

分析与监测

## 酸性磷酸酶确证法快速检测生活饮用水中产气荚膜梭菌

王 慕<sup>1</sup>, 陈莹倩<sup>2</sup>

(1. 无锡市政公用环境检测研究院有限公司, 江苏 无锡 214063; 2. 无锡市政公用检测有限公司, 江苏 无锡 214073)

**摘 要:** 自《生活饮用水卫生标准》(GB 5749—2006)附录 A 中对微生物指标产气荚膜梭菌提出参考限值要求后,至今未出台相关检测标准。针对此问题,参考现行有效的食品类产气荚膜梭菌检测标准,在经传统生化培养分离的前提下,研究对比了两种鉴定产气荚膜梭菌的方法——标准表型鉴定法和酸性磷酸酶确证法。结果表明,酸性磷酸酶确证法可用于鉴定饮用水中产气荚膜梭菌。引入酸性磷酸酶确证法可简化饮用水中产气荚膜梭菌的检测步骤,该方法可将产气荚膜梭菌的整体检测周期缩短至 48 h,一定程度上提高了检测饮用水中产气荚膜梭菌的效率,为快速判断饮用水生物安全性打下基础。

**关键词:** 产气荚膜梭菌; 酸性磷酸酶; 饮用水

**中图分类号:** TU991 **文献标识码:** B **文章编号:** 1000-4602(2019)24-0104-04

### Rapid Detection of *Clostridium perfringens* in Drinking Water by Acid Phosphatase Identification Method

WANG Mu<sup>1</sup>, CHEN Ying-qian<sup>2</sup>

(1. Wuxi Public Utilities Environment Testing Research Institute Co. Ltd., Wuxi 214063, China;  
2. Wuxi Public Utilities Testing Co. Ltd., Wuxi 214073, China)

**Abstract:** Since the requirements for the reference limit of the microbial indicator *Clostridium perfringens* were put forward in appendix A of *Standards for Drinking Water Quality* (GB 5749-2006), no relevant testing standards have been issued. In view of this problem, referring to the existing detection standards of *Clostridium perfringens* in food, two methods for identification of *Clostridium perfringens*, e. g. standard phenotypic identification and acid phosphatase identification were studied and compared on the premise of traditional biochemical culture and isolation. The results showed that acid phosphatase identification could be used to identify *Clostridium perfringens* in drinking water. Introduction of acid phosphatase identification could simplify the detection steps of *Clostridium perfringens* in drinking water. This method can shorten the overall detection cycle of *Clostridium perfringens* to 48 h. So the detection efficiency of *Clostridium perfringens* in drinking water was improved. And furthermore, a foundation was established for rapid judgment of the drinking water biosafety.

**Key words:** *Clostridium perfringens*; acid phosphatase; drinking water

产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)是肠道正常菌群的成员之一,也是一种条件致病菌,它广泛

存在于污水和土壤中,亦定居在人和大部分温血动物的肠道中。由于其专性厌氧性,故一般不在水体

中自然繁殖,主要来源于人类及牲畜的粪便排泄物,因此产气荚膜梭菌可作为一种陈旧性粪便污染的指示物。如水中未检出粪大肠菌群和粪链球菌,而产气荚膜梭菌呈阳性,则表示水体仍有陈旧性粪便污染<sup>[1]</sup>。在世界卫生组织最新版的饮用水质量指导标准<sup>[2]</sup>中提到,产气荚膜梭菌是一种间接性粪便污染指示物,可用于评判饮用水处理过程中消毒工艺的效率 and 物理化学处理工艺对病毒以及原生动物的去除效果。被产气荚膜梭菌污染的水源及食品可引起人的食物中毒和动物的胃肠道疾病。

《生活饮用水卫生标准》(GB 5749—2006)附录A中的微生物指标产气荚膜梭菌的参考限值为0 CFU/100 mL,《食品安全国家标准 饮用天然矿泉水》(GB 8537—2018)和欧盟饮用水水质指令(98/83/EC)<sup>[3]</sup>中,产气荚膜梭菌均为不得检出,显然,在饮用水中该微生物指标受到严格控制。国内目前尚未出台针对生活饮用水的产气荚膜梭菌检测标准,其检测多参考食品行业检测方法——传统生化培养分离后再经标准表型鉴定确证,如《食品安全国家标准 食品微生物学检验 产气荚膜梭菌检验》(GB 4789.13—2012)、《出口食品中产气荚膜梭状芽孢杆菌计数方法》(SN/T 0177—2011)等。这些标准中涉及到的鉴定方法步骤繁琐,检测周期长,对操作人员的专业技能要求高。有研究<sup>[4]</sup>表明,产气荚膜梭菌具有磷酸酶反应活性,并初步被证实可用于鉴定从水中分离的产气荚膜梭菌分离株<sup>[5]</sup>。笔者尝试引入酸性磷酸酶确证法,该方法操作简便,检测周期短,可快速判定饮用水中是否含有产气荚膜梭菌。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌种

产气荚膜梭菌标准菌株 ATCC13124(美国菌种保藏中心)。

### 1.2 主要设备与材料

厌氧培养罐及厌氧产气袋(日本三菱,需配合刃天青指示剂使用);隔水式恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司,GHP-9080);光学显微镜(日本奥林巴斯株式会社,BX51);不锈钢薄膜过滤器(定制);水系微孔滤膜(上海兴亚净化材料厂,孔径0.45 μm,直径50 mm);无菌采样瓶(美国爱德士,120 mL,含硫代硫酸钠)。

### 1.3 培养基与试剂

胰蛋白胨大豆琼脂(英国 OXOID);亚硫酸盐-

环丝氨酸琼脂(青岛海博);液体硫乙醇酸盐培养基、乳糖亚硫酸盐培养基、缓冲动力-硝酸盐生化鉴定管、乳糖-明胶生化鉴定管(北京陆桥);酸性磷酸酶试剂(自制)。

亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂配制方法:购买市售商品化制品,按说明定量称取后加热溶解,于121℃下高压蒸汽灭菌15 min,冷却至60℃后,每100 mL培养基中加入过滤除菌的4% D-环丝氨酸1 mL,充分混匀后倾注约15 mL至无菌空平皿中,待冷却凝固后置冰箱内备用。

酸性磷酸酶试剂配制方法:1-磷酸萘基酯二钠盐水合物0.4 g,固蓝-B 0.8 g,乙酸缓冲溶液(pH为4.6±0.2)20 mL。

## 1.4 试验方法

### 1.4.1 水样采集

将龙头清洁水样直接采集于含硫代硫酸钠的无菌瓶中,采集至100 mL刻线处即可。

### 1.4.2 阳性水样制备

将产气荚膜梭菌 ATCC13124 标准菌株按说明书步骤活化,即用拭子沾取适量菌液涂抹在胰蛋白胨大豆琼脂平板上,用无菌接种针划线分离,将平板倒置于厌氧罐中,于(37±0.5)℃培养24 h后获得独立的菌落。以无菌接种针沾取独立菌落至无菌水中,经梯度稀释后获得200 CFU/mL以下浓度的菌液,吸取此菌液1 mL至上述100 mL清洁水样中,制得人工污染的阳性水样以备后续使用。

### 1.4.3 检测样品

#### ① 准备工作

滤膜灭菌:将滤膜放入装有纯水的烧杯中加热煮沸三次,每次15 min,前两次煮沸后需更换纯净水洗涤2~3次,以除去滤膜表面残留的浮灰和溶剂。

过滤器灭菌:过滤器(包括不锈钢滤杯和滤床)用点燃的酒精棉球经火焰灼烧灭菌。

#### ② 样品过滤

用无菌镊子夹取经煮沸灭菌的滤膜至无菌滤床上,用铁夹固定不锈钢滤杯。将制备好的样品倒入不锈钢滤杯中,打开真空泵进行抽滤。全部样品通过滤膜后,用20~30 mL无菌水清洗滤器边缘两次。

#### ③ 接种与培养

用无菌镊子将滤膜截留面朝上贴放于亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂表面,防止滤膜与琼脂表面之间产生气泡。将平板置于(37±0.5)℃下厌氧培养

24 h 后观察,产气荚膜梭菌在亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂平板的滤膜上形成黑色的典型菌落。

#### ④ 镜检判读

典型菌落接种到胰蛋白胨大豆琼脂斜面上,( $37 \pm 0.5$ )℃下厌氧培养 48 h,从斜面上挑取培养物做革兰氏染色后镜检,典型菌落应符合革兰氏阳性杆菌特征。

#### ⑤ 标准表型鉴定法确证试验一

典型菌落接种到液体硫乙醇酸盐培养基中,( $37 \pm 0.5$ )℃下厌氧培养 24 h 后,将液体硫乙醇酸盐培养基中的培养物接种至乳糖亚硫酸盐培养基中,46℃下培养 24 h 后观察细菌生长情况。产气荚膜梭菌会使乳糖亚硫酸盐培养基中生成黑色沉淀,并且小倒管内集有气泡。

#### ⑥ 标准表型鉴定法确证试验二

典型菌落接种到液体硫乙醇酸盐培养基中,( $37 \pm 0.5$ )℃下厌氧培养 24 h 后,将液体硫乙醇酸盐培养基中的培养物划线接种于亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂表面,( $37 \pm 0.5$ )℃下厌氧培养 24 h,获得纯菌落。a. 将纯菌落穿刺接种于缓冲动力-硝酸盐生化鉴定管中,( $37 \pm 0.5$ )℃下厌氧培养 24 h,在透射光下观察细菌沿穿刺线的生长情况,并滴加亚硝酸盐检测试剂验证亚硝酸盐的存在。产气荚膜梭菌菌株无动力,并能将硝酸盐还原成亚硝酸盐。b. 将纯菌落穿刺接种于乳糖-明胶生化鉴定管中,( $37 \pm 0.5$ )℃下厌氧培养 24 h 后观察细菌在鉴定管中的生长情况。产气荚膜梭菌能分解乳糖产酸产气,并使明胶液化。

#### ⑦ 酸性磷酸酶确证试验

将典型菌落划线于胰蛋白胨大豆琼脂平板上,( $37 \pm 0.5$ )℃下厌氧培养 24 h,挑取合适的单菌落置于滤纸上,在滴加少量酸性磷酸酶试剂后,菌落从原来的淡黄色变为葡萄紫色,并且颜色在 5 min 内逐渐变深不消退,由此现象可判定为产气荚膜梭菌。

## 2 结果与讨论

过滤人工污染的阳性水样,经亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂培养后获得如图 1(a)所示的黑色的典型菌落。挑取典型菌落做镜检判读,染色后镜检如图 1(b)所示,该典型菌落符合革兰氏阳性杆菌特征,即革兰氏染色后呈蓝紫色,且形态为长杆状。挑取与镜检所用相同菌落,分别用标准表型鉴定法确证试验一、标准表型鉴定法确证试验二以及酸性磷酸

酶确证试验对其进行鉴定确证,分别获得如图 2~4 所示的特征图片。

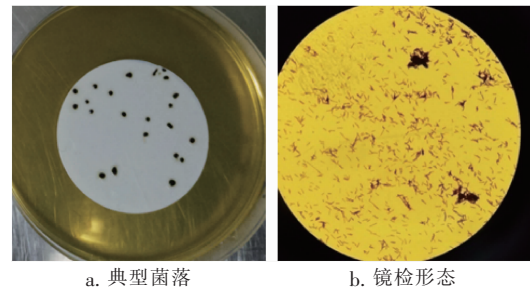


图1 产气荚膜梭菌在亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂培养基上的典型菌落及其镜检形态

Fig.1 The typical colony of *Clostridium perfringens* on sulfite-cycloserine agar and its microscopic morphology

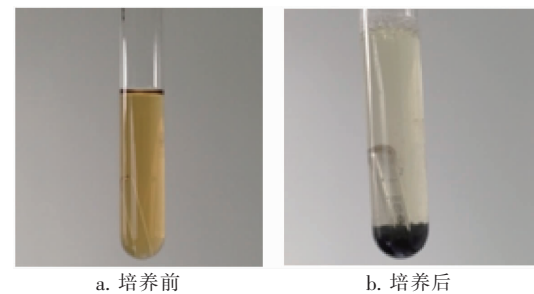


图2 标准表型鉴定法确证试验一阳性特征

Fig.2 Positive characteristics of test 1 by standard phenotypic identification

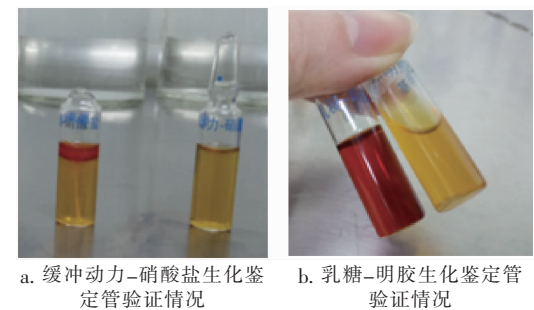


图3 标准表型鉴定法确证试验二阳性特征

Fig.3 Positive characteristics of test 2 by standard phenotypic identification

由图 2 可见,典型菌落接种到乳糖亚硫酸盐培养基培养后,试管底部有黑色沉淀,即亚硫酸铁沉淀,且倒管内充满气体,可确认产气荚膜梭菌阳性。

由图 3 可见,通过缓冲动力-硝酸盐生化鉴定管验证可以看出菌株仅沿穿刺线生长,并且在滴加亚硝酸盐检测试剂后出现橙红色,表明菌株将硝酸盐还原成了亚硝酸盐。通过乳糖-明胶生化鉴定管



验证发现培养基变黄,表明乳糖发酵产酸,微小气泡表明产气,并且使明胶液化。两者结合可确认为产气荚膜梭菌阳性。

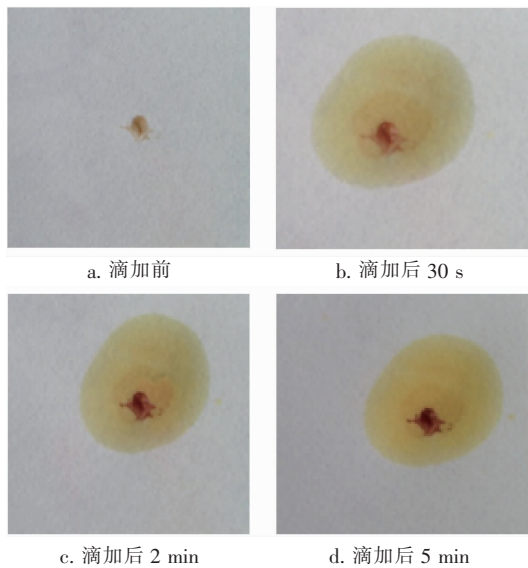


图 4 酸性磷酸酶验证试验显色反应

Fig. 4 Chromogenic reaction of acid phosphatase identification

由图 4 可见,在滴加酸性磷酸酶试剂后,菌落从原来的黄色变为葡萄紫色,并且颜色在 5 min 内逐渐变深,并未消退,可推断为产气荚膜梭菌阳性。

经三种确证试验证实,与镜检所用相同菌落为产气荚膜梭菌。三个确证试验的阳性特征描述与各自检测周期的比较见表 1。可见,酸性磷酸酶确证试验阳性特征容易辨别,而且操作步骤少,可以缩短整体检测周期,与传统微生物检测的操作手法相比,酸性磷酸酶确证试验简便易学,不失为一种快速判定饮用水中是否含有产气荚膜梭菌的方法。

表 1 三个确证试验的阳性特征与检测周期

Tab. 1 Positive characteristics and detection cycles of three identifications h

项 目	阳性特征	确证试验 检测时间	整体检 测时间
标准表型鉴定 法确证试验一	试管中生成黑色沉淀, 小倒管内有气体	48	72
标准表型鉴定 法确证试验二	a. 接种菌株仅沿穿刺线生 长,滴加亚硝酸盐检测试剂 后出现橙红色;b. 培养基变 黄,有微小气泡,使明胶液化	72	96
酸性磷酸酶 确证试验	菌落从淡黄色变为葡萄紫 色,并且颜色逐渐变深	24	48

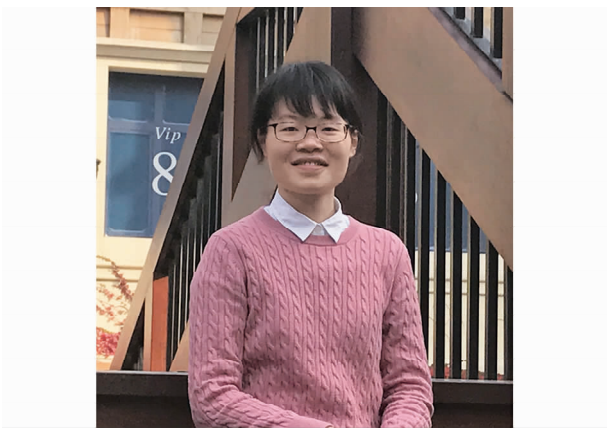
3 结论

饮用水水质的生物安全性受制于微生物的固有

生长周期以及繁琐的传统生化培养检测步骤,往往无法做到及时准确地判断。将酸性磷酸酶确证试验与两种传统的标准表型鉴定法相比之后发现,该方法可将产气荚膜梭菌的整体检测周期缩短至 48 h,一定程度上提高了检测饮用水中产气荚膜梭菌的效率,为快速判断饮用水生物安全性打下基础。

参考文献:

[1] 孟晓静,龚书明. 产气荚膜梭菌:一种水污染的指示菌[J]. 中国公共卫生,1998,14(3):182-184.  
Meng Xiaojing, Gong Shuming. *Clostridium perfringens*: An indicator of water pollution[J]. Chinese Journal of Public Health, 1998, 14(3): 182-184 (in Chinese).  
[2] World Health Organization. Guidelines for Drinking-water Quality[M]. 4th ed. Switzerland: WHO, 2011.  
[3] European Communities. Council Directive 98/83/EC on the Quality of Water Intended for Human Consumption [S]. UK: Official Journal of the European Communities, 1998.  
[4] Ueno K, Fujii H, Marui T, et al. Acid phosphatase in *Clostridium perfringens*, a new rapid and simple identification method [J]. Japan J Microbiol, 1970, 14 (2): 171-173.  
[5] Ryzinska-Paier G, Sommer R, Haider J M, et al. Acid phosphatase test proves superior to standard phenotypic identification procedure for *Clostridium perfringens* strains isolated from water[J]. J Microbiol Methods, 2011, 87 (2): 189-194.



作者简介:王慕(1987-),女,江苏无锡人,硕士,工程师,主要从事饮用水中微生物指标的检测及相关科研工作。

E-mail: diamonddust@163.com

收稿日期:2019-09-29