

# 粪大肠菌群酶底物法在环境监测中的应用研究

汤琳

(上海市环境监测中心, 上海 200030)

**摘要:**粪大肠菌群作为水体粪便污染的指示菌,对地表水的水质监测评价具有重要作用。采取较为精确、快速的粪大肠菌群检测方法,对控制流行疾病的发生和传播有重要的科学意义。从粪大肠菌群的检测意义、监测方法、标准化应用情况等方面进行归纳分析,提出推广和标准化酶底物法监测粪大肠菌群的迫切性。

**关键词:**粪大肠菌群;酶底物法;标准

中图分类号:X835

文献标识码:B

文章编号:1674-6732(2014)03-0032-04

## The Necessity of Enzyme Substrate Technique to Fecal Coliform in Environmental Monitoring

TANG Lin

(Shanghai Environmental Monitoring Center, Shanghai, 200030, China)

**Abstract:** Fecal coliforms, used as indicator bacteria of water fecal pollution, play an important role in the assessment of surface water quality monitoring. Taking an accurate, fast detection method of fecal coliform has an important scientific significance for the occurrence and spread of epidemic disease control. From the meaning of fecal coliform monitoring, monitoring method, standard application and other aspects, this article put forward the necessity of popularizing and standardizing the enzyme substrate technique to monitor fecal coliforms.

**Key words:** Fecal coliform; Enzyme Substrate Technique; Standard

粪大肠菌群,一群能在  $44.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$  温度下生长,发酵乳糖、产酸产气、需氧和兼性厌氧的革兰氏阴性无芽孢杆菌,国外又称耐热大肠菌群。主要来源于人畜粪便,可导致肠道传染病传播,如伤寒、霍乱、细菌性痢疾、脊髓灰质炎和传染性肝炎等,是水质污染的重要监测指标之一<sup>[1-2]</sup>。因此,不断优化粪大肠杆菌的检测方法具有广泛的卫生学意义。酶底物法作为一种新兴的粪大肠菌群检测方法,具有准确、快速、可靠的检测特点,能及时反映监测水域粪便污染状况,有效预报和控制流行疾病的发生与传播具有重要意义。

### 1 研究背景

水体微生物污染状况日趋严重,作为水体污染重要组成内容,微生物污染集中体现在粪便污染,粪便是病原微生物、病毒、原生动物和蠕虫的主要来源,可导致人类肠道传染病传播(WHO的饮用水水质准则)。1992年,生活饮用水卫生标准修订会议上首次提出将粪大肠菌群作为粪便污染的重

要卫生学指标,与菌落总数、总大肠菌群和大肠埃希氏菌共同作为粪便污染的微生物监测指标。

然而,实际工作中,尤其是在应急监测中,监测部门无法对水体中各种致病微生物进行检测。故绝大多数时候,通过粪大肠菌群的检测来评价水体污染情况,从而反映对人体健康的危害大小。正是粪大肠菌群在监测中的代表性,使其在国内各类标准中应用广泛。不同标准的应用情况和限值具体见表1。

由表可见,从检测意义上来说,推广快速、简便的粪大肠菌群酶底物检测法对不同行业的水质监测具有重要意义。

收稿日期:2013-08-04

基金项目:国家环保部科技标准《水质 粪大肠菌群的测定 酶底物法》(2011-10)。

作者简介:汤琳(1975—),女,高级工程师,硕士,从事生态监测与评价工作。

## 2 酶底物法解析

表1 各类质量标准中规定的粪大肠菌群限值

质量标准	粪大肠菌群限值
《地表水环境质量标准》(GB 3838-2002)	I类: ≤200 个/L; II类: ≤2 000 个/L; III类: ≤10 000 个/L; IV类: ≤20 000 个/L; V类: ≤40 000 个/L;
《畜禽养殖业污染物排放标准》(GB 18596)	最高日均排放浓度: 1 000 MPN/100 mL
《海水水质标准》(GB 3097-1997)	I类~III类: ≤2 000 MPN/L
《农业灌溉水质标准》	≤10 000 个/L
《生活饮用水标准》(GB 5749-2006)	不得检出/100 mL 传染病、结核病医疗机构水排放限值: 100 MPN/L
《医疗机构水污染物排放标准》(GB 18466)	综合医疗机构和其他医疗机构水排放限值: 500 MPN/L; 预处理标准: 5 000 MPN/L 医疗机构污泥控制标准: 传染病、结核病、综合医疗机构和其他医疗机构: ≤100 MPN/g
《高致病性病原微生物实验室污染物排放标准》(意见稿)	100 MPN/L
《城镇污水排放标准》(GB 18918)	一级标准: 1 000 MPN/L 或 10 000 MPN/L; 二级标准: 10 000 MPN/L
《生物制药行业污染物排放标准》(DB 31/373)	直接排放: 100 MPN/L 或 500 MPN/L; 间接排放: 500 MPN/L

## 2.1 酶底物法介绍

酶底物法<sup>[7]</sup>, 利用粪大肠菌群在 44.5℃ 生长过程中产生的 β-半乳糖苷酶和 β-葡萄糖醛酸酶, 分解培养液中的邻硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷(ONPG)和 β-葡萄糖醛酸, 使培养液呈现黄色和荧光反应(阳性)这一原理进行检测, 最后根据阳性的组合, 查 MPN 表得出数量。

实际操作中, 首先需要根据水样的污染程度对待测水样作适当稀释, 然后用无菌瓶取混匀水样 100 mL, 加入 Colilert(科立得)试剂 1 份, 溶解混匀, 倒入 97 孔定量盘, 封口, 于 44.5 ± 0.2℃ 培养箱中培养 24 h, 最后根据阳性孔数, 查 MPN 表并计算。

酶底物法在美国最早得到推广和应用, 用酶底物法检测粪大肠菌群、总大肠菌群和大肠埃希氏菌已获得美国 EPA 认证, 在美国、欧洲、日本等地得到广泛的应用。在中国, 2006 年颁布的《生活饮用水国家卫生标准》(GB/T 5750.12-2006) 中将酶底物法列为总大肠菌群的国标方法, 但尚未作为粪大肠菌群监测的标准方法。

## 2.2 酶底物法与其他方法比较

国内检测粪大肠菌群一直沿用国外早期的实验方法, 以 MPN 法和滤膜法传统方法为主<sup>[4]</sup>。随着生物监测技术发展, 纸片法、固定酶底物法、分子生物学鉴定法等方法相继出现并得到了一定范围的应用。各检测方法比较见表 2。

表2 粪大肠菌群各检测方法比较

检测方法	操作步骤	场所和人员要求	确认实验	检测时间	准确度	检测费用	推广度
发酵法	繁琐	专业场所和人员	需要	48~72 h	较准确	较便宜	易
滤膜法	繁琐	专业场所和人员	需要	48~72 h	较准确	较便宜	易
酶底物法	简易	要求不高	不需要	24 h	准确	较贵	易
纸片法	简易	要求不高	需要	16~18 h	较准确	较便宜	易
聚合酶链式技术	繁琐	专业场所和人员	不需要	6~8 h	准确	昂贵	不易
荧光原位杂交技术	繁琐	专业场所和人员	不需要	6~8 h	准确	昂贵	不易

从实验操作上, 酶底物法取样加药后封口培养, 过程简单, 较少受人为污染, 虽然纸片法操作也较简便, 但操作过程易受污染, 且需要确证试验; 从结果反映上, 酶底物法 97 孔定量盘的最大可能数表却有 2 352 组, 比其他方法的最大可能数表(多

管发酵法 56 组) 查表时更为准确。此外, 酶底物法应用酶技术进行粪大肠菌群检测, 出现假阴性、假阳性现象较少; 综上所述, 酶底物法相对于其他检测方法更为准确。

### 3 酶底物法的应用和研究状况

#### 3.1 酶底物法的应用

粪大肠菌群作为卫生学指标,在不同行业都有

监控要求,酶底物法作为粪大肠菌群的新兴检测方法,在标准中的应用见表3。

表3 检测粪大肠菌群的标准方法调研

标准名/标准号	引用方法
美国《水和废水标准监测分析方法》(21th 9221E)	多管发酵法
《水质 大肠菌群、耐热性大肠菌群和假定埃希氏大肠杆菌的检测和计数》(ISO 9308 - 2 - 1990)	多管发酵法、滤膜法
《食品中的大肠菌群和大肠杆菌的检测》(AOAC 991.14(1994))	petrifilm 测试片法、发酵法
《大肠菌群、粪大肠菌群和大肠杆菌检验方法》(FDA/BAM Chapter 4 (2002))	多管发酵法
EPA 认可 粪大肠菌群测定 (Colilert - 18)	酶底物
《污泥中粪大肠菌群测定》(EPA1680 821/R - 98 - 003)	多管发酵法
《水中粪性大肠杆菌菌群检测方法 - 滤膜法》(NIEA E214.00C)(台湾)	滤膜法
《生活饮用水标准检验方法》(GB/T 5750.12 - 2006)	多管发酵法、滤膜法
《水质 粪大肠菌群的测定 多管发酵法和滤膜法》(HJ/T 347 - 2007)	多管发酵法、滤膜法
《出口食品中大肠菌群、粪大肠菌群和大肠杆菌检验方法》(SN 0169 - 92)	多管发酵法
《食品卫生微生物学检验 粪大肠菌群计数》(GB/T 4789.39 - 2008)	多管发酵法
《化妆品微生物标准检验方法 - 粪大肠菌群》(GB 7918.3 - 1987)	发酵法(定性)

由表3可见,目前国内标准对粪大肠菌群的检测以多管发酵法为主,没有酶底物法的规定应用。由此可见,不断强化酶底物法检测粪大肠菌群的检测,推广酶底物法的应用,可以填补国家在粪大肠菌群快速检测方法标准上的空白,也为满足当前和今后一定时期内国家环境保护工作的需要做好铺垫。

#### 3.2 酶底物法的研究现状

酶底物法在美国最早得到推广和应用,用酶底物法检测粪大肠菌群已获得美国 EPA 认证,在美国、欧洲、日本等地得到广泛的应用。虽然该法并未成为中国检测粪大肠菌群的标准方法,但并未阻止许多学者对其的研究。高瑞坤等<sup>[14]</sup>比较了固定底物酶底物法与多管发酵法来检测水中粪大肠菌群,结果表明,两种方法用于水中粪大肠菌群检测结果具有一致性;崔松阳等<sup>[15]</sup>结合3家单位数据对比,说明了 DST - 酶底物法和多管发酵法检测粪大肠菌群的一致性;遇晓杰等<sup>[4]</sup>认为固定底物酶底物法与传统多管发酵法没有区别;段玉林等<sup>[16]</sup>用酶底物法对地表水水样进行不同倍数的稀释后进行培养检测,结果发现准确掌握水样稀释倍数对测定结果就越准确。此外,在四川5.12抗震救灾<sup>[8]</sup>中,酶底物法被用来检测生活饮用水中的耐热大肠菌群,成功保障了广大灾区人民群众生活饮用水的供水安全,在应急监测中发挥了重要的作用。

所有以上相关研究表明,酶底物法可以作为评价水质微生物污染的快速标准检测方法。

#### 3.3 酶底物法应用前景

酶底物法操作简便,结果快速准确,在环境监测中具有广泛的应用前景,主要表现为以下几点:(1)粪大肠菌群作为环境卫生学指标,具有实际监测意义,故酶底物法作为粪大肠菌群的快速检测方法,满足应用需求;(2)传统粪大肠菌群监测方法操作繁琐,需要48~72h才能获取结果,需要专业人员和专业检测条件,水样保存时间苛刻,在中西部地区执行率不高,分子技术仪器要求高,且需要专业人员操作,明显不适用环境污染事故监测的要求;(3)酶底物法测定水样中的粪大肠菌群具有快速、简便、准确的特点,无需清洗玻璃器皿,无需无菌室,无需配置培养基,24h内定量检测,极大地减少了工作量,同时可以避免使用多管法时逐级稀释带来的操作误差,也避免了使用滤膜法时肉眼读数的人为误差,能够较为准确地判断水样的污染状况;(4)现有粪大肠菌群监测标准中未有酶底物法的规定,而酶底物法已经被世界各国及地方实验室和世界卫生组织认可<sup>[17]</sup>,中国急需将检测标准与国际接轨,探索和完善适用本国环境监测的粪大肠菌群酶底物法。

### 4 总结

酶底物法根据粪大肠菌群的特异性酶,与特异性底物反应,通过颜色变化和荧光作为检测结果的判断依据,操作简便,结果直观、清晰、可靠,客观性强,缺点是使用的培养基只有国外生产商供应,检测成本较高。相信今后在科学研究上的不断强化,

使酶底物法的培养基逐渐实现国产化,从而降低使用成本,使其具有更广阔的应用范围和前景,作为评价水质微生物污染的快速标准检测方法在日常监测和应急监测中发挥重要作用。

#### [参考文献]

- [1] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 4版. 北京:中国环境科学出版社,2002:701-706.
- [2] 国家质量技术监督局. 海水水质标准[S]. 北京:中国标准出版社,1998:15-16.
- [4] 遇晓杰,谢平会,焦艳玲,等. 固定底物酶底物法与多管发酵法检测水中耐热大肠菌群的比较研究[J]. 卫生监督与检验,2012,28(2):251-252.
- [5] 张济龙,何吉明,何敏. 水中粪大肠菌群检测方法及其研究进展[J]. 青海环境,2012,23(2):89-92.
- [6] 胥学鹏. 水中粪大肠菌群测定的滤膜法研究[J]. 环境检测,2012:53-55.
- [7] 张少锋,刘国强. 粪大肠菌群检测方法及其研究进展[J]. 海洋通报,2008,27(3):102-106.
- [8] 蔡炯,周蕾,梁娜,等. 酶底物法快检技术在四川5·12地震灾区生活饮用水监测中的应用[J]. 中国卫生检验杂志,2009,19(6):1327-1328.
- [9] 董雪,任羽光,韩桂春,等. 纸片快速法监测地表水中粪大肠

菌群的探讨[J]. 环境与健康杂志,2003,2(20):119-120.

- [10] 赵凌云. 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.
- [11] POULSEN L K, LAN F, KRISTENSEN C S, et al. Spatial distribution of *Escherichia coli* in the mouse large intestine inferred from rRNA in situ hybridization [J]. *Infect Immun*,1994,62:5191-5194.
- [12] REGNAULT B, MARTIN D S, LEJAY C M, et al. Oligonucleotide probe for the visualization of *Escherichia coli*/*Escherichia fergusonii* cells by in situ hybridization: specificity and potential application [J]. *Res Microbiol*,2000,151:521-533.
- [13] PRESCOTT A M, FRICKER C R. Use of PNA oligonucleotides for the in situ detection of *Escherichia coli* in water [J]. *Mol Cell Probes*,1999,13:261-268.
- [14] 高瑞坤,汤琳. 水中粪大肠菌群快速检测方法-固定底物酶底物法的比较[J]. 中国环境监测,2008,6(4):39-41.
- [15] 崔松阳,饶欠平,蓝先标. 固定底物酶底物法检测粪大肠菌群在生活污水中的应用推广[J]. 环境,2009:60-61.
- [16] 段玉林,张少梅,温韬,等. 酶底物法快速测定地表水中粪大肠菌群的研究[J]. 环境研究与监测,2011,12(4):37-38.
- [17] 高瑞坤. 美国环保署的大肠菌群检测技术[J]. 福建分析测试,2006,15(2):36-37.

(栏目编辑 周立平)

(上接第31页)

(1)从单次事件的噪声与振动同步测量结果发现,无论室内结构噪声还是结构振动,其极大峰值均出现在50~80 Hz区间。如果采用1/10CT,即倍频程数据统计,则峰值均在63 Hz中心频率覆盖频带范围内。

(2)数据结果或噪声图像还可以发现,结构噪声能量分布绝大部分为500 Hz以下低频部分。

通过数据分析,作者提出了针对地铁所产生结构噪声的合理测量方法。即,采用1/3倍频程或1/1倍频程的时间历程测量、记录整个时段的全过程。再通过频率分析,选取特征频率(选择结果为63 Hz),结合声暴露级的事件截取方式,对列车通过所造成的结构传声事件进行截取,将截取事件的时间内低频部分(500 Hz以下)噪声各频率平均。

对于上述方法测量结果的评价还需要做进一步研究,但就结构传声而言,则采用低频倍频程各中心频率单独评价已在相关标准中得到体现。究竟如何评价能够更加准确地反映人体实际感受性还未能定论,并且在使用该方法对地下轨道交通结

构噪声进行监测时,测量时段、仪器要求具体实施细节要求与控制措施还有待进一步验证和研究。单论方法,使用该数据采集时的测量方法,对地下轨道交通结构传声排放更加具有针对性,也更能反映在建筑物室内的实际排放情况。此外,采用声暴露级方法本身对环境本底噪声做出了修正,从而避免了使用现行标准中监测方法测量时其他环境的影响,从测量结果评价上将较A声级更为有益。

#### [参考文献]

- [1] 尹志刚,丁浩民,申跃奎. 地铁引起的建筑物结构振动及噪声分析[J]. 噪声与振动控制,2008(5):147-150.
- [2] JGJ/T170-2009 城市轨道交通引起建筑物振动与二次辐射噪声限值及测量方法标准[S].
- [3] GB12348-2008 工业企业厂界环境噪声排放标准[S].
- [4] GB22337-2008 社会生活环境噪声排放标准[S].
- [5] HJ453-2008 环境影响评价技术导则 城市轨道交通[S].
- [6] GLADWELL G M L, ZIMMERMANN G. On Energy and Complementary Energy Formulation of Acoustic and Structural Vibration Problem[J]. *Journal of Sound and Vibration*, 1996,22(3):233-241.