

·论 著·

乳糖多管发酵法与酶底物法检测水中大肠埃希菌结果比较

陈胜华,林新顺

乳源瑶族自治县疾病预防控制中心,广东 乳源 512700

摘要:目的 为检测饮用水中大肠埃希菌选用一种准确、快速、简便的检测方法。方法 按生活饮用水标准检验方法(GB/T5750-2006)中乳糖多管发酵法和酶底物法测定水中大肠埃希菌,比较两法的适用性、灵敏度、检测结果的差异。结果 乳糖多管发酵法和酶底物法均能检出大肠埃希菌,二法适用性无差异;乳糖多管发酵法灵敏度为10cfu/100mL,底物酶法灵敏度为1cfu/100mL,对40份水样进行检测,乳糖多管发酵法检测周期为72h,检出大肠埃希菌33份,检出率为82.5%(33/40);酶底物法检测周期为24h,检出大肠埃希菌36份,检出率为90.0%(36/40);二法检出率差异无统计学意义($\chi^2=0.9486$, $P=0.3301$)。二法均检出大肠埃希菌33份,检出符合率为91.67%(33/36),二法均未检出大肠埃希菌5份,未检出符合率为100%(4/4),二法检测效果差异无统计学意义(配对 $\chi^2=1.3333$, $P=0.2482$);二法检测结果,差异无统计学意义(配对 $t=0.5295$, $P=0.5994$)。结论 乳糖多管发酵法和酶底物法均可检测饮用水中大肠埃希菌,酶底物法灵敏度高于乳糖多管发酵法,检测时间比乳糖多管发酵法缩短48h。采用酶底物法检测水中大肠埃希菌,能更快捷、准确的报告检测结果。

关键词: 大肠埃希菌;乳糖多管发酵法;酶底物法;检测

中图分类号:R378.21 文献标识码:A 文章编号:1009-9727(2015)02-173-03

Comparison of results of lactose multiple tube fermentation method and enzyme substrate method in detection of *Escherichia coli*

CHEN Sheng-hua, LIN Xin-shun

Ruyuan Yao Ethnic Autonomous County Center for Disease Control and Prevention, Ruyuan 512700, Guangdong, P.R. China

Abstract: Objective To select an accurate, fast and convenient method for detection of *Escherichia coli* in drinking water. Methods *Escherichia coli* in drinking water was detected using lactose multiple tube fermentation method and enzyme substrate method introduced in the standard methods for inspection of drinking water (GB5750-2006), the applicability, sensitivity and the difference of the two methods were compared. Results *Escherichia coli* could be detected both by the lactose multiple tube fermentation method and the enzyme substrate method and without differences in terms of applicability. The sensitivity of lactose multiple tube fermentation method and substrate enzyme method were 10cfu/100mL and 1cfu/100mL. In detection of 40 water samples the positive rate of lactose multiple tube fermentation method 82.5%(30/40) for a duration of seventy-two hours, while the positive rate of enzyme substrate method was 90.0%(36/40) for a duration of twenty four hours, without significant difference ($\chi^2=0.9486$, $P=0.3301$). *Escherichia coli* was detected in thirty-three water samples with both methods with the coincidence rate of 91.67%(33/36). No *Escherichia coli* was detected in five samples with both methods with the negative coincidence rate of 100%(4/4), therefore, there is no significant difference in the effect and results of detection of *Escherichia coli* between two methods ($\chi^2=1.3333$, $P=0.2482$) and ($t=0.5295$, $P=0.5994$). Conclusion Lactose multiple tube fermentation method and the enzyme substrate method can both used for detection of *Escherichia coli* in the drinking water, but the sensitivity of enzyme substrate method is higher than the lactose multiple tube fermentation method as the duration of detection time of the latter 48 hours less than the former, thus it allows rapid detection and accurate reporting of the results.

Key words: *Escherichia coli*; Lactose multiple tube fermentation method(LMTFM); Enzyme substrate method(ESM); Detection

世界卫生组织报道,在发展中国家,有8%的疾病是因饮用不安全、不卫生的水所致,微生物污染是饮用水安全中最重要危险因素之一^[1]。我国生活饮用水卫生标准 GB5749-2006 中以菌落总数、总大肠菌群、耐热大肠菌群、大肠埃希菌4项作为水质卫生标准微生物指标^[2]。其中大肠埃希菌是评价水体是否被

人畜禽粪便污染的重要细菌学指标^[3]。大肠埃希菌,常称“大肠杆菌”,广泛存在于人和温血动物肠道中,是肠道疾病重要条件致病菌之一^[4]。乳源瑶族自治县为山区,禽畜放养,水源易受禽畜粪便等污染,2010~2014年共检出423份水样含大肠埃希菌,水质受该菌污染问题突出,严重影响居民饮水安全。我国生活饮

用水标准检验方法(GB/T5750-2006)检测大肠埃希菌标准检验方法是:1乳糖多管发酵法、2滤膜法、3酶底物法^[5]。目前疾控机构检测大肠埃希菌最常用的是乳糖多管发酵法^[1],该法检验过程需对样品进行系列倍数稀释,记录发酵乳糖产酸产气阳性管数,再进行两步确证试验,共需三步,需在(45±0.5)℃和(36±1)℃ 2种温度条件下进行,含初发酵需时72h。在实际工作中,由于荧光显色强弱判断等因素会造成一定比例的漏检,存在灵敏度较低、实验干扰因素较多等问题。酶底物法只需一步、一种培养基即可在24h内检出大肠埃希菌,操作简单快捷,结果判定直观、清晰。现按生活饮用水标准检验方法(GB/T5750-2006),采用乳糖多管发酵法和酶底物法对大肠埃希菌检测试验进行比较分析,结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 检测试剂 乳糖蛋白胨、EC-MUG培养基、MMO-MUG培养基,大肠埃希菌标准菌株,均为广东环凯微生物科技有限公司生产。按标准检验方法(GB/T5750-2006)及试剂说明书进行配制。

1.1.2 检测设备 培养箱(36±1)℃,水浴箱(45±0.5)℃、紫外灯功率6w,波长366nm。

1.2 方法

1.2.1 乳糖多管发酵法 将在(45±0.5)℃,经48h培养初发酵产酸或产气样品用灼烧灭菌接种环接种置EC-MUG培养基中、(36±1)℃培养24h,将培养后的EC-MUG管在暗处用波长366nm,功率为6w的紫外线灯照射,产生蓝色荧光即表示水样中存在大肠埃希菌。计算EC-MUG阳性管数,查对应的最可能数(MPN)检索表得出大肠埃希菌最大可能数,结果以MPN/100mL报告或报告未检出。

1.2.2 酶底物法 直接将水样原液接种置10支MMO-MUG培养基中,(36±1)℃培养24h,水样成黄色同时有蓝色荧光即表示大肠埃希氏菌阳性。结果计算及报告同乳糖多管发酵法。

1.2.3 适用性试验 在60支灭菌试管中(不同型菌株各10支,每种方法5支)准确加入适量对应的标准菌株混悬液。乳糖多管发酵法用无菌吸管加入灭菌乳糖蛋白胨和EC-MUG培养基中,置(36±1)℃培养24h;酶底物法加入MMO-MUG培养基中,置(36±1)℃培养24h,同时做空白试验。

1.2.4 灵敏度试验 取ETEC菌株混悬液制成0.5麦氏度混悬菌液,按梯度10⁻¹~10⁻⁹进行稀释,各用无菌吸管准确吸取1.00mL不同浓度菌种混悬液至两个培养皿中,做平行试验,(36±1)℃培养24h,计算出每毫

升混悬菌液中的菌量。分别采用乳糖多管发酵法和底物酶法进行检测。

1.2.5 样品检测 分别采用乳糖多管发酵法和酶底物法对40份水源水样品进行大肠埃希菌检测,按(GB/T5750.12.4-2006)标准检验方法进行。

1.3 统计学方法 采用χ²检验、配对t检验。

2 结果

2.1 适用性实验结果 结果表明,乳糖多管发酵法和酶底物法对不同型大肠埃希菌均能检出。见表1。

表1 乳糖多管发酵法与酶底物法适用性试验结果
Table 1 Applicable results of lactose multiple tube fermentation method and the enzyme substrate method

标准菌株 Standard strain	菌株编号 S.No.	乳糖多管发酵法 LMTFM	酶底物法 ESM
大肠埃希菌(O157:H7)	FSCC149015	+	+
侵袭性大肠埃希菌(EIEC)	FSCC149004	+	+
产毒性大肠埃希菌(ETEC)	FSCC149005	+	+
粘附性大肠埃希菌(EAEC)	FSCC149003	+	+
致病性大肠埃希菌(EPEC)	FSCC149002	+	+
出血性大肠埃希菌(EHEC)	FSCC149001	+	+
空白试验	/	-	-

注:“+”表示检出,“-”表示未检出。
Note:+ means positive; - means negative

2.2 灵敏度实验结果 结果表明,乳糖多管发酵法的灵敏度为10cfu/100mL,底物酶法灵敏度为1cfu/100mL。见表2。

表2 乳糖多管发酵法与酶底物法灵敏度试验结果
Table 2 comparison of Sensitivity of lactose multiple tube fermentation method and the enzyme substrate method

稀释度 Dilution	菌量 (Cfu/100mL) Concentration	乳糖多管发酵法 LMTFM		酶底物法 ESM	
		黄色	荧光	黄色	荧光
		Yellow	Fluorescent	Yellow	Fluorescent
原液 Solution	TNTC	+	+	+	+
10 ⁻¹	TNTC	+	+	+	+
10 ⁻²	TNTC	+	+	+	+
10 ⁻³	TNTC	+	+	+	+
10 ⁻⁴	TNTC	+	+	+	+
10 ⁻⁵	1300	+	+	+	+
10 ⁻⁶	130	+	+	+	+
10 ⁻⁷	10	+	+	+	+
10 ⁻⁸	1	-	-	+	+
10 ⁻⁹	0	-	-	-	-

注:“TNTC”表示无法计数 Note: TNTC means that it is uncountable

2.3 乳糖多管发酵法和酶底物活检测结果比较 乳

糖多管发酵法检测周期为72h,检出大肠埃希菌33份,检出率为82.5%(33/40);酶底物法检测周期为24h,检出大肠埃希菌36份,检出率为90.0%(36/40);二法检出率差异无统计学意义($\chi^2=0.9486$, $P=0.3301$)(见表3)。其中,二法均检出大肠埃希菌33份,检出符合率为91.67%(33/36),二法均未检出大肠埃希菌5份,未检出符合率为100%(4/4),二法检测效果差异无统计学意义(配对 $\chi^2=1.3333$, $P=0.2482$)(见表4);二法检测报告结果,其差异无统计学意义(配对 $t=0.5295$, $P=0.5994$)(见表5)。

表3 乳糖多管发酵法与酶底物法检测大肠埃希菌的情况
Table 3 Results of detection of E.coli by lactose multiple tube fermentation method and the enzyme substrate method

检测方法 Method	检测份数 No.tested	检出份数 positive	未检出份数 negative	检出率 rate(%)
乳糖多管发酵法 LMTFM	40	33	7	82.5%
酶底物法 ESM	40	36	4	90.0%

表5 乳糖多管发酵法和酶底物法检测大肠埃希氏菌报告结果(MPN/100mL)

Table 5 Reported detection results by lactose multiple tube fermentation method and the enzyme substrate method

水样编号 S.No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
发酵法 LMEFM	20	120	26	17	28	37	11	6	170	32	94	110	45	62	0	180	43	0	280	36
酶法 ESM	17	130	23	16	32	36	10	7	220	26	70	79	33	69	2	210	31	0	220	30
水样编号 S.No.	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
发酵法 LMEFM	44	62	0	48	7	12	25	0	29	41	0	26	31	48	0	44	46	17	31	0
酶法 ESM	50	69	0	56	5	14	20	5	5	32	37	0	22	33	2	0	38	43	21	27

法,乳糖多管发酵法检测大肠埃希菌需在45℃±0.5℃和36℃±1℃ 2种温度条件下进行培养,然后进行两步确证试验,完成整个检测过程需时72h。酶底物法则是利用大肠埃希菌能产生 β -葡萄糖醛酸酶(β -glucuronidase)分解 MUG(4-methyl-umbelliferyl- β -glucuronide)使培养基在366nm紫外光下产生荧光的原理,来判定水样中是否存在大肠埃希菌,酶底物法只需一步即可在24h内完成整个检测。

实验结果表明,采用乳糖多管发酵法和酶底物法检测饮用水大肠埃希菌,二法适用性无差异,其检测报告结果在统计学上差异亦无显著性,但酶底物法操作更为简单,灵敏度更高,需时更短。随着酶底物技术的发展,使用酶底物法检测饮用水大肠埃希菌是值得推广和使用的,更适用于应急突发事件中和大批量水样品的大肠埃希菌检测,能更快捷、更准确的报告

表4 乳糖多管发酵法与酶底物法检测大肠埃希菌的结果比较

Table 4 Results of detection of E-coli by lactose multiple tube fermentation method and the enzyme substrate method

乳糖多管发酵法 LETFM	酶底物法 ESM		合计 Total
	检出份数 No.positive	未检出份数 No.negative	
检出份数 No. Positive	33	0	33
未检出份数 No.negative	3	4	7
合计 Total	36	4	40

配对 $\chi^2=0.5000$, $P=0.4795$

3 讨论

耐热大肠菌群主要由埃希菌属、柠檬酸菌属、克雷伯菌属和肠杆菌属等4种菌属组成,但主要组成是埃希菌属,在4种菌属中只有埃希氏菌属与人类生活活动密切相关。耐热大肠菌群作为粪便污染的指示菌,大肠埃希菌检出的意义最大,其次是耐热大肠菌群^[6]。

现行生活饮用水标准检验方法(GB5750-2006)方法中,对大肠埃希菌检测主要采用乳糖多管发酵

检测结果。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 中华人民共和国卫生部.GB5749-2006 生活饮用水卫生标准[S].2006.
- [3] 阮国洪.水环境微生物的分析进展[J].中国人畜共患病杂志,2003 19(5):119-121.
- [4] 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,2009,20(3):185-186,216.
- [5] 中华人民共和国卫生部.GB/T5750.12-2006 生活饮用水标准检验方法.微生物指标[S].2006.
- [6] 王秀茹.预防医学微生物学及检验技术[M].北京,人民卫生出版社,2002,676-679.

收稿日期:2014-07-26 编辑:崔宜庆