

城镇水系统全流程水质监测技术专栏

王莉莉. 酶底物光谱法与酶底物法检测水中大肠菌群的比较分析[J]. 净水技术, 2024, 43(3):187-193.

WANG L L. Comparative analysis of enzyme substrate spectrometry and enzyme substrate method for detection of coliform bacteria in water[J]. Water Purification Technology, 2024, 43(3):187-193.

酶底物光谱法与酶底物法检测水中大肠菌群的比较分析

王莉莉^{1,2,*}

(1. 广西北投环保水务集团有限公司, 广西南宁 530025; 2. 南宁市水安全工程技术研究中心, 广西南宁 530025)

摘要 采用新型酶底物光谱法和酶底物法对不同类型水样中总大肠菌群、大肠埃希氏菌及粪大肠菌群指标进行同步检测。两种方法各有优势, 采用 SPSS 软件对检测结果处理后进行配对 t 检验, 结果显示: 两组总大肠菌群的数据 $P=0.057$, 相关系数 $r=0.904$; 两组大肠埃希氏菌的数据 $P=0.593$, 相关系数 $r=0.972$; 两组粪大肠菌群的数据 $P=0.136$, 相关系数 $r=0.986$, 表明两种检测方法具有相关性, 且没有统计学意义上的显著性差异。采用酶底物光谱法检测有证质控样品, 总大肠菌群、大肠埃希氏菌、粪大肠菌群的检测结果均在质控样真值范围内, 证明该方法检测准确度符合要求。酶底物光谱法与酶底物法相比, 反应原理类似, 操作更加简便, 具有仪器自动化和智能化快速检测、判读、存储、联网传输数据等优点, 可满足实验室常规检测需求, 在应急突发事件现场检测方面有较强的运用前景和优势。

关键词 酶底物光谱法 酶底物法 总大肠菌群 大肠埃希氏菌 粪大肠菌群

中图分类号: TU991 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-0177(2024)03-0187-07

DOI: 10.15890/j.cnki.jsjs.2024.03.023

Comparative Analysis of Enzyme Substrate Spectrometry and Enzyme Substrate Method for Determination of Coliform Bacteria in Water

WANG Lili^{1,2,*}

(1. Guangxi Beitou Environmental Protection & Water Group Co., Ltd., Nanning 530025, China;

2. Nanning Engineering Technology Research Center of Water Safety, Nanning 530025, China)

Abstract Simultaneous determination of total coliforms, *Escherichia coli*, and fecal coliforms in different types of water samples was carried out using novel enzyme substrate spectrometry and enzyme substrate method. Both methods have their own advantages. After processing the detection results using SPSS software, paired t -tests were conducted. The results showed that the P value of the two groups of determination of total coliforms was 0.057, and the correlation coefficient was 0.904. The P value of two groups of *Escherichia coli* was 0.593, and the correlation coefficient was 0.972. The P value of the two groups of fecal coliforms was 0.136, and the correlation coefficient was 0.986. It indicated a correlation between the two detection methods, and there was no statistically significant difference. The enzyme substrate spectrometry method was used for detecting certified quality control samples, and the detection results of determination of total coliforms, *Escherichia coli*, and fecal coliforms were all within the true value range of the quality control sample, proving that the detection accuracy of this method met the requirements. Compared with enzyme substrate method, enzyme substrate spectrometry has similar reaction principles and is more convenient to operate. It has advantages such as instrument automation and intelligent rapid detection, interpretation, storage, and online transmission of data. It can meet the needs of routine laboratory testing and has strong application prospects and advantages in emergency on-site testing.

Keywords enzyme substrate spectrometry enzyme substrate method total coliforms *Escherichia coli* fecal coliforms

[收稿日期] 2023-05-15

[基金项目] 广西重点研发计划项目(桂科 AB21196036)

[通信作者] 王莉莉(1978—), 女, 正高级工程师, 研究方向为水质、环境污染物检测及技术管理, E-mail: 16126805@qq.com。

世界卫生组织统计,每年全球超过 150 万人由于饮用不安全的水死于腹泻病,其中大多数是婴幼儿。与饮用水相关的最常见和最普遍的健康风险来自通过粪便传播的微生物病原体引起的污染。全球最常用的水被粪便污染的指示菌是大肠埃希氏菌,每 100 mL 样品中大肠埃希氏菌超过 100 CFU 被认为是“非常高风险”的粪便污染水平,如未检出可被认为是低风险的^[1]。据文献^[2]显示,我国地表水体粪大肠菌群含量普遍较高,受到较为严重的粪便污染,其中河流水系含量最高,湖泊、海域次之。原水粪大肠菌群污染的加剧对水域游泳等直接身体接触活动人群存在明显健康影响^[3],水体中粪大肠菌群含量与有机物、富营养化程度正相关^[2]。因此,检测水中大肠杆菌含量对于预防疾病、居民健康、水源保护、水质评价及风险预警等具有重要作用和意义。目前,在生活饮用水、环境水、城镇污水相关的国家水质卫生标准文件中,对于水质大肠菌群的浓度表征及风险提示,主要采用总大肠菌群、大肠埃希氏菌、粪大肠菌群 3 项指标,此 3 项指标是常用于评价水体被粪便污染程度的指示菌,检测方法以多管发酵法、滤膜法为主,其次为酶底物法。酶底物法具有操作简单、快速、准确的优势^[4-7],近 10 年在国内得到广泛推广运用。目前市场上出现一类基于酶底物反应原理的水质微生物自动检测分析仪,具备一键

操作完成检测及报告结果的功能。本文采用检测仪(酶底物光谱法)与国标酶底物法检测不同类型的水质样品中的总大肠菌群、大肠埃希氏菌、粪大肠菌群指标,研究两种检测方法的相关性,采用酶底物光谱法检测有证标准物质,验证该方法的准确性,为开展水质大肠杆菌的检测提供备选方法。

1 试验材料和方法

1.1 主要设备与材料

TECTA-B16 全自动微生物检测系统(检测仪)、TECTA 测试套筒由北京华夏科创仪器股份有限公司提供;无菌采样瓶、97 孔定量盘、科立得试剂等耗材购自美国 IDEXX 公司授权的经销商;HJQC-003 酶底物法质控样品购自中国工业微生物种保藏管理中心。其余主要试验设备包括程控定量封口机、紫外线灯、上海一恒电热培养箱。

1.2 方法原理

(1)酶底物光谱法:在特定温度下培养特定的时间,总大肠菌群、大肠埃希氏菌、粪大肠菌群能产生 β -半乳糖苷酶、 β -葡糖醛酸酶,分解选择性培养基中的底物生成荧光物质;利用光学原理,通过进行连续的分光光度测定,依据待测水样荧光强度的变化与水中待测目标细菌的浓度的特殊对应关系,建立相关数学模型从而测定总大肠菌群、大肠埃希氏菌、粪大肠菌群的浓度。反应原理如图 1 所示。

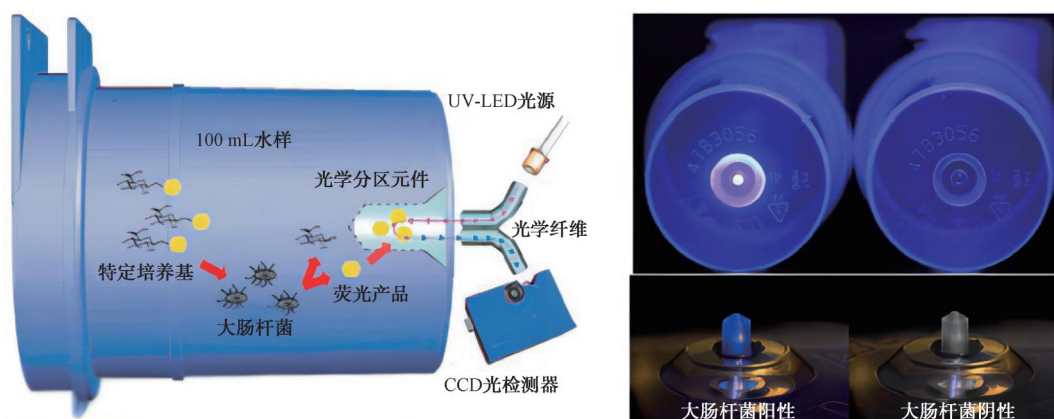


图 1 酶底物光谱法的反应原理

Fig. 1 Reaction Principle of Enzyme Substrate Spectrometry

(2)酶底物法:酶底物试剂包含 ONPG 和 MUG 这两种营养指示剂,分别会被大肠菌群酶(β -半乳糖苷酶)和大肠埃希氏菌酶(β -葡糖醛酸酶)代谢。在特定温度下培养特定的时间,总大肠菌群、粪大肠菌群、大肠埃希氏菌生长代谢过

程中产生特异性的酶,使培养基产生显色反应,样品从无色变成黄色;大肠埃希氏菌的产物在紫外灯照射下有蓝色荧光。通过统计阳性反应数量,查最大可能数(MPN)表,可以计算出对应项目指标的浓度值。

1.3 试验步骤

(1) 酶底物光谱法: 参照全自动微生物检测系统的仪器操作说明书进行。根据检测项目, 在微生物检测仪上选择相应的测试模式。接种待测水样于装有培养基的一次性测试套筒中, 定容至 100 mL, 水样与培养基应充分混匀, 将接种后的测试套筒放

置于仪器中, 经过 2~18 h 培养, 仪器自动输出检测结果。测定总大肠菌群和大肠埃希氏菌时, 接种到 CCA 测试套筒, 培养温度为 $(35.5 \pm 0.2)^\circ\text{C}$; 测定粪大肠菌群时, 接种到 FCA 测试套筒, 培养温度为 $(44.5 \pm 0.2)^\circ\text{C}$ 。检测样品的操作步骤如图 2 所示。

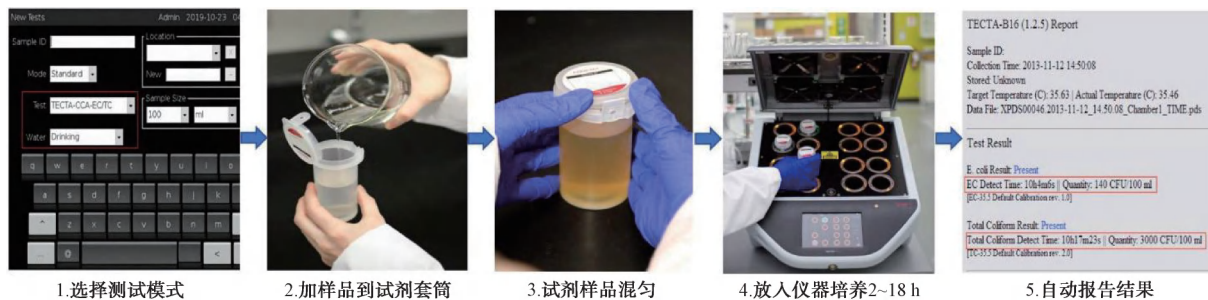


图 2 酶底物光谱法检测样品的操作步骤

Fig. 2 Procedure for Detecting Samples by Enzyme Substrate Spectrometry

(2) 酶底物法: 依据《水质 总大肠菌群、粪大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定 酶底物法》(HJ 1001—2018)、《生活饮用水标准检验方法 第 12 部分: 微生物指标》(GB/T 5750.12—2023) 5.3 酶底物法、7.3 酶底物法中的检测步骤进行^[8-9]。

(3) 以南宁地区实际样品进行试验, 生活饮用水、井水样品依据《生活饮用水标准检验方法 第 2 部分: 水样的采集与保存》(GB/T 5750.2—2023) 进行采样, 地表水、污水等样品依据《水质 总大肠菌群、粪大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定 酶底物法》(HJ 1001—2018) 进行样品采集和保存。采样容器为灭菌玻璃瓶, 也可用市售无菌采样瓶或无菌采样袋替代, 如样品含有余氯, 可在玻璃瓶灭菌处理前预先添加硫代硫酸钠^[8,10]。

(4) 数据统计分析使用 Office 和 IBM SPSS Statistics 软件, 绘图使用 Origin 2022 软件。

2 结果与讨论

2.1 实际样品的检测分析

(1) 对南宁地区生活饮用水 43 个样品(包括自来水厂出厂水 18 个样品、市政管网水 25 个样品)检测总大肠菌群、大肠埃希氏菌。两种方法对生活饮用水的检测结果均为阴性、未检出, 可认为两种方法试验结果具有一致性, 均可有效检测洁净水中的总大肠菌群、大肠埃希氏菌。

(2) 对南宁地区 30 个环境水样品检测总大肠

菌群、大肠埃希氏菌, 样品类型包括井水、地下水、地表水, 检测结果如表 1 所示。因为微生物检测数据属于偏态分布, 所以将测定结果以 10 取对数后进行计算。因为 0 没有对数, 结果为未检出 (<1) 的数据在统计时按 0.1 进行对数处理。运用 SPSS 软件对处理后数据进行配对 t 检验, 结果显示: 两组总大肠菌群的数据 $P = 0.057$ ($P > 0.05$), 相关系数 $r = 0.904$; 两组大肠埃希氏菌的数据 $P = 0.593$ ($P > 0.05$), 相关系数 $r = 0.972$ 。结果表明, 比对数据相关性较好, 两种方法在检测总大肠菌群、大肠埃希氏菌时没有统计学意义上的显著差异性, 具有等效性、可比性。结果比较如图 3 所示。

(3) 对南宁市区污水处理厂 30 个污水样品检测粪大肠菌群, 污水样品包括城镇污水处理厂的进厂污水、经工艺处理后污水, 检测结果如表 2 所示。运用 SPSS 软件对处理后数据进行配对 t 检验, 通过计算得出 $P = 0.136$ ($P > 0.05$), 相关系数 $r = 0.986$ 。表明比对结果呈现较好的相关性数据支持, 在检测粪大肠菌群时可获得两种方法无显著差异性, 具有等效性、可比性的结论。结果比较如图 4 所示。

试验结果表明, 酶底物光谱法在检测不同类型的实际样品时, 与酶底物法作为对照, 检测结果一致、等效, 可有效检测水中总大肠菌群、大肠埃希氏菌及粪大肠菌群, 可作为检测新方法。

表 1 两种方法检测南宁地区环境水样品中的总大肠菌群、大肠埃希氏菌的结果

Tab. 1 Results of Two Methods for Determination of Total Coliforms and *Escherichia Coli* in Environmental Water Samples in Nanning Area

序号	样品类型	酶底物光谱法	酶底物法	酶底物光谱法	酶底物法
		总大肠菌群/ [CFU·(100 mL) ⁻¹]	总大肠菌群/ [MPN·(100 mL) ⁻¹]	大肠埃希氏菌/ [CFU·(100 mL) ⁻¹]	大肠埃希氏菌/ [MPN·(100 mL) ⁻¹]
—	空白	<1	<1	<1	<1
1	井水 1	30	56.3	<1	<1
2	井水 2	57	32.7	<1	<1
3	井水 3	257	307.6	<1	<1
4	井水 4	638	2 419.6	26	24.3
5	井水 5	125	325.5	<1	<1
6	井水 6	771	165.8	1	1
7	井水 7	650	214.3	<1	<1
8	井水 8	962	275.5	3	2
9	井水 9	10	24.6	<1	<1
10	地下水 1	80	41.0	<1	<1
11	地下水 2	92	42.0	<1	<1
12	地表水 1	268	547.5	13	5.2
13	地表水 2	28 590	11 199	3 618	3 873
14	地表水 3	10 000	6 488	1 275	2 419.6
15	地表水 4	2 560	2 014	210	616
16	地表水 5	2 467	2 419.6	161	547.5
17	地表水 6	5 410	2 382	400	364
18	地表水 7	5 383	1 553.1	330	410.6
19	地表水 8	10 000	24 196	1 116	1 553.1
20	地表水 9	5 369	3 654	623	275.5
21	地表水 10	3 302	2 419.6	289	488.4
22	地表水 11	2 625	7 270	174	387.3
23	地表水 12	8 727	6 488	23	6.3
24	地表水 13	100 000	9 050	2 311	1 553.1
25	地表水 14	100 000	8 664	4 608	1 203.3
26	地表水 15	540	920.8	230	74.4
27	地表水 16	2 915	980.4	174	178.9
28	地表水 17	8 909	2 282	167	61.3
29	地表水 18	550	224.7	<1	2
30	地表水 19	81	185.0	<1	1

2.2 酶底物光谱法对有证质控样品的检测

酶底物光谱法对有证质控样品的检测结果如表 3 所示。结果表明:总大肠菌群、大肠埃希氏菌、粪大肠菌群的检测结果均在质控样品的参考值范围

内,酶底物光谱法可以准确检测定量质控。

2.3 方法比对

(1)在检测时长、结果报告方面,酶底物光谱法更有效率。酶底物法的培养时间为 24~28 h,培养

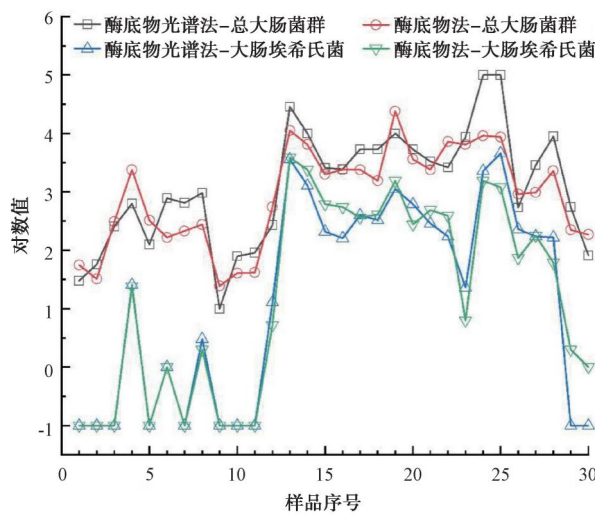


图3 两种方法检测南宁地区环境水样品中的总大肠菌群、大肠埃希氏菌的对数结果比较

Fig. 3 Comparison of Logarithm Results of Two Methods for Determination of Total Coliforms and *Escherichia Coli* in Environmental Water Samples in Nanning Area

表2 两种方法检测南宁市区污水处理厂污水样品中的粪大肠菌群的结果

Tab. 2 Results of Two Methods for Fecal Coliforms in Wastewater Samples from WWTPs in Nanning Area

序号	样品类型	酶底物光谱法/ [CFU·(100 mL) ⁻¹]	酶底物法/ [MPN·(100 mL) ⁻¹]	序号	样品类型	酶底物光谱法/ [CFU·(100 mL) ⁻¹]	酶底物法/ [MPN·(100 mL) ⁻¹]
—	空白	<1	<1	16	处理后污水	9	5.2
1	进厂污水	10 000 000	1 203 300	17	进厂污水	42 350 000	24 196 000
2	进厂污水	4 630 000	9 804 000	18	处理后污水	<1	<1
3	处理后污水	<1	<1	19	进厂污水	3 637 000	1 986 300
4	进厂污水	610 000	355 000	20	处理后污水	4	1.0
5	处理后污水	10 000	10 181	21	进厂污水	20 790 000	4 106 000
6	进厂污水	2 350 000	1 119 900	22	处理后污水	81 000	24 196
7	处理后污水	1	1.0	23	进厂污水	14 650 000	1 376 000
8	进厂污水	3 684 000	1 413 600	24	处理后污水	<1	<1
9	处理后污水	544	67.7	25	进厂污水	41 000	365 400
10	处理后污水	65	30.3	26	处理后污水	<1	<1
11	进厂污水	176 000	241 960	27	进厂污水	289 000	235 900
12	处理后污水	10	3.1	28	处理后污水	36	93.3
13	进厂污水	741 200	436 000	29	进厂污水	2 510 000	410 600
14	处理后污水	2	5.2	30	处理后污水	<1	1.0
15	进厂污水	579 400	3 448 000				

时间固定,人工计数查 MPN 表报告结果;酶底物光谱法是快速法,培养时间为 2~18 h,检测仪运用样品酶反应产生荧光强度的时间与目标细菌浓度建立标准曲线,自动控制培养时间,大肠杆菌大于 1×10⁶ CFU/(100 mL) 的高污染样品检测时间短,最快

2 h,大肠杆菌小于 1 CFU/(100 mL)的样品检测需 18 h。检测仪自动报告结果,可以联网发送结果到手机,无需人员值守实验室等待,提高了工作效率的同时降低人工计数误差,可满足提前预警降低危害、及时提示风险的功能需求,满足应急快速检测的需求。

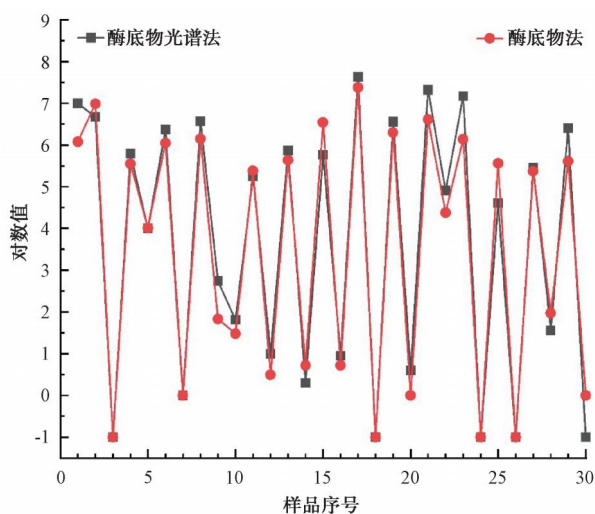


图4 两种方法检测南宁市区污水处理厂污水样品中的粪大肠菌群的对数结果比较

Fig. 4 Comparison of Logarithm Results between Two Methods for Fecal Coliforms in Wastewater Samples of WWTPs in Nanning Area

表3 酶底物光谱法检测定量质控样品的结果

Tab. 3 Results of Quantitative Quality Control Samples Detected by Enzyme Substrate Spectrometry

序号	检测指标	参考值及范围/ (MPN·L ⁻¹)	检测结果/(CFU·L ⁻¹)		
			第一次	第二次	第三次
1	总大肠菌群	7 300(3 400~15 000)	7 020	8 150	7 560
2	大肠埃希氏菌	4 100(2 100~7 800)	3 710	3 600	4 230
3	粪大肠菌群	3 600(1 800~7 000)	3 170	3 510	3 280

注:质控样(含阴性阳性菌种)溯源性信息为 CICC 24176、CICC 23008、CICC 10384;质控样批号为 20222070。

(2)酶底物光谱法在检测时水样不受浑浊度、色度的影响。由于酶底物光谱法所使用的化学培养基是一种疏水性试剂,当发生反应时,荧光分子作为指示剂快速地从水样中移动到套筒内的聚合物光学传感器中,由系统中的微型光谱仪自动完成检测。因此,可以避免来自水样中悬浮物、杂质、水样本底颜色等的干扰。用酶底物法检测样品,其浑浊度、色度较高时,存在一定的干扰,需要做样品本底对照,在结果计数时辅助辨别颜色。

(3)酶底物光谱法在无需稀释水样时,具有更宽的测量范围。酶底物法的测量值为 $1 \sim 2.419.6$ MPN/(100 mL),酶底物光谱法的测量值为 $1 \sim 1 \times 10^8$ CFU/(100 mL),后者可减少稀释次数,降低稀释误差。

(4)酶底物法可用于实验室常规检测、应急检测,能满足大批量样品的微生物检测需求。酶底物光谱法的检测仪是集合样品培养和检测功能的一体机,配置有 16 个样品位置,适合检测样品批量和数

量少的实验室。

(5)酶底物光谱法比酶底物法在操作上进一步提升便捷性和效率,但其检测仪器、耗材成本也更高。市场上同类型酶底物光谱法检测仪有台式仪器和便携式仪器,其价格是酶底物法设备的 3~6 倍,其单个耗材费用为酶底物法的 1~2 倍。

3 结论

(1)试验测定不同类型的实际水样中的总大肠菌群、大肠埃希氏菌及粪大肠菌群指标,检测结果统计分析表明酶底物光谱法与酶底物法无统计学意义上的显著性差异。由于比对的样本数量不够多,比对结果亦存在一定的局限性。

(2)酶底物光谱法可以准确检测以上 3 项水质粪便污染指示菌。

(3)酶底物光谱法已经列入山东省地标《水质粪大肠菌群测定 光度法》(DB 37/T 3787—2019),暂未列入国家其他水质标准中。此外,该方法检测成本相对较高,因此,在实验室开展常规检测时通常

不会作为首选方法,但是有条件的实验室可将其列为传统检测方法(如多管发酵法、滤膜法)的比对方法,作为国标检测方法的有益补充,丰富和完善实验室的多元化检测方法体系。

(4)酶底物光谱法具有操作步骤简易、检测效率高、无需稀释条件下测定范围较宽、方便携带及远程传输数据等优点,在应急突发事件现场检测、风险预警方面具有较强的应用前景和优势。

参考文献

- [1] World Health Organization. State of the world's drinking water: An urgent call to action to accelerate progress on ensuring safe drinking water for all[R]. Geneva: World Health Organization, 2022.
- [2] 江磊,朱德军,陈永灿,等.我国地表水体粪大肠菌群污染现状分析[J].水利水电科技进展,2015,35(3):11-18.
JIANG L, ZHU D J, CHEN Y C, et al. Analysis on fecal coliform pollution in surface waters of China[J]. Advances in Science and Technology of Water Resources, 2015, 35(3): 11-18.
- [3] 曾灿,郭文路,李倩如,等.湘江流域市区段水源地粪大肠菌群污染研究及健康影响[J].山东化工,2021,50(4):294-295,298.
ZENG C, GUO W L, LI Q R, et al. Study on fecal coliform contamination and health impact of water source areas in the Xiangjiang River Basin urban area [J]. Shandong Chemical Industry, 2021, 50(4): 294-295, 298.
- [4] 陈明桂,杨虹.酶底物法测定水中总大肠菌群、粪大肠菌群和粪埃希氏菌质量控制研究[J].绿色科技,2020(8):117-119.
CHEN M G, YANG H. Laboratory quality control of enzyme substrate method for determination of total coliform, fecal coliform and *Escherichia coli* in water[J]. Journal of Green Science and Technology, 2020(8): 117-119.
- [5] 徐庄艳.水中总大肠菌群酶底物法、滤膜法与多管发酵法的比较[J].净水技术,2022,41(s1):356-359.
XU Z Y. Comparison of enzyme substrate method, membrane method and multi-tube fermentation method of coliform in water [J]. Water Purification Technology, 2022, 41(s1): 356-359.
- [6] 刘文亮.酶底物法测定东莞市地下水、地表水、生活污水中粪大肠菌群、总大肠菌群的研究[J].广东化工,2021,48(9):235-238.
LIU W L. Determination of fecal coliform and total coliform in groundwater, surface water and domestic sewage in Dongguan City by enzyme substrate method [J]. Guangdong Chemical Industry, 2021, 48(9): 235-238.
- [7] 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].洛阳理工学院学报(自然科学版),2011,21(4):13-15.
DUAN Y L, ZHANG S M, WEN T, et al. Fast determination of fecal coliform in surface water by enzyme substrate technique [J]. Journal of Luoyang Institute of Science and Technology (Natural Science Edition), 2011, 21(4): 13-15.
- [8] 中华人民共和国生态环境部.水质 总大肠菌群、粪大肠菌群和粪埃希氏菌的测定 酶底物法:HJ 1001—2018[S].北京:中国环境出版集团,2018.
Ministry of Ecology and Environment of the People's Republic of China. Water quality—Determination of total coliforms, fecal coliforms and *Escherichia coli*—Enzyme substrate method: HJ 1001—2018 [S]. Beijing: China Environment Publishing Group, 2018.
- [9] 国家市场监督管理总局,国家标准化管理委员会.生活饮用水标准检验方法 第12部分 微生物指标:GB/T 5750.12—2023[S].北京:中国标准出版社,2023.
State Administration for Market Regulation, Standardization Administration of the People's Republic of China. Standard examination methods for drinking water—Part 12: Microbiological indices: GB/T 5750.12—2023 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2023.
- [10] 国家市场监督管理总局,国家标准化管理委员会.生活饮用水标准检验方法 第2部分 水样的采集与保存:GB/T 5750.2—2023[S].北京:中国标准出版社,2023.
State Administration for Market Regulation, Standardization Administration of the People's Republic of China. Standard examination methods for drinking water—Part 2: Collection and preservation of water samples: GB/T 5750.2—2023 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2023.

勘 误

刊登于《净水技术》2024年第43卷第2期第62页《微塑料在某水厂水源与处理工艺中的时空分布》一文中,“DOI: 10.11707/j.1001-7488.2024.02.007”应为“DOI: 10.15890/j.cnki.jsjs.2024.02.007”;第112页《基于数理统计和数值分析的污水处理厂处理效果评估方法》一文中,“DOI: 10.11707/j.1001-7488.2024.02.014”应为“DOI: 10.15890/j.cnki.jsjs.2024.02.014”,特此更正,并对读者造成的不便致以深切歉意。