

分析与监测

DOI:10.19853/j.zgjsps.1000-4602.2021.12.031

## 水中耐热大肠菌群滤膜检测法优化

逯南南, 石近森, 褚福敏, 刘 轲, 赵清华, 孙韶华, 贾瑞宝  
(山东省城市供排水水质监测中心, 山东 济南 250021)

**摘 要:** 耐热大肠菌群是《生活饮用水卫生标准》(GB 5749—2006)中的常规检测项目,推荐的滤膜检测法过程简单、费用低廉,被广泛应用,但存在检测结果准确性欠佳的问题。对检测试剂、耗材及培养条件等检测条件进行了优化研究,并深入探讨了湿度对耐热大肠菌群生长的影响,结果表明检测用培养基、滤膜和培养温度、湿度是影响滤膜法检测耐热大肠菌群结果的关键要素。优化方法采用商品化培养基、一次性无菌滤膜、人工气候箱培养,湿度控制在40%左右,能够有效提高检测结果的准确度。

**关键词:** 耐热大肠菌群; 粪大肠菌群; 滤膜法; 酶底物法

**中图分类号:** TU991 **文献标识码:** B **文章编号:** 1000-4602(2021)12-0164-05

## Optimization of Filtration Membrane Method for Heat-resistant Coliforms Detection in Water

LU Nan-nan, SHI Jin-miao, CHU Fu-min, LIU Ke, ZHAO Qing-hua, SUN Shao-hua,  
JIA Rui-bao

(Shandong Province City Water Supply and Drainage Water Quality Monitoring Center, Jinan  
250021, China)

**Abstract:** Heat-resistant coliforms are a routine test item in *Standards for Drinking Water Quality* (GB 5749 - 2006). The recommended filtration membrane detection method has the advantages of simple procedure and low cost, and is widely applied. However, the accuracy of detection results of this method is not good. Detection conditions such as detection reagent, consumables and culture conditions were optimized, and influence of humidity on the growth of heat-resistant coliforms was discussed. The culture medium, filter membrane, culture temperature and culture humidity were the key factors that affected the filter membrane method results in the detection of heat-resistant coliforms. The optimized method adopted commercial culture medium, disposable aseptic filter membrane and artificial climate incubator, and controlled the humidity at about 40%, which effectively improved the accuracy of the detection results.

**Key words:** heat-resistant coliforms; fecal coliforms; filtration membrane method; enzyme substrate method

**基金项目:** 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2017ZX07502003-06、2018ZX07502-001); 山东省泰山学者建设工程专项(ts201712084); 山东省中央引导地方科技发展资金项目(YDZX20203700001642); 山东省重点研发计划项目(2020CXGC011406)

**通信作者:** 贾瑞宝 E-mail: jiaruibao1968@163.com

耐热大肠菌群又称粪大肠菌群,是一类在 44.5℃ 培养条件下正常生长且发酵乳糖产酸产气、需氧和兼性厌氧的革兰氏阴性无芽孢杆菌。人和温血动物粪便是水环境中耐热大肠菌群的主要来源,该项指标作为指示水体粪便污染的关键指标在水质监测与评价中发挥重要作用。与总大肠菌群相比,耐热大肠菌群能够更准确地反映水质受粪便污染的情况。《生活饮用水卫生标准》(GB 5749—2006)将耐热大肠菌群列入微生物常规控制项目。

耐热大肠菌群的检测方法有多管发酵法、滤膜法、酶底物法等。多管发酵法操作步骤繁琐、阳性水样检测时间 3~5 d,不适用于水中耐热大肠菌群的快速评价。酶底物法虽操作简便,但设备耗材成本高,制约了方法的普及推广。与以上两者相比较,滤膜法操作相对方便、检测时间较短(1~2 d)、费用低,是目前应用最为广泛的耐热大肠菌群检测方法<sup>[1-3]</sup>。

耐热大肠菌群滤膜检测法的主要标准依据为《生活饮用水标准检验方法 微生物指标》(GB/T 5750.12—2006)和《水质 粪大肠菌群的测定 滤膜法》(HJ 347.1—2018),现有标准中方法描述不够详尽,如培养条件、试剂耗材性能参数要求等,影响了方法的可操作性及检测结果的准确性。本研究从培养基、培养条件、滤膜的优选等影响检测结果的关键环节展开,确定滤膜法检测耐热大肠菌群的最优化条件,为检测结果的准确性和可靠性提供基础性保障。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试剂:MFC 培养基、EC 培养基、无菌 PBS 缓冲液、科立得试剂。

材料:有证大肠埃希氏菌质控标样、醋酸纤维素滤膜(孔径 0.45 μm、直径 50 mm)、过滤器、镊子、一次性无菌培养皿、97 孔定量盘等。

### 1.2 试验设备

隔水式恒温培养箱(上海博迅/GSP-9080MBE 型),人工气候箱(Binder/KBWF240 型),封口机(Quanti-Tray Model 2X 型)。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 滤膜法

按照《生活饮用水标准检验方法 微生物指标》(GB/T 5750.12—2006)中的滤膜法进行。将无菌

滤膜贴在已灭菌的滤床上,固定滤器,量取 100 mL 样品注入滤器中,抽滤,取下滤膜,截留面向上贴于 MFC 培养基上,将平皿 44.5℃ 培养(24±2) h,取出读数。耐热大肠菌群在 MFC 培养基上菌落为蓝色,非耐热大肠菌群菌落为灰色至奶油色。对可疑菌落接种 EC 培养基,44.5℃ 培养(24±2) h,如产气则证实为耐热大肠菌群。前期研究发现,培养基、滤膜、培养温度等是影响检测结果的重要因素,另外培养湿度也会对菌落形态造成影响。因此,本研究重点探讨了培养基、滤膜、培养温度、培养湿度四个因素对耐热大肠杆菌检测结果的影响。

#### 1.3.2 酶底物法

鉴于《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)标准的发布实施,将改进后的滤膜法和酶底物进行了比对。将 100 mL 样品倒入无菌样品瓶,加入科立得试剂混匀,倒入 97 孔定量盘压平后封口,44.5℃ 培养(24±2) h,取出定量盘读数。显黄色的培养孔认定为耐热大肠菌群阳性,计数阳性培养孔数,查 MPN 表得检测值。

## 1.4 数据分析

数据采用 SPSS 19.0 软件进行显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 培养基优选

按照《生活饮用水标准检验方法 微生物指标》(GB/T 5750.12—2006)MFC 培养基成分表,配制培养基 A 并制成平板;购买北京某公司 MFC 成品培养基 B、青岛某公司 MFC 成品培养基 C,分别按照使用说明配制并制成平板。按照滤膜法标准检测步骤,取 100 mL 样品过滤,抽滤后分别贴在三种 MFC 培养基平板上,44.5℃ 培养(24±2) h,检测结果见表 1、2。

表 1 三种 MFC 培养基检测质控标样耐热大肠菌群值

Tab.1 Detection of heat-resistant coliform in quality control standard samples by three MFC culture media

CFU·100 mL<sup>-1</sup>

项目	培养基 A	培养基 B	培养基 C
质控标样一	22	33	24
质控标样二	17	26	21
注: 质控标样一,真值范围(34±7) CFU/100 mL,允差范围(6~184) CFU/100 mL;质控标样二,真值范围(28±5) CFU/100 mL,允差范围(8~162) CFU/100 mL。			

表 2 三种 MFC 培养基检测实际样品耐热大肠菌群值  
Tab. 2 Detection of heat-resistant coliform in actual  
samples by three MFC culture media

CFU · 100 mL <sup>-1</sup>				
项目	水样类型	培养基 A	培养基 B	培养基 C
样品 1	水源水	226	254	212
样品 2	水源水	395	540	485
样品 3	水源水	269	350	279
样品 4	水源水	118	165	145
样品 5	水源水	151	185	170
样品 6	水源水	68	80	85
样品 7	水源水	25	31	27
样品 8	出厂水	0	0	0

可见,质控样品的耐热大肠菌群检测值:培养基 B 检测值在真值范围内,培养基 A 和 C 检测值在允许范围内;大多数实际样品的耐热大肠菌群检测值:培养基 B > 培养基 C > 培养基 A。SPSS 软件配对样品 *T* 检验分析结果显示,使用培养基 A 和培养基 B、培养基 B 和培养基 C 检测结果均差异显著( $p < 0.05$ ),使用培养基 A 和培养基 C 检测结果无显著差异。研究者发现,选择合适的成品 MFC 培养基更适于耐热大肠菌群的生长繁殖,自制 MFC 培养基需调节 pH 值,造成批次间培养基属性存在差异(平行双样相对偏差易超过 30%)。钟宁<sup>[4]</sup>的研究也证实培养基质量将影响耐热大肠菌群检测结果的可靠性。后续试验中均采用培养基 B 进行检测。

2.2 培养湿度优化

研究者发现,培养环境的湿度影响耐热大肠菌群的生长。现行标准 GB/T 5750.12—2006 中耐热大肠菌群使用培养设备为培养箱,目前市售培养箱主要为电热培养箱和隔水式恒温培养箱两种类型,多数设备无法实现湿度按需设定。因此研究中选用了可设定湿度的人工气候箱与常用的隔水式恒温培养箱进行比对试验。

在人工气候箱预试验中,设定 20%、40%、60% 三个培养湿度,结果显示培养湿度为 20% 时,培养基易干裂,耐热大肠菌群菌落微小,为黑灰色非典型菌落,计数困难(见图 1);培养湿度为 40% 时,蓝色菌落,大小正常,便于计数;培养湿度为 60% 时,培养皿内易形成水汽且菌群聚集生长、难以形成单一菌落。因此,人工气候箱设置湿度条件为 40% 时最适合耐热大肠菌群的生长,后续根据此湿度条件开展试验。

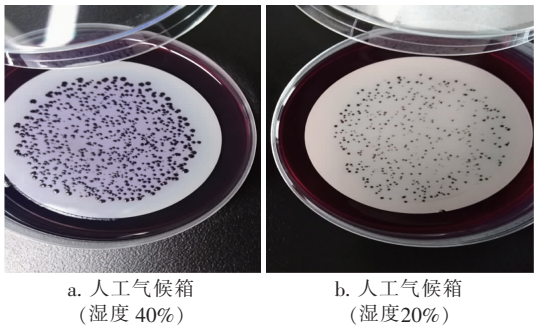


图 1 不同湿度下耐热大肠菌群菌落形态  
Fig. 1 Colony morphology of heat-resistant coliform under  
different humidity

按照 GB/T 5750.12—2006 中的滤膜法操作步骤,取质控样品或待测水样 100 mL,抽滤后贴在 MFC 培养基上,将平板分别倒置在隔水式恒温培养箱(设定温度 44.5 ℃、检测湿度 8% ~ 10%)和人工气候箱(设定温度 44.5 ℃、设定湿度 40%)内培养(24 ± 2) h。结果显示,适宜的湿度有利于耐热大肠菌群的生长,人工气候箱生长的菌落呈蓝色、形态大而饱满、易计数,使用隔水式恒温培养箱培养得到的菌落呈黑灰色、较小、易漏检。使用隔水式恒温培养箱质控样检测结果为 25、20 CFU/100 mL,在质控样允差范围内;使用人工气候箱质控样检测结果为 36、29 CFU/100 mL,在质控样真值范围内(所用质控样真值和允差范围与 2.1 节中均相同)。两种培养设备实际水样耐热大肠菌群检测结果无显著差异( $p > 0.05$ ,见表 3)。

表 3 不同培养设备对实际水样耐热大肠菌群的检测结果  
Tab. 3 Detection results of heat-resistant coliform in actual  
samples by two kinds of culture equipment

CFU · 100 mL <sup>-1</sup>			
项目	水样类型	人工气候箱	隔水式恒温培养箱
样品 1	水源水	436	316
样品 2	水源水	77	65
样品 3	水源水	35	29
样品 4	水源水	135	120
样品 5	水源水	324	218
样品 6	水源水	397	226
样品 7	出厂水	0	0

2.3 滤膜优选

采用一次性无菌滤膜(滤膜 1)和煮沸灭菌普通滤膜(滤膜 2)两种类型滤膜进行了质控样品测试,滤膜均为孔径 0.45 μm、直径 50 mm 的醋酸纤维素材质,44.5 ℃、湿度 40% 条件下,采用培养基 B 培养



(24 ± 2) h。结果见表 4,可见使用滤膜 1 检测结果在质控标样的真值范围内,使用滤膜 2 检测结果虽在质控标样允许范围内,但检测值偏离真值,相对误差分别为 45% 和 55%,可见一次性无菌滤膜更适用于耐热大肠菌群的检测。刘玉娥等<sup>[5]</sup>的研究也证实了滤膜性质和品牌对菌落总数测定结果的影响。

表 4 两种滤膜检测质控标样耐热大肠菌群值  
Tab. 4 Detection of heat-resistant coliform in quality control standard samples by two kinds of filter membranes  
CFU · 100 mL<sup>-1</sup>

项 目	一次性无菌滤膜 (滤膜 1)	普通滤膜 (滤膜 2)
质控标样平行 1	36	13
质控标样平行 2	40	9
注: 质控标样,真值范围(34 ± 7) CFU/100 mL,允差范围(6 ~ 184) CFU/100 mL。		

2.4 培养温度影响

培养箱温控效果是影响耐热大肠菌群生长的重要因素之一,GB/T 5750. 12—2006 中的滤膜法培养温度为(44. 5 ± 0. 5) °C,结合隔水式恒温培养箱实际温控能力,设置 43. 5、44. 0、44. 5、45. 0、45. 5 °C 五个培养温度进行比对试验。采用一次性无菌滤膜、培养基 B,按照 GB/T 5750. 12—2006 中的滤膜法操作步骤,依次取 100 mL 质控样品和水样,抽滤后贴在 MFC 培养基上,将平板分别倒置在温度设定为 43. 5、44. 0、44. 5、45. 0、45. 5 °C 的人工气候箱内(设置湿度 40%)培养(24 ± 2) h。结果见表 5、6。

表 5 五种温度下检测质控标样耐热大肠菌群值  
Tab. 5 Detection of heat-resistant coliform in quality control standard samples at five temperatures  
CFU · 100 mL<sup>-1</sup>

项目	43. 5 °C	44. 0 °C	44. 5 °C	45. 0 °C	45. 5 °C
质控标样平行 1	21	23	24	8	2
质控标样平行 2	20	22	23	7	2
质控标样平行 3	21	22	24	9	1
质控标样平均值	21	22	24	8	2
注: 质控标样,真值范围(26 ± 4) CFU/100 mL,允差范围(5 ~ 141) CFU/100 mL。					

可见,44. 0、44. 5 °C 两个温度点检测值在质控样真值范围内,而 43. 5、45. 0 °C 两个温度点检测值仅在质控样允许范围内,45. 5 °C 培养值明显低于允许范围。实际水样检测结果与质控样品类似,43. 5、44. 0、44. 5 °C 三个温度点的检测结果无显著性差异,而 45. 0、45. 5 °C 条件下的测试结果显著低

于其他三个温度点。可见,耐热大肠菌群的生长有严格的温度要求,过高的培养温度会抑制耐热大肠菌内代谢酶系统的活性,影响其菌落的繁殖。

表 6 五种温度下检测实际样品耐热大肠菌群值  
Tab. 6 Detection of heat-resistant coliform in actual samples at five temperatures CFU · 100 mL<sup>-1</sup>

样品 编号	水样 类型	43. 5 °C	44. 0 °C	44. 5 °C	45. 0 °C	45. 5 °C
样品 1	水源水	2	2	2	1	0
样品 2	水源水	13	14	15	6	2
样品 3	水源水	19	18	20	9	6
样品 4	水源水	53	50	51	33	28
样品 5	水源水	221	219	226	125	97
样品 6	水源水	147	145	151	65	43
样品 7	出厂水	0	0	0	0	0

2.5 方法优化效果

使用优化前、后方法对耐热大肠菌群质控样品和实际水样进行了测试。优化前方法:使用自制培养基 A、煮沸灭菌普通滤膜、隔水式恒温培养箱(温度 44. 5 °C、湿度 8% ~ 10%)培养;优化后方法:使用成品培养基 B、一次性无菌滤膜、人工气候箱(温度 44. 5 °C、湿度 40%)培养。

测试结果见表 7、8。

表 7 滤膜法和酶底物法检测质控标样耐热大肠菌群值  
Tab. 7 Detection of heat-resistant coliform in quality control standard samples by filtration membrane method and enzyme substrate method

项 目	优化前滤膜 法/(CFU · 100 mL <sup>-1</sup> )	优化后滤膜 法/(CFU · 100 mL <sup>-1</sup> )	酶底物法/ (MPN · 100 mL <sup>-1</sup> )
质控标样—平行 1	10	36	59. 1
质控标样—平行 2	8	40	65. 9
注: 质控标样,滤膜法真值范围(34 ± 7) CFU/100 mL,允差范围(6 ~ 184) CFU/100 mL;酶底物法真值范围(36 ± 7) MPN/100 mL,允差范围(11 ~ 208) MPN/100 mL。			

可见,优化后滤膜法检测结果在质控样品真值范围内,优化前滤膜法接近质控样允许范围下限值,检测结果明显偏低。酶底物法检测结果高于真值,在质控样允许范围内。实际水样的比对显示检测值:酶底物法 > 优化后滤膜法 > 优化前滤膜法,优化后滤膜法检测值明显提高。多项研究也证实了滤膜法和酶底物法在耐热大肠检测中的等效性<sup>[6-7]</sup>,但也有研究显示滤膜法检测中应激和损伤的菌群无法在选择性培养基上形成菌落,存在漏检可能<sup>[8]</sup>。

表8 滤膜法和酶底物法检测实际水样耐热大肠菌群值  
Tab.8 Detection of heat-resistant coliform in actual samples  
by filtration membrane method and enzyme substrate method

项目	水样类型	优化前滤膜法/(CFU · 100 mL <sup>-1</sup> )	优化后滤膜法/(CFU · 100 mL <sup>-1</sup> )	酶底物法/(MPN · 100 mL <sup>-1</sup> )
样品1	水源水	0	2	3.1
样品2	水源水	3	7	8.6
样品3	水源水	19	30	33.2
样品4	水源水	25	38	53.1
样品5	水源水	104	167	203.5
样品6	水源水	157	216	273.3
样品7	出厂水	0	0	0

### 3 结论

① 耐热大肠菌群生长对温度有严格要求,应选用计量部门校准合格的培养设备,以确保检测结果的准确性。

② 适宜的湿度有利于耐热大肠菌群的生长,宜使用湿度可控的培养箱进行检测。

③ 培养基质量影响耐热大肠菌群检测结果的可靠性,购买或自制 MFC 培养基需进行质量验证,满足试验要求方可使用。

④ 滤膜质量是影响耐热大肠菌群检测结果准确性的重要因素,可通过质控标样对滤膜进行质量验证,筛选符合试验要求的滤膜用于检测。

⑤ 采用通过验证的商品化培养基、一次性无菌滤膜、人工气候箱培养,在实控温度 44.5 ℃、培养湿度 40% 的优化条件下,滤膜法质控样检测结果在真值范围内。

### 参考文献:

- [1] 史建. 粪大肠菌群检测方法研究进展[J]. 河北化工, 2012, 35(7): 32-35, 49.  
SHI Jian. Research progress on detection methods of fecal coliform[J]. Hebei Chemical Industry, 2012, 35(7): 32-35, 49 (in Chinese).
- [2] 胥学鹏. 水中粪大肠菌群测定的滤膜法研究[J]. 环境监测, 2012(2): 53-55.  
XU Xuepeng. Determination of fecal coliform in water by membrane filtration method [J]. Environmental Monitoring, 2012(2): 53-55 (in Chinese).
- [3] 苏畅. 水中粪大肠菌群测定的滤膜法研究[J]. 北京农业, 2016(1): 190-191.  
SU Chang. Determination of fecal coliform in water by membrane filtration method[J]. Beijing Agriculture, 2016(1): 190-191 (in Chinese).
- [4] 钟宁. 检测耐热大肠菌群培养基的质量控制方法探讨[J]. 福建分析测试, 2012, 21(4): 54-56.  
ZHONG Ning. The discuss on quality control methods of culture medium for thermotolerant coliform bacteria [J]. Fujian Analysis & Testing, 2012, 21(4): 54-56 (in Chinese).
- [5] 刘玉娥, 高桂华, 陶墨奎, 等. 不同微孔滤膜对微菌落检测细菌总数的影响[J]. 现代预防医学, 2007, 34(2): 347-348.  
LIU Yu'e, GAO Guihua, TAO Mokui, et al. Effect of different microporous membranes on the total number of bacteria detected by microflora [J]. Modern Preventive Medicine, 2007, 34(2): 347-348 (in Chinese).
- [6] 彭玉献, 叶玉婵. 水中耐热大肠菌群检测方法——滤膜法和酶底物法比较[J]. 中国化工贸易, 2012(7): 161-162.  
PENG Yuxian, YE Yuchan. Comparison between detection method of membrane filtration method and defined substrate technology enzyme substrate technique in water thermotolerant coliform group bacteria detection [J]. China Chemical Trade, 2012(7): 161-162 (in Chinese).
- [7] 冯玫, 杨玮. 两种检测水中耐热大肠菌群方法的等效性比较[J]. 化学与生物工程, 2011, 28(9): 90-92.  
FENG Mei, YANG Wei. Equivalence comparison between two methods for detecting thermotolerant coliform group bacteria in water [J]. Chemistry & Bioengineering, 2011, 28(9): 90-92 (in Chinese).
- [8] 刘杨, 杨鹏. 饮用水中总大肠菌群监测方法的研究进展[J]. 临床军医杂志, 2013, 41(12): 1302-1304.  
LIU Yang, YANG Peng. Research progress on monitoring methods of total coliform in drinking water [J]. Clinical Journal of Medical Officers, 2013, 41(12): 1302-1304 (in Chinese).

**作者简介:** 逯南南 (1984 - ), 女, 山东潍坊人, 硕士, 高级工程师, 研究方向为饮用水微生物检测与生物毒性评估技术研究及应用, 在国内外期刊发表论文 20 余篇。

**E-mail:** nanwang316@163.com

**收稿日期:** 2021-02-19

**修回日期:** 2021-03-15

(编辑: 孔红春)