

关于多管发酵法测定水中粪大肠菌群的探讨

宜兴市环境监测站 杜益敏

摘 要：粪大肠杆菌是人类和动物的肠道内最常见的一种细菌，会随着人类和动物的粪便排出体外。这些细菌可能会引起腹泻、呕吐、膀胱炎等，导致一些流行性疾病的发生。目前，我们用粪大肠菌群的数量来表征水体的受污染程度，也可以作为食品安全的主要指标之一。故粪大肠杆菌的检出对水质评价及制定相关对策具有极大意义，也具有广泛的卫生学和安全学意义。本文着重对多管发酵法测定水中粪大肠菌群这一方法进行了探讨，希望能够为相关行业的工作人员提供一些新思路。

关键词：多管发酵法；水中粪大肠菌群；测定；探讨

现如今，我们主要通过检测水中粪大肠菌群来检测环境质量和环境的污染程度。我们寻求一种简便可靠的测量方法。对于粪大肠菌群的测定，最经典的方法便是多管发酵法，本文正是对此种方法进行相应的探讨。

一、多管法测定水中粪大肠菌群的实验过程

(一) 实验的条件、设备和试剂

多管法测定水中粪大肠菌群的实验利用了粪大肠菌群可在高温生长并可以产酸产气的特点来进行测定，所以实验一定要在恒温、恒湿的条件下进行，并且为了避免对实验产生干扰，微生物室要提前用紫外灯进行至灭菌，使用后也要及时清洁灭菌。

本实验中常用一些仪器设备，分别有电热恒温培养箱DHG-9123A、全自动立式电热蒸汽消毒器YM-50、电子天平JA1103N、雷磁pH计pHJSJ-3F等。还有若干50mL试管、小玻璃倒管、接种环、移液枪、硅胶塞和灭菌牛皮纸等。

本次实验应用到的试剂主要有以下几种：单倍乳糖蛋白胨培养基：将蛋白胨、牛肉浸膏、乳糖和氯化钠按比例溶解在1000mL蒸馏水中并调节其pH值为7.2~7.4，溶解完毕后再将此溶液与1mL1.6%的溴甲酚紫乙醇溶液混合。三倍乳糖蛋白胨培养基：单倍乳糖蛋白胨培养基各组分的质量增加3倍。EC培养液：将一定量的胰液、乳糖、胆盐三号、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾和氯化钠按比例溶解于1000mL蒸馏水中，灭菌后pH值在6.9左右。

(二) 实验原理

将所有样品加入富含乳糖蛋白胨培养基的试管中，在37℃的条件下进行初发酵富集培养。粪大肠杆菌的培养过程中会产生酸产气，产生的酸可以在溴甲酚紫指示剂的作用下显示出紫色变为黄色的过程，从而将产生的气体倒入试管中，在44.5℃的情况下进行复发酵培养。最终产气的细菌可以确定为粪大肠菌群，对照MPN表测算出粪大肠菌群的浓度值。在进行实验之前首先进行灭菌，由于水的正常沸点不能杀灭所有微生物，所以培养皿灭菌主要采用加压煮沸法。

(三) 样品采集和保存

样品采集需要按照国家有关标准执行，在采集时，采样瓶不能洗涤，提前灭菌。若采样为清洁水体不低于400mL，若采样为其他水体则不低于100mL。在采样完毕后，需要包装无菌纸。采样时要注意水流速度的控制，将样品小心接入瓶中。同一采样点分层采样时，要自上而下依次按顺序进行。采样后2h内进行检测，否则10℃下冷藏不超过6小时，因外界因素不能立刻进行检测的样品，要放置于4℃以下的条件冷藏，2小时内完成检测。

(四) 实验步骤

1. 水样接种量的确定。将样品充分混合均匀后结合水样污染程度确定好接种量。有15管法和12管法，生活饮用水等清洁水体也可使用12管法。15管法应保证各样品至少使用3个不同接种量，如10mL、1mL、0.1mL或者1mL、0.1mL、0.01mL，以此类推，每个梯度5管。当接种量为10mL时，应用三倍乳糖蛋白胨培养基5mL，其他用单倍乳糖蛋白胨培养基10mL。

2. 初发酵和复发酵试验。试管接种水样后，在(37±0.5)℃温度条件下培养(24±2)h。在发酵24h后观察发酵试管，紫色变黄色为产酸，小导管里有气泡为产气，表明阳性。在初发酵试验中判定为阳性或疑似阳性的发酵管中，用接种环(火焰灼

烧冷却)转接到EC培养基，在30分钟内放进恒温培养箱，在(44.5±0.5)℃温度条件下培养(24±2)h，最后观察小导管里是否有气泡，从而判断阳性阴性。

二、多管发酵法测定水中粪大肠菌群的实验结果分析

(一) 培养液残留气泡实验

放入含培养基的试管100支，观察试管内气泡的数量多少。从实验数据我们可以得知，如果在105℃时取出试管，带气泡的试管数量几乎不变。如果在80℃或60℃时取出试管，60℃时带气泡试管的数量会小于80℃，但是两种温度下差别不大。如果在40℃时取出试管，带气泡试管的数量会远远小于60℃时的带气泡试管数量。如果在25℃时取出试管，则带气泡试管的数量与40℃时大体相等。

(二) 培养液保存实验

首先重复培养液残留气泡实验的灭菌步骤，待灭菌完毕后将试管取出并取下灭菌时使用的牛皮纸，在试管外层重新包裹新的无菌牛皮纸。每次实验放入100只试管，空硅胶塞和无孔硅胶塞的试管数量平分。分别在30d、60d、120d将所有装有单倍乳糖蛋白胨培养基的试管放入37℃的电热恒温培养箱中培养24h，24h后将试管取出观察情况。与之不同的是，装有EC培养基的试管要放在44.5℃的恒温水浴锅里培养24h，其余步骤均与单倍乳糖蛋白胨培养基相同。三倍乳糖蛋白胨培养基的保存实验步骤也与单倍乳糖蛋白胨培养基完全相同。结果发现：塞有孔乳胶塞的试管在60天以内的菌群数量符合国家标准。但如果再延长保存天数，样品中干扰菌群的数量就会不断提高。塞无孔硅胶塞的试管在120天以内的菌群数量几乎都符合国家标准。对本实验的精密度和准确度进行分析，所测得的不同浓度粪大肠菌群的样品和有证标准样品的可接受范围均符合相对标准偏差的范围准确度。相对误差最终值也在可接受范围内。所以通过对比我们可以得出塞无孔硅胶塞的试管的保存优于塞有孔乳胶塞的试管。

三、结束语

在进行粪大肠菌群检测时，对实验环境要求很高，影响因素繁多，必须从各个方面严控把关，注意每个环节的灭菌，包括高温高压、紫外灯、酒精等方式。当今社会，人们对微生物检测也十分重视，对实验全过程进行全面的质控，提高人员的专业能力，提升对粪大肠菌群测定的准确度，有助于更好地改善水体环境，确保食品安全，从而保障人民的健康与安全。

参考文献：

- [1] 国家环境环保总局《水和废水检测分析方法》编委会.水和废水检测分析方法[J].北京：中国环境科学出版社，2017，(11)，33-36.
- [2] 俞毓馨，吴国庆，孟宪庭.环境工程微生物检验手册[J].中国环境科学出版社，2016，(2)，101-105.