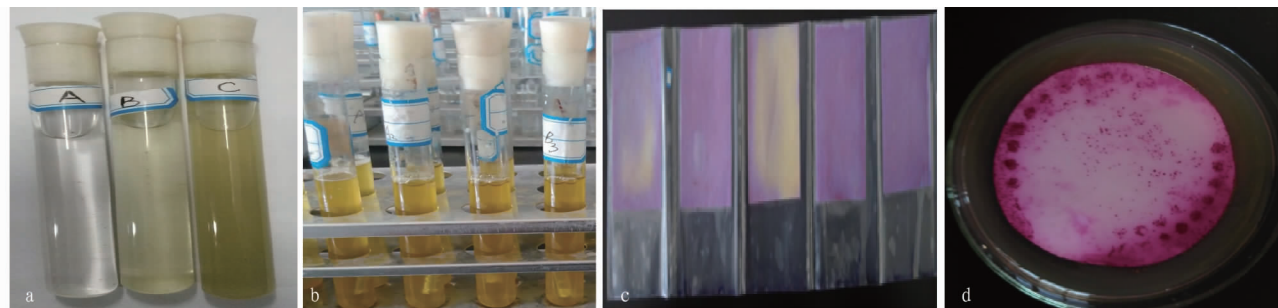
作者简介 周明辉(1982—),男,安徽无为,人,硕士,从事环境生物技术研究。*通讯作者,硕士,从事生物教学法研究。

收稿日期 2017-09-28

分别选取 9、10、15 管发酵检测 3 种不同的水样,查阅不同的 MPN 表获得检测结果,每种管数检测同种水样时进行 5 次重复试验,利用 SPSS 13 和 Graph pad 5.0 软件对其结果进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 水样状态及试验现象 由图 1 可知,3 种水样的污染程



注:a.水样状态;b.多管发酵阳性管;c.纸片法;d.滤膜法
Note:a. Water samples status;b. Multi-tube fermenting positive tube;c. Paper method;d. Filter method

图 1 水样状态及试验现象

Fig.1 Water samples status and experimental phenomena

由图 2 可知,采用 3 种方法检测 A 水样的大肠菌群数,多管发酵法较其他 2 种方法测得的结果偏高,滤膜法与多管发酵法的结果具有显著性差异,多管发酵法与纸片法所得 P 值为 0.071, $P > 0.05$,故差异不显著,滤膜法与纸片法所得 P 值为 0.071, $P > 0.05$,故差异不显著,即这 2 种方法检测结果具有一致性。

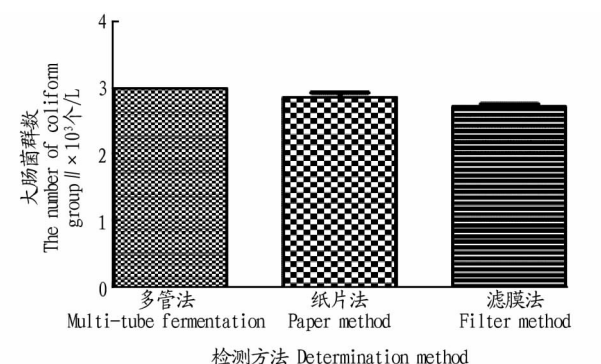


图 2 3 种方法检测 A 水样的结果

Fig.2 The determination result of A water sample by three methods

由图 3 可知,B 水样中大肠菌群数明显高于 A 水样,其中多管发酵法较其他 2 种方法测得的结果偏高,滤膜法测得的结果最小。经统计分析后得滤膜法测得的结果与多管发酵法、纸片法测得的结果有显著性差异,纸片法与多管发酵法所得 P 值为 0.481, $P > 0.05$,故差异不显著,即这 2 种方法检测结果具有一致性。

由图 4 可知,C 水样中大肠菌群数较高,其中多管发酵法较其他 2 种方法测得的数据偏高,滤膜法测得的结果最小,纸片法与多管发酵法所得 P 值为 0.209, $P > 0.05$,故差异不显著,即这 2 种方法检测结果具有一致性,而滤膜法与其他 2 种方法检测结果差异极显著。

2.3 不同管数发酵检测同种水样的结果分析 依据接种水

度具有明显差异,提高了试验的范围,增加了试验的可信度。通过预试验,3 种检测方法在对 3 种水样的检测过程中表现出明显的阳性结果,便于对试验结果进行统计分析。

2.2 3 种方法的结果比较 采用多管发酵法、纸片法、滤膜法分别对污染程度由低至高的 A、B、C 3 种水样进行大肠菌群检测,每种方法做 5 次重复。

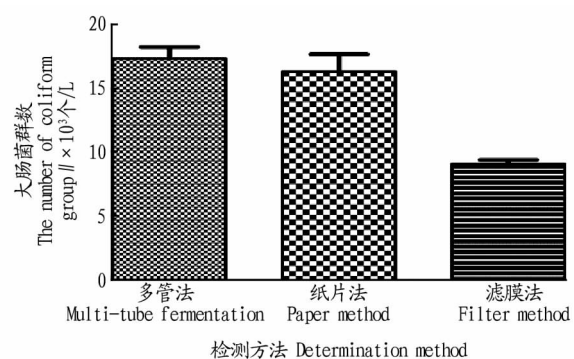


图 3 3 种方法检测 B 水样的结果

Fig.3 The determination result of B water sample by three methods

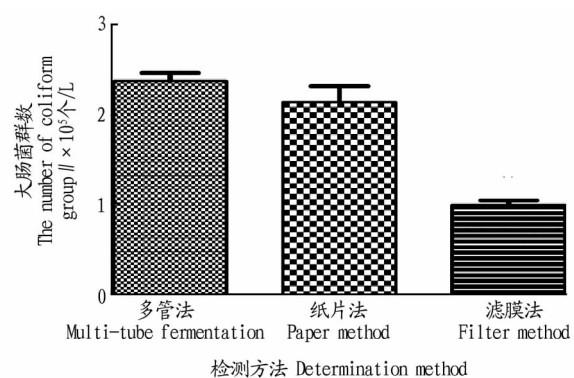


图 4 3 种方法检测 C 水样的结果

Fig.4 The determination result of C water sample by three methods

样量的不同,多管发酵法检测大肠菌群目前常用发酵管为 9、10、15 管。利用不同管数检测污染程度由低到高的 A、B、C 3 种水样,每种水样做 5 次重复。

由图 5 可知,利用 SPSS 软件分析 3 种管数检测 A 水样的结果,所得 P 值为 0.709, $P > 0.05$,故差异不显著,即检测

结果具有一致性。

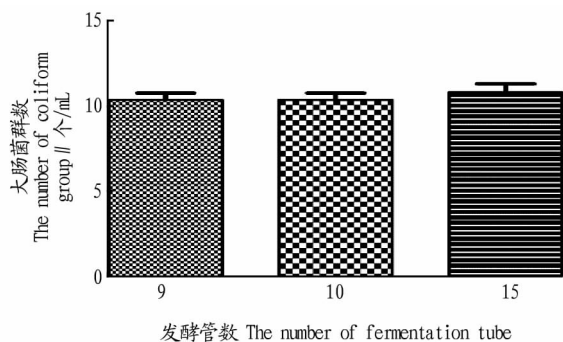


图5 A水样检测结果分析

Fig.5 Analysis on the determination result of A water sample

由图6可知,将3种管数发酵检测B水样所得数据经SPSS软件分析后, P 值为0.964, $P > 0.05$,差异不显著,说明检测结果具有一致性。

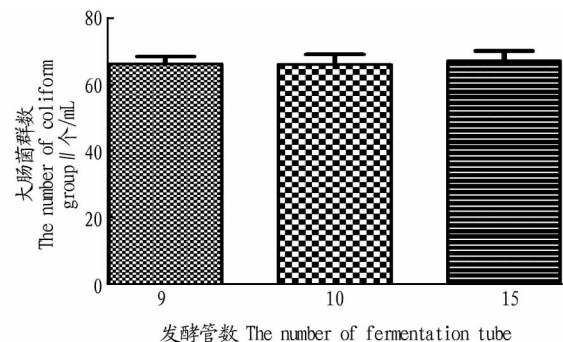


图6 B水样检测结果分析

Fig.6 Analysis on the determination result of B water sample

由图7可知,将3种管数检测C水样所获数据用SPSS软件分析后, P 值为0.840, $P > 0.05$,故差异不显著,检测结果具有一致性。

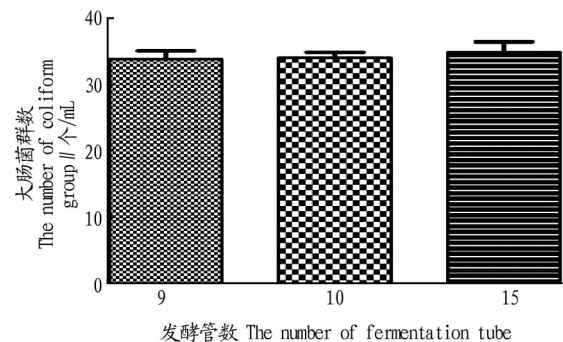


图7 C水样检测结果分析

Fig.7 Analysis on the determination result of C water sample

3 结论与讨论

为了比较不同方法检测大肠菌群所获结果的差异性,分别采取了3种污染程度差异较大的水样,利用目前应用较为

广泛的多管发酵法、纸片法、滤膜法去检测相同水样中大肠菌群的含量^[15]。试验发现,3种检测方法中多管发酵法较另2种方法测得的结果都偏高,滤膜法测得的结果都是最小的。在3种不同的水样检测结果的显著性分析中,纸片法与多管发酵法所得的结果都没有显著性差异,即这2种方法测得的结果具有一致性,但也存在一定的缺陷,这2种方法对颜色的判断主观性较高,因此具有一定的局限性;而滤膜法的检测结果与其他2种方法相比差异性较大,特别是对污染程度较高样品的检测,因此滤膜法不适宜检测污染程度较高且浑浊度较高的样品,因为抽滤可能会堵塞滤膜上的微孔,导致异物截留,致使结果有误差,应对污染程度高的水样进行适当的稀释,再进行检测。

多管发酵法具有操作简单、方便耐用、应用范围广的优点,且也是国标推荐的方法^[16]。但目前依据样品的性质和接种量的不同,可分为9、10、15管发酵法,且结果查阅的MPN表也不尽相同,但通过试验发现,9管发酵法、10管发酵法和15管发酵法检测3种水样的结果经方差分析后, P 值均大于0.05,即差异不显著,表明9管发酵法、10管发酵法和15管发酵法对同一水样的检测结果具有一致性。

参考文献

- [1] 孙超. 水体中大肠杆菌的检测分析新方法研究[D]. 上海: 东华大学, 2010.
- [2] 赵振宇. 食品中大肠杆菌检测探讨[J]. 食品安全导刊, 2015(36): 105.
- [3] 崔丽琳. 论多管发酵法检测生活饮用水中大肠菌群[J]. 中国卫生标准管理, 2015, 6(1): 4-5.
- [4] 张金平, 林曦, 吴桐, 等. 多管发酵法对不同水样中大肠菌群数的检测与分析[J]. 现代医药卫生, 2011, 27(1): 4-6.
- [5] 嵇志远, 翁天楚. 3种方法测定水中粪便污染指示菌比较研究[J]. 工业水处理, 2013, 33(10): 79-82.
- [6] 陈艳宏, 马健, 权玉玲. 2种试剂的酶底物法和多管发酵法检测水中总大肠菌群的比较研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2014(22): 3257-3258.
- [7] 蒋玲, 李雪. 酶底物法和多管发酵法检测水中的总大肠菌群的比较研究[J]. 中国卫生产业, 2016, 13(18): 120-121.
- [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] 史建. 粪大肠菌群检测方法研究进展[J]. 河北化工, 2012, 35(7): 32-35.
- [10] 刘杨, 杨鹏. 饮用水中总大肠菌群检测方法的研究进展[J]. 临床军医杂志, 2013, 41(12): 1302-1304.
- [11] 唐思偲, 王琴, 辛明秀. 水体中大肠菌群的含量检测水质污染程度[J]. 生物学通报, 2011, 46(8): 15-17.
- [12] 史长生. 食品中大肠菌群测定的分析研究[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(8): 235-237.
- [13] ISHII S, GAGNON R F, HARRIS A, et al. *Escherichia coli* in environment: Implications for water quality and human health[J]. Microbes Environ, 2008, 11(2): 101-108.
- [14] LECLERC H, EDBERG S, PIERZO V, et al. Bacteriophage as indicators of enteric viruses and public health risk in groundwaters[J]. Journal of applied microbiology, 2012, 88(9): 5-21.
- [15] 唐伟, 于波, 张国平, 等. 浑河(抚顺段)水质粪大肠菌群污染现状研究[J]. 环境科学与管理, 2013, 31(7): 76-78.
- [16] 冯广达, 邓名荣, 朱红惠, 等. 水体粪便污染的微生物溯源方法研究进展[J]. 应用生态学报, 2010, 12(11): 3273-3281.