

张泽清, 弓跃华. 休哈特控制图在总大肠菌群检测中的应用[J]. 净水技术, 2022, 41(5):155-159.

ZHANG Z Q, GONG Y H. Application of Shewhart control chart in total coliforms detection[J]. Water Purification Technology, 2022, 41(5):155-159.



扫我试试?

休哈特控制图在总大肠菌群检测中的应用

张泽清, 弓跃华

(国家城市供水水质监测网太原监测站, 山西太原 030008)

摘要 针对滤膜法和酶底物法检测总大肠菌群的过程, 休哈特控制图可以用来监测其是否受控。判定受控后, 选取太原市 60 个二次供水实际样品, 分别采用滤膜法和酶底物法对其中的总大肠菌群进行测定。结果显示, 两种检测方法均测得 2 个阳性样品, 总大肠菌群阳性率为 3.3%。对阳性结果中的大肠菌群进行了初步鉴定, 分别为肠杆菌科克雷伯菌属的新加坡克雷伯氏菌 (*Klebsiella singaporensis*) 和勒克菌属的非脱羧勒克菌 (*Leclercia adecarboxylata*), 无假阳性。

关键词 休哈特控制图 总大肠菌群 二次供水 滤膜法 酶底物法 菌种鉴定

中图分类号: R123.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-0177(2022)05-0155-05

DOI: 10.15890/j.cnki.jsjs.2022.05.024

Application of Shewhart Control Chart in Total Coliforms Detection

ZHANG Zeqing, GONG Yuehua

(Taiyuan Monitoring Station of National Urban Water Quality Monitoring Network, Taiyuan 030008, China)

Abstract Shewhart control chart could be used to monitor the control of total coliforms by membrane filter technique and enzyme substrate technique. After controlled, 60 samples of secondary water supply in Taiyuan were selected to be determined total coliforms by membrane filter technique and enzyme substrate technique respectively. Results showed that two positive samples were detected by both methods, and the positive rate of total coliforms was 3.3%. The positive results were identified as Enterobacteriaceae *Klebsiella singaporensis* and Enterobacteriaceae *Leclercia adecarboxylata*, false positives were not found.

Keywords Shewhart control chart total coliforms secondary water supply system membrane filter technique enzyme substrate technique strain identification

休哈特控制图由美国休哈特(W. A. Shewhart)博士在 20 世纪 20 年代首先提出^[1], 可用于发现实验室在完成指定测试项目时是否存在异常波动, 从而判断检测过程是否处于受控状态, 是实验室常用的内部质量控制手段^[2], 被国内外广泛应用到制药^[3-4]、医疗^[5-6]、食品^[7]以及测绘^[8]等方面。然而休哈特控制图在我国实验室水中微生物检测方面的应用报道还比较鲜见。

二次供水作为我国城市供水的重要组成部分,

由于可能存在水在水箱中长时间滞留等问题, 时常发生微生物数量超标等水质被二次污染的情况^[9]。在我国水质监测的几种常见指示微生物中, 总大肠菌群可用于评价输配水系统的清洁度、完整性以及生物膜是否存在^[10], 是用来判断二次供水是否符合国家标准的重要指标。

本次试验采用美国 NSI 公司的单一菌定量质控产品作为标准物质, 对滤膜法和酶底物法^[11]检测总大肠菌群的过程进行了监测, 将获取的数据绘制成休哈特控制图, 通过控制图判定检测过程是否受控。后选取太原市 60 个二次供水实际样品, 使用受控的检测体系, 进行滤膜法和酶底物法的比对, 并对阳性结果进行菌种鉴定。本试验为了解太原市供水体系中

[收稿日期] 2021-07-06

[作者简介] 张泽清(1988—), 女, 硕士, 工程师, 主要从事水质检验中和微生物相关的检验工作, E-mail: 513740867@qq.com。

二次供水总大肠菌群的基础信息提供了一定的依据。

1 试验材料与方法

1.1 主要试验材料及设备

质控产品:采用美国 NSI 公司单一定量的总大肠菌群[菌株:NCTC 9001, ATCC: 11775, 平均值: 1 429 MPN/(100 mL) (标准差 SD=241) 或 1 487 CFU/(100 mL) (标准差 SD=274), 可接受值:292~7 088 MPN/(100 mL) 或 506~3 613 CFU/(100 mL)。

培养基:广东环凯品红亚硫酸钠培养基、广东环凯乳糖蛋白胨培养液、美国爱德士 (IDEXX) 科立得。

生化培养箱:德国 Memmert 有限公司, IF260plus。

程控定量封口机:美国 IDEXX 生物科技有限公司, Quanti-Tray™ Sealar PLUS。

温控系统:上海安净生物技术有限公司微生物实验监控系统。

1.2 试验方法

1.2.1 休哈特控制图的绘制^[12]

(1) 滤膜法检测总大肠菌群休哈特控制图的绘制

按照《生活饮用水标准检测方法 微生物指标》(GB/T 5750.12—2006), 使用滤膜法检测美国 NSI 公司单一菌定量质控产品中的总大肠菌群。

取质控产品的真值[1 487 CFU/(100 mL)]为中位线, 计算其警告限值上限为 $1\ 487 + 274 \times 2 = 2\ 035$ CFU/(100 mL), 警告限值下限为 $1\ 487 - 274 \times 2 = 939$ CFU/(100 mL), 行动限值上限为 $1\ 487 + 274 \times 3 = 2\ 309$ CFU/(100 mL), 行动限值下限为 $1\ 487 - 274 \times 3 = 665$ CFU/(100 mL)。将持续 12 周使用滤膜法检测的总大肠菌群数据连成响应曲线, 绘制成休哈特控制图。

(2) 酶底物法检测总大肠菌群休哈特控制图的绘制

按照《生活饮用水标准检测方法 微生物指标》(GB/T 5750.12—2006), 使用酶底物法检测美国 NSI 公司单一菌定量质控产品中的总大肠菌群。

取质控产品的真值[1 429 MPN/(100 mL)]为中位线, 计算其警告限值上限为 $1\ 429 + 241 \times 2 = 1\ 911$ MPN/(100 mL), 警告限值下限为 $1\ 429 - 241 \times 2 = 947$ MPN/(100 mL), 行动限值上限为 $1\ 429 + 241 \times$

$3 = 2\ 152$ MPN/(100 mL), 行动限值下限为 $1\ 429 - 241 \times 3 = 706$ MPN/(100 mL)。将持续 12 周使用酶底物法检测的总大肠菌群数据连成响应曲线, 绘制成休哈特控制图。

1.2.2 休哈特控制图异常情况判定^[12]

通过观察休哈特控制图的测量点, 若存在如下一项或多项异常, 应进行记录调查和相应的补救措施。

(1) 一项计数超出行动限值。

(2) 同一侧或不同侧的 3 个连续计数中有两个超过警告限值。

(3) 9 个连续的计数落在平均值的同一侧。

(4) 6 个连续计数显示持续上升或下降的趋势。

1.2.3 二次供水中总大肠菌群的测定

分别采用滤膜法和酶底物法, 对太原市送检的 60 个二次供水实际样品中的总大肠菌群进行检测。每周抽检 5 个, 持续 12 周。

1.2.4 数据分析

将数据录入 SPSS Statistics 软件进行统计处理, 进行配对样本 *t* 检验。

1.2.5 菌种鉴定

若二次供水实际样品中检出总大肠菌群, 则将长有菌落的平皿和带有黄色孔穴的 51 孔定量盘均提交至爱德士生物制品贸易(上海)有限公司, 进行基因的提取和 PCR 扩增纯化。然后提交至苏州金唯智生物科技有限公司进行测序, 测序结果在 NCBI 中进行核酸序列 BLAST, 在序列数据库中进行序列比对分析。

2 结果与讨论

2.1 滤膜法检测总大肠菌群休哈特控制图

采用滤膜法对美国 NSI 公司的单一菌定量质控产品进行检测, 根据检测的结果绘制休哈特控制图(本次试验的准确度为-2.6%, 精密度为 7.8%), 如图 1 所示。根据休哈特控制图的异常情况判定标准, 持续 12 周的检测数据无任何一项计数超出行动限值。仅第 5 周总大肠菌群质控产品的测量值为 920 CFU/(100 mL), 超出警告限值下限, 未发生同一侧或不同侧的 3 个连续计数中有两个超过警告限值, 也未发生 9 个连续的计数落在平均值的同一侧, 以及 6 个连续计数显示有持续上升或下降趋势的异常波动。因此, 判定检测过程受控。

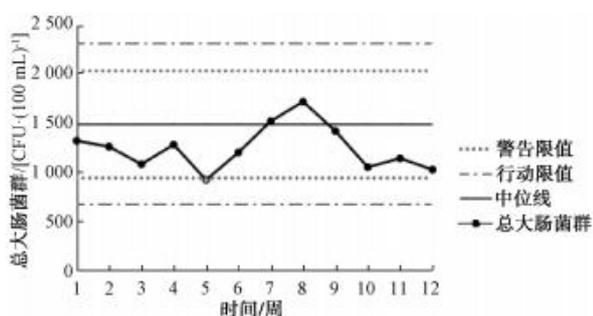


图1 滤膜法检测总大肠菌群休哈特控制图

Fig. 1 Shewhart Control Chart of Total Coliforms by Membrane Filter Technique

2.2 酶底物法检测总大肠菌群休哈特控制图

采用酶底物法对美国 NSI 公司的单一菌定量质控产品进行检测,根据检测的结果绘制休哈特控制图(本次试验的准确度为-0.4%,精密度为 6.7%),如图 2 所示。根据休哈特控制图的异常情况判定标准,持续 12 周的检测数据无任何一项计数超出行动限值。仅第 5 周总大肠菌群质控产品的测量值为 2 005 MPN/(100 mL),超出警告限值上限,未发生同一侧或不同侧的 3 个连续计数中有两个超过警告限值,也未发生 9 个连续的计数落在平均值的同一侧,以及 6 个连续计数显示有持续上升或下降趋势的异常波动。因此,判定检测过程受控。

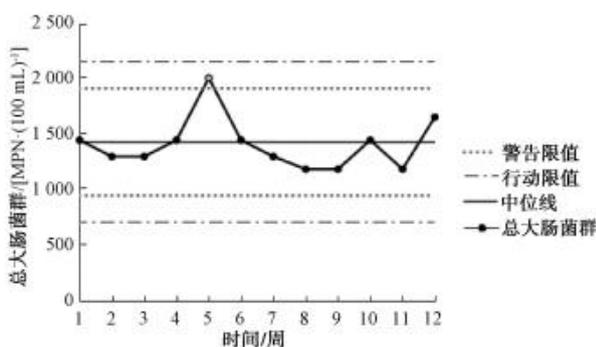


图2 酶底物法检测总大肠菌群休哈特控制图

Fig. 2 Shewhart Control Chart of Total Coliforms by Enzyme Substrate Technique

2.3 休哈特控制图的应用、优势和展望

由图 1 和图 2 可知,虽然可以判定滤膜法和酶底物法检测总大肠菌群的过程受控,但是两种方法检测的数据在第 5 周均超出了警告限值。经回溯,主要在于定量质控溶解时间虽然符合使用说明,但

是相较于其他几周,使用滤膜法时,溶解时间相对较短,导致结果偏低;使用酶底物法时,溶解时间相对较长,导致结果偏高。由此可知,第 5 周数据的波动并非是系统因素导致,检测过程可以正常运行。

本试验中,第 5 周滤膜法的测量值为 920 CFU/(100 mL),在可接受值[506~3 613 CFU/(100 mL)];酶底物法的测量值为 2 005 MPN/(100 mL),在可接受值[292~7 088 MPN/(100 mL)]。由于常规的质控方法通常根据标准规定的时间和批次实施,并不会连续进行,若操作符合要求,微生物在水中分布不均匀^[13],单次数据对真值的偏离通常不会触发进一步的调查和补救行动。与此相对,休哈特控制图则以直观的方式提供了一种持续性改进的工具,在提高试验精确度方面起到了一定的作用。

此次试验仅以总大肠菌群作为研究对象,鉴于耐热大肠菌群和大肠埃希氏菌是总大肠菌群的组成部分,推测休哈特控制图也可以在水中耐热大肠菌群和大肠埃希氏菌的检测过程中加以运用。

2.4 二次供水总大肠菌群检测结果对比

60 个二次供水实际样品分别采用滤膜法和酶底物法进行测定,两种检测方法均测得 2 个阳性样品,分别为 59 号和 60 号,其试验结果如表 1 所示。这 60 个二次供水水样的总大肠菌群阳性率约为 3.3%。

将数据录入 SPSS Statistics 软件进行配对样本 *t* 检验,结果表明,对于二次供水总大肠菌群的检测而言,滤膜法和酶底物法在统计学上无显著性差异 ($P>0.05$)。

表 1 60 个二次供水实际样品滤膜法和酶底物法结果对比
Tab. 1 Comparison of Results of Membrane Filter Technique and Enzyme Substrate Technique for 60 Samples in Secondary Water Supply System

水样编号	滤膜法 /[CFU·(100 mL) ⁻¹]	酶底物法 /[MPN·(100 mL) ⁻¹]
1~58	0	<1.0
59	1	22.2
60	29	13.7

图 3(a)和图 3(b)分别为 59 号和 60 号样品经抽滤并培养后的生长状况,在品红亚硫酸钠培养基平皿上生长为圆形、边缘整齐、深红色、不带金属光泽的菌落,菌落数分别为 1.0 CFU/(100 mL)和

29.0 CFU/(100 mL)。经革兰氏染色为阴性无芽孢杆菌,再接种乳糖蛋白胨培养液,培养后产酸产气,判定为总大肠菌群阳性。

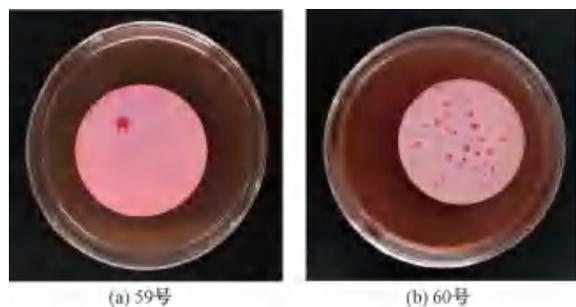


图3 水样在品红亚硫酸钠培养基上的生长状况
Fig. 3 Growth Conditions of Water Samples on Fuchsia Sodium Sulfite Medium

图4(a)和图4(b)分别为59号和60号样品在51孔定量盘上的生长状况。59号在51孔定量盘上显示黄色反应的孔穴数分别为18个,60号为12个,对应的总大肠菌群最可能数分别为22.2 MPN/(100 mL)和13.7 MPN/(100 mL)。



图4 水样在51孔定量盘上的生长状况
Fig. 4 Growth Conditions of Water Samples on 51-Well Quantitative Disc

研究表明,2007年山西省二次供水的合格率为97.1%^[13],太原市此次抽检的二次供水水样总大肠菌群阳性率为3.3%,因未涉及其他指标,此次水样存在着未达到96.7%合格率的可能,需要引起足够的重视。此外,此次抽检的时间为春季—夏季,两个

连续检出总大肠菌群的水样均发生在夏季,推测总大肠菌群阳性率可能与季节存在一定的相关性^[14]。

总大肠菌群的酶底物法比滤膜法要灵敏,故检出的总大肠菌群一般比滤膜法要高^[15]。60号的滤膜法比酶底物法检出了更多的总大肠菌群,可能是微生物在水中的分布不均匀所致^[16]。

2.5 菌种鉴定

使用分子生物学的方法,经初步鉴定,59号和60号水样分别在滤膜和51孔定量盘上均鉴定出相同的菌种,两种检测方法所得结果一致。59号水样中所含的总大肠菌群为肠杆菌科克雷伯菌属的新加坡克雷伯氏菌(*Klebsiella singaporensis*),60号水样中所含的总大肠菌群为肠杆菌科勒克菌属的非脱羧勒克菌(*Leclercia adecarboxylata*),无假阳性。

新加坡克雷伯氏菌最先于新加坡被分离出来,属于克雷伯氏菌属的一种^[17]。克雷伯氏菌属可寄生于人和动物的呼吸道或肠道,为条件致病菌,可引起肺炎、软组织感染甚至败血症等疾病^[18]。

非脱羧勒克菌是勒克菌属唯一的菌种,是一种罕见的肠杆菌科细菌。在一定条件下可对人体具有致病力,是条件致病菌,与人类腹泻密切相关,曾在腹泻患者粪便和痰液中有检出^[19]。

这些病原菌的检出比较明确地提示了二次供水被污染的风险。根据我国部分地区的调查显示,影响二次供水水质的主要因素有供水来源水厂等级、水箱是否定期清洗消毒、水箱管材的质量和管理水平。不合格的主要项目包含了微生物指标^[9,20]。太原市供水多为深层地下水,水质优良,因此,这些病原菌的检出也为改善二次供水的质量指明了方向。

3 结论

(1)休哈特控制图实现了对滤膜法和酶底物法检测总大肠菌群过程的有效监测。相较于常规质控方法,休哈特控制图提供了一种持续改进的工具,其成功实施也为应用于水中其他微生物的检测过程提供了可能性。

(2)太原市60个二次供水实际样品的总大肠菌群阳性率为3.3%,存在着与季节相关的可能性。

(3)两个阳性结果经初步鉴定,分别为肠杆菌科克雷伯菌属的新加坡克雷伯氏菌(*Klebsiella singaporensis*)和勒克菌属的非脱羧勒克菌(*Leclercia adecarboxylata*),无假阳性。

参考文献

- [1] SHEWHART W A. Quality control charts [J]. Bell System Technical, 1926; 593-603. DOI: 10.1002/j.1538-7305.1926.tb00125.x.
- [2] 辜明, 陈凯. 休哈特控制图—实验室常用的质量监控手段 [J]. 电子质量, 2017(11): 64-67, 89.
- [3] MOSTAFA E E. Shewhart control chart in microbiological quality control of purified water and its use in quantitative risk evaluation [J]. UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences, 2016, 4 (1): 45-51.
- [4] 王永智, 邱文娜, 史长军, 等. 休哈特控制图在药品水分含量测定中的应用 [J]. 西北药学杂志, 2015, 30(5): 578-581.
- [5] SAURAV M, TANMOY R, ALOK B. Pattern of genomic variation in SARS-CoV-2 (COVID-19) suggests restricted non-random changes; Analysis using Shewhart control charts [J]. Journal of Biosciences, 2021, 46(11): 1-7.
- [6] 王乙红, 徐艳, 杨波, 等. 休哈特控制图原理在医疗安全信息报告中的应用探讨 [J]. 中国卫生资源, 2009, 12(1): 41-43.
- [7] 周玮婧, 何平, 王澍, 等. 质控图在食用油中硫丹与多氯联苯残留检测国际比对中的应用 [J]. 粮食与油脂, 2019, 32(2): 73-76.
- [8] 段朋. 累积和-休哈特控制图在 GNSS 变形监测中的应用 [J]. 科技创新与生产力, 2020(8): 61-65.
- [9] 吴迷芳. 城市二次供水系统的优化改造 [D]. 天津: 天津大学, 2006.
- [10] 世界卫生组织. 饮用水水质准则 [M]. 上海: 上海交通大学出版社, 2014: 224-224.

- [11] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. 生活饮用水标准检验方法 微生物指标: GB/T 5750.12—2006 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [12] Standing Committee of Analysts. The microbiology of waters and associated materials (2017) practices and procedures for laboratories [M]. Nottingham: Environment Agency, 2017: 74-79.
- [13] 白林凯, 杜一娇, 岳滔, 等. 山西省集中式供水及二次供水卫生状况 [J]. 环境与健康杂志, 2009, 26(1): 58-60.
- [14] 刘颖, 蔡欢欢, 舒诗湖, 等. 华东某地二次供水水质检测结果分析 [J]. 净水技术, 2018, 37(s2): 41-44.
- [15] 魏金梅, 钟国庆. 生活饮用水中总大肠菌群检测方法探讨 [J]. 现代食品, 2020(15): 154-156.
- [16] 葛英亮. 净水工艺单元微生物群落结构及其生物风险研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2018.
- [17] LI X Z, ZHANG D H, CHEN F, et al. *Klebsiella singaporensis* sp. nov., a novel isomaltulose-producing bacterium [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54: 2131-2136. DOI: 10.1099/ijs.0.02690-0.
- [18] PODSCHUN R, ULLMANN U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors [J]. Clinical Microbiology Reviews, 1998, 11(4): 589-603.
- [19] 伍海燕, 宋燕, 张萍, 等. 一起由非脱羧胺杆菌引起食物中毒的调查和实验室检验与分析 [J]. 中国医药导报, 2012, 9(33): 136-137, 140.
- [20] 苗正. 崇明县住宅小区二次供水现状调查及影响因素研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2013.

(上接第 138 页)

5 结语

(1) 提标改造项目中, 利用 AOA 工艺耦合 MCCE 技术, 实现生化系统高效去碳脱氮, 同时以化学除磷法为辅可有效提高污水处理系统总体的除磷效率。

(2) 污水站提标改造仅新增 3 台设备, 污水处理量为 43.8 万 m^3/a , 吨水经营成本为 0.819 元/ m^3 , 具有项目建设费用低、工艺运行成本省等特点。

(3) 污水站主要针对乡镇生活污水处理, 建议类似项目容积过小的调节池水力停留时间可控制在 8 h 左右, 以平衡进水水质、水量, 利于项目工艺的稳定运行。

(4) 污水站的设计经验对出水水质要求高、用地紧张、经费有限、进水波动较大等条件的农村生活污水处理站的提标改造提供了一定的参考。

参考文献

- [1] 范腾腾. 水文水资源监测现状及应对措施的思考 [J]. 信息

周刊, 2020(5): 109-109.

- [2] 李娜. 水资源管理现状问题及应对措施思考 [J]. 河北农机, 2021(5): 29-30.
- [3] 蔡吴章. 污水处理厂提标改造工程经济评价研究 [J]. 上海水务, 2020(2): 20-22.
- [4] 曹正胜, 王小庆. 叠加式 AO 工艺在老旧污水处理厂提标改造中的应用 [J]. 净水技术, 2021, 40(s1): 127-131.
- [5] CHANG H Y, OUYANG C F. Improvement of nitrogen and phosphorus removal in the anaerobic-oxic-anoxic-OXIC (AOAO) process by stepwise feeding [J]. Water Science and Technology, 2000, 42(3-4): 89-94. DOI: 10.2166/wst.2000.0363.
- [6] FENG Y, PENG Y Z, WANG B, et al. A continuous plug-flow anaerobic/aerobic/anoxic/aerobic (AOAO) process treating low COD/TIN domestic sewage: Realization of partial nitrification and extremely advanced nitrogen removal [J]. Science of the Total Environment, 2021, 771: 145387. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.145387.
- [7] 应汉杰, 刘桂文, 陈勇, 等. 一种改性聚乙烯微生物载体填料: CN108946933A [P]. 2018-08-03.
- [8] 应汉杰, 刘桂文, 朱杰, 等. 一种生物锚定剂及其制备方法与应用: 2021100237360 [P]. 2021-04-27.