·监测技术·

酶底物法检测地表水粪便污染的适用性探讨

赵春霞[1], 厉以强[2], 梅卓华[1]
(1.南京市环境监测中心站,江苏 南京 210013; 2.江苏省环境监测中心,江苏 南京 210036)

摘要:为探讨酶底物法检测地表水粪便污染的适用性,采用酶底物法与多管发酵法同步检测了长江南京段、秦淮河、玄武湖等水中大肠菌群。结果显示:在多数情况下,酶底物法检测结果略低于多管发酵法,两种方法没有统计学差异($P>0.05$);与多管发酵法相比,酶底物法检测粪便污染特异性强、时间周期短、二次污染小、简便快速,适于推广应用。

关键词:酶底物法;粪大肠菌群;地表水
中图分类号:X835 **文献标识码**:B **文章编号**:1674-6732(2009)02-0025-03

Applicability of Enzyme Substrate Technique to Fecal Contamination Testing in Surface Water

ZHAO Chun-xia[1], LI Yi-qiang[2], MEI Zhuo-hua[1]
(1. Nanjing Environmental Monitoring Central Station, Nanjing, Jiangsu 210013, China; 2. Jiangsu Provincial Environmental Monitoring Center, Nanjing, Jiangsu 210036, China)

ABSTRACT: Test was conducted on the samples from Yangtze River, Qinghuai River and Xuanwu Lake using enzyme substrate and multiple-tube fermentation techniques in parallel to look into the applicability of enzyme substrate technique to fecal contamination in surface water. The results indicated that in most cases the coliform values from enzyme substrate technique were lower than that from multiple-tube fermentation technique. However, there was no statistical discrepancy between them($P>0.05$). Compared with multiple-tube fermentation technique, enzyme substrate technique characterized with a shorter testing period and lesser secondary pollution, has a better specificity and a wide application.

KEY WORDS: enzyme substrate technique; fecal coliforms; surface water

判断水体是否受到粪便污染,目前主要以粪大肠菌群、大肠埃希氏菌和总大肠菌群作为指标,采用的检测方法主要为多管发酵法、滤膜法、快速纸片法、酶底物法等[1-4]。多管发酵法已经采用多年,检测周期长、操作烦琐,难以适应当前环境监测工作需要。滤膜法不适用于浊度大的水样,而且对过滤体积的判断也直接影响最终结果。快速纸片法简单、快速,是一种不错的新方法,已经在许多实验室中应用,但是,开放式培养使其二次污染增加,给操作者带来一定的潜在危险[2,3]。

酶底物法是近年来出现的一种新型酶技术检测方法,具有快速、特异、无污染等优点,美国EPA已经将它列为饮用水生物安全指标总大肠菌群和大肠埃希氏菌的推荐方法,并于1998年将水体受粪便污染的评价指标改为粪大肠菌群与大肠埃希氏菌并行,鼓励逐步用大肠埃希氏菌指标代替粪大肠菌群指标[5]。我国卫生部在2006年也将酶底物法列入瓶装水、饮用水、水源水中总大肠菌群和大肠埃希氏菌检测方法[6]。但在环境监测领域,尚未见酶底物法的相关规定,笔者通过对比酶底物法与多管发酵法同步检测南京市长江南京段、秦淮河、玄武湖、花神湖等水体的结果,探讨用酶底物法代替多管发酵法检测地表水粪便污染的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

多管发酵法所用培养基购自杭州天和微生物试剂有限公司,酶底物法所用培养基等材料购自爱德士公司。

样品于2007年10月至2008年12月分别采

收稿日期:2009-05-26;**修订日期**:2009-07-14
基金项目:江苏省环境监测科研基金资助项目(0702)
作者简介:赵春霞(1970—),女,四川西充人,工程师,学士,从事环境微生物监测和研究工作。

集自长江南京段、秦淮河、玄武湖、花神湖等水体。

1.2　试验方法

1.2.1　多管发酵法

按《水和废水分析监测方法(第四版)》操作,每个样品接种 3 个稀释度,每个稀释度接种 5 管,共 15 管,置 37 ℃下培养 24 h,观察结果[3]。如所有乳糖蛋白胨培养管都不产气产酸,则为初发酵阴性。如有产酸产气者,则转种 EC 培养基,在 44.5 ℃ 下培养 24 h,有产酸产气者,证实有粪大肠菌群阳性。查粪大肠菌群 MPN 检索表,为每 100 mL 稀释水样的 MPN 值,换算每升水样的 MPN 值,以 MPN/L 表示最终结果。

1.2.2　酶底物法

按《生活饮用水标准检验方法》(GB 5749—2006)和文献[7]操作。根据水样含菌量多少及稀释倍数,采用 97 孔定量盘法,用无菌培养瓶量取稀释后水样 100 mL,加入培养基粉,混匀,然后将 100 mL 水样全部倒入 97 孔定量盘内,用程控定量封口机封口,在 44.5 ± 0.5 ℃下培养 24 h,若孔内水样变黄则为阳性,计数呈阳性反应的孔数,查酶底物法最可能数(MPN)表,该结果为 MPN/100 mL,最终结果以 MPN/L 表示。

1.3　数据统计分析

按《地表水环境质量标准》(GB 3838—2002)将所测样品分为 3 档:Ⅰ、Ⅱ类水为清洁水;Ⅲ类水为轻污染水;Ⅳ、Ⅴ类水为重污染水。用 Excel 软件进行数据统计处理,用 t 检验分别比较两种方法检测结果的显著性差异。

2　结果与分析

2.1　清洁水组

对 19 例Ⅰ、Ⅱ类水样进行了多管发酵法与酶底物法同步检测,结果(表 1)显示:酶底物法检测结果均值为 905 MPN/L,从统计学角度略低于多管发酵法,酶底物法检测结果低于多管发酵法的有 12 例,占 63%。用 Excel 对数据作成对双样本均值 t 检验,多管发酵法、酶底物法的平均值分别为 1 091.67 和 904.72,$t = 1.55$,$P > 0.05$,表明两种方法对清洁水样的粪大肠菌群检测,结果无显著性差异。

表 1　清洁水组粪大肠菌群检测结果　　MPN/L

样品编号	多管发酵法	酶底物法	样品编号	多管发酵法	酶底物法	样品编号	多管发酵法	酶底物法
1	1 100	850	8	1 300	1 396	15	700	591
2	500	1 410	9	1 700	1 450	16	1 300	478
3	1 100	850	10	1 300	1 119	17	1 300	478
4	700	750	11	1 300	1 374	18	400	429
5	1 300	980	12	1 300	1 145	19	2 200	820
6	1 100	410	13	500	560	均值	1 091.67	904.72
7	1 150	1 616	14	500	429			

2.2　轻污染水组

对 12 例Ⅲ类水进行了两种方法的同步分析,结果见表 2。结果显示:酶底物法检测结果均值为 3 799.33 MPN/L,从统计学角度低于多管发酵法,酶底物法检测结果低于多管发酵法的有 8 例,占 67%。用 Excel 对数据作成对双样本均值 t 检验,多管发酵法、酶底物法的平均值分别为 4 741.67 和 3 799.33,$t = 1.51$,$P > 0.05$,表明两种方法对轻污染水样的粪大肠菌群检测,结果无显著性差异。

表 2　轻污染水组粪大肠菌群的检测结果　　MPN/L

样品编号	多管发酵法	酶底物法	样品编号	多管发酵法	酶底物法	样品编号	多管发酵法	酶底物法
1	7 900	3 550	5	7 900	4 200	9	3 300	2 187
2	7 900	5 040	6	3 300	3 482	10	2 200	820
3	4 900	3 970	7	3 400	2 553	11	3 300	6 200
4	3 300	3 990	8	4 900	3 014	12	4 600	6 586
						均值	4 741.67	3 799.33

2.3　重污染水组

对 22 例Ⅳ、Ⅴ类水进行了两种方法的同步分析,结果见表 3。结果显示:酶底物法检测结果均值为 5.42×10^6 MPN/L,从统计学角度略低于多管发酵法;从样品数看,酶底物法检测结果低于多管发酵法的有 18 例,占 81.8%。用 Excel 对数据作成对双样本均值 t 检验,多管发酵法、酶底物法的平均值分别为 1.31×10^7 和 5.42×10^6,$t=1.06$,$P>0.05$,表明两种方法对污水样的粪大肠菌群检测,结果无显著性差异。

表 3　重污染水组粪大肠菌群的检测结果　　MPN/L

样本编号	多管发酵法	酶底物法	样本编号	多管发酵法	酶底物法	样本编号	多管发酵法	酶底物法
1	2.40×10^5	1.70×10^5	9	1.70×10^5	1.10×10^5	17	2.40×10^5	7.80×10^3
2	1.60×10^8	1.20×10^7	10	4.90×10^4	2.70×10^4	18	3.50×10^4	6.20×10^3
3	4.90×10^6	1.20×10^6	11	4.90×10^4	7.10×10^4	19	2.40×10^4	3.60×10^3
4	2.40×10^5	5.20×10^4	12	1.30×10^6	7.90×10^5	20	1.10×10^5	8.70×10^4
5	3.50×10^4	9.60×10^3	13	5.00×10^4	8.40×10^4	21	7.90×10^4	3.20×10^4
6	2.20×10^4	1.30×10^4	14	2.00×10^5	1.00×10^5	22	2.40×10^5	8.90×10^4
7	2.40×10^4	1.70×10^4	15	2.00×10^5	2.00×10^5	均值	1.31×10^7	5.42×10^6
8	5.40×10^7	7.70×10^7	16	5.40×10^7	2.20×10^7			

3　讨论

与现行国家环保部认可的多管发酵法相比,在检测地表水中的粪大肠菌群时,酶底物法检测结果多数情况下略低,但在统计学上无显著性差异($P>0.05$)。分析原因主要有:(1)从检测指标定义看,多管发酵法检测的是在 44.5 ℃下培养 24 h 能使 EC 培养基发酵产酸产气的革兰氏阴性菌,酶底物法检测的是在 44.5 ℃下培养 24 h 能产生 β－半乳糖苷酶分解色原底物使培养基呈现颜色变化的大肠杆菌。(2)从检测试验的机理看,酶底物法采用特异的酶技术,具有特异性,可以减少杂菌的干扰,因此假阴性、假阳性低;而多管发酵法难于排除 15% 的假阳性(自然界天然存在的非粪便来源的克雷伯氏菌)和 10% 的假阴性(10% 左右的不产气大肠埃希氏菌)[8]。(3)比较两种方法的最可能数(MPN)表,从试验结果中阳性管(孔)组合所表征的数据量看,多管发酵法仅有 56 组,而酶底物法 97 孔定量盘为 2 352 组,酶底物法比多管发酵法更准确。因此,从指示粪便污染的角度看,酶底物法检测结果能更真实地反映水体受污染的程度,可以替代现行的多管发酵法。同时,由于酶底物法具有操作简便、检测周期短、操作简便、二次污染小等优点,尤其是采用密封培养技术,在检测医院污水时可以减少人员接触而降低检测人员的致病风险,因此具有更强的实用价值和应用价值。

[参考文献]

[1] 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.

[2] 赵凌宇. 粪大肠菌群快速测定——纸片法的应用[J]. 环境监测管理与技术,2007,19(4):18－20.

[3] 韩桂春. 生活污水中粪大肠菌群快速监测方法——纸片法[J]. 中国卫生检验杂志, 2003,13(4):475－476.

[4] 高瑞坤,汤琳,傅强. 水中粪大肠菌群快速检测方法——固定底物酶底物法与多管发酵法的比较[J]. 中国环境监测,2008,24(4):39－41.

[5] U.S. EPA. Standard methods for the examination of water and wastewater 20th edition[S]. Washengton DC.

[6] 中华人民共和国卫生部. GB 5750.12—2006. 生活饮用水标准检验方法　微生物指标[S].

[7] GARY P Y, DAVID A C. Evaluation of colilert and enterolert defined substrate methodology for wastewater applications[J]. Water environment research,2002,74(2):131－135.

[8] U.S. EPA. Proposed approval of Colilert, Colilert－18, Colisure, Enterolert and Quanti－Tray for Ambient Water Testing[M]. Washengton DC:U.S. Federal Register,2001.