

分析与监测

## 酶底物法与平皿计数法测定水中菌落总数的比较

刘玉红, 景二丹, 胡兴利, 俞蕴芳, 张荣, 张泾凯  
(苏州工业园区清源华衍水务有限公司, 江苏 苏州 215000)

**摘要:** 利用酶底物法(SimPlate法)和平皿计数法测定水中菌落总数,对比两种方法的样品处理过程、检测数据的读取以及标准样品和实际水样检测数据的精密度和准确度。结果表明,酶底物法(SimPlate法)样品处理用时约30 min,细菌菌落在紫外灯下清晰、均匀,标准样品的测得结果在允许误差范围内,相对误差为6.5%,相对标准偏差为1.1%,方法浓度范围为1~738 CFU/mL;平皿计数法样品处理用时>2 h,细菌菌落在菌落计数器下大小不同、分布不均,标准样品的测得结果在允许误差范围内,相对误差为2.8%,相对标准偏差为7.8%,方法浓度范围为30~300 CFU/mL。使用以上两种方法测定标准样品,二者的检测结果相关性显著;测定源水时,二者的检测结果无差异。

**关键词:** 菌落总数; 平皿计数法; 酶底物法

**中图分类号:** TU991 **文献标识码:** C **文章编号:** 1000-4602(2017)02-0111-04

## Comparison of SimPlate Method and Plate Count Method for Determination of Total Bacteria Counts

LIU Yu-hong, JING Er-dan, HU Xing-li, YU Yun-fang, ZHANG Rong, ZHANG Jing-kai  
(Suzhou Industrial Park Qingyuan Huayan Water Co. Ltd., Suzhou 215000, China)

**Abstract:** The enzyme substrate method (SimPlate method) and plate count method were used to determine total bacteria counts in water, and the two methods were compared in terms of sample treatment process, the detection data reading, as well as the data precision and accuracy of the reference sample and the actual water sample. The results indicated that the sample treatment by SimPlate method took about 30 min in treatment of samples, and the bacterial colonies were clear and uniform under the UV lamp. The results of standard samples were in the allowable range, with the accuracy of 6.5%, the relative standard deviation of 1.1% and concentration measurement range of 1 to 738 CFU/mL. The plate count method took more than 2 h in treatment of samples, bacterial colonies were different in size and distribution in the colony counter, the results of standard samples were in the allowable range, with the accuracy of 2.8%, the relative standard deviation of 7.8% and concentration measurement range of 30 to 300 CFU/mL. The correlation between the above two methods was significant when determining standard samples. There were no differences between the two methods in the detection results of water samples.

**Key words:** total bacteria counts; plate count method; enzyme substrate method

现行生活饮用水标准检验方法 GB/T 5750 规定:水样中菌落总数测定即测定1 mL水样在普通营

养琼脂培养基中和有氧条件下,经37℃培养48 h所生长的细菌菌落的总数<sup>[1,2]</sup>。检测水中菌落总数

的常用方法为经典平皿计数法,这种方法实验技术较成熟、准确度高,但操作繁琐、主观性大,需要试验人员有很强的专业技术和丰富的经验。近年来出现了一种测定菌落总数的新方法——酶底物法(SimPlate法),该方法操作方便、快速、干扰少、计数范围广。

本研究通过对比两种方法的样品处理过程、检测数据的读取,以及测定标准样品和实际水样检测结果的精密度和准确度,为两种方法的应用提供依据。

## 1 试验材料与方法

### 1.1 试验材料

Simplate 圆盘(爱德士公司),移液管(1 mL, 10 mL, 已灭菌),紫外灯,无菌瓶(100 mL, 爱德士公司),隔水式恒温培养箱(上海恒科),酒精灯,一次性平皿(直径为9 cm, 已灭菌),J-2 菌落计数器, SQ510C 压力式蒸汽灭菌器,琼脂分装瓶,无菌锥形瓶,纯水器, pH 计, 无菌水(爱德士公司, 100 mL/包装), IDEXX 复合酶底物技术<sup>TM</sup>酶(MET<sup>TM</sup>)(爱德士公司),商品性营养琼脂,氯化钠(分析纯)。

菌落总数标准样品为爱德士公司生产,真值为162 CFU/mL,允许的测量范围为70~253 CFU/mL(编号 Lot#061914,有效期2016年2月)。水样为南方某水厂源水和出厂水。

### 1.2 试验方法

平皿计数法:将由商品性营养琼脂和无菌生理盐水制作的试验琼脂灭菌消毒放冷待用。取1 mL 样品滴入平皿中,加入约15 mL 冷却的营养琼脂,摇动平皿使液体混合均匀,待琼脂凝固后,将样品平皿置于37℃隔水式恒温培养箱恒温培养48 h。培养完成后用菌落计数器数出样品的菌落个数,即为菌落总数。

酶底物法(SimPlate法):在爱德士 Simplate 圆盘中加入1 mL 样品和9 mL IDEXX 复合酶底物技术<sup>TM</sup>酶(MET<sup>TM</sup>),混合均匀,置入37℃恒温培养箱中培养48 h。培养完毕后将样品圆盘在黑暗处用365 nm 波长紫外灯照射,细菌菌落会产生荧光。根据荧光个数对照 MPN 表(菌群最大近似数)查出菌落的总数。

## 2 结果与讨论

### 2.1 样品处理

图1为酶底物法操作流程。其中的无菌水和

MET<sup>TM</sup>酶均由厂家提供,密封包装,每个水样使用一个包装的无菌水和一个包装的 MET<sup>TM</sup>酶。制作样品时将二者混匀。实验过程耗时约30 min。一个包装的无菌水和一个包装的 MET<sup>TM</sup>酶可以测量菌落总数范围为1~738 CFU/mL 的水样。

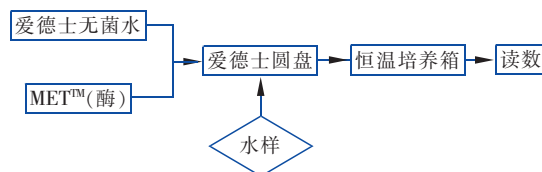


图1 酶底物法操作流程

Fig. 1 Enzyme substrate operation process

图2为平皿计数法操作流程。首先需要制作试验琼脂,试验琼脂需现用现配,灭菌后冷却至44.6℃左右待用。1 mL 水样需用大约15 mL 试验琼脂浇灌样品平皿。

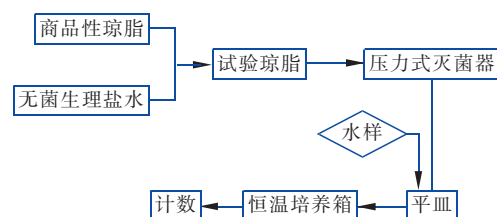


图2 平皿计数法操作流程

Fig. 2 Plate counting operation process

浇灌平皿时,需要较准确地控制试验琼脂的量约为15 mL。如果浇灌的试验琼脂量过少,样品平皿上琼脂稀薄,37℃恒温培养时细菌所需要的营养物质少,细菌不易生长,测量结果会偏低;如果浇灌的试验琼脂量过多,样品平皿中琼脂太厚,37℃恒温培养时细菌生长旺盛,菌落成糊状或片状,在菌落计数器下无法读数,必须重新测量水样,影响结果的及时性。根据《生活饮用水标准检验方法 微生物指标》(GB/T 5750.12—2006),平皿计数法对水样有一定的浓度适用范围:当水样菌落总数值低于30 CFU/mL时,使用平皿计数法测量应增加实验水样量,当水样菌落总数值高于300 CFU/mL时,应按1:10或1:100或1:1000比例稀释测定其菌落总数。

平皿计数法样品处理过程经历2次高压灭菌, pH 值调节,琼脂从121℃到44.6℃的冷却和大约15 mL 试验琼脂的浇灌,处理过程繁琐,耗时>2 h;因样品中菌落总数浓度未知,测量实际样品时可能

需要制作增加实验水量的样品和稀释不同倍数的样品,更增加了样品处理难度和时间。实验过程中使用器皿较多,需要避免器皿的污染而导致样品和琼脂的重新配制。

可以看出,酶底物法的样品处理简单、方便、快捷,大约 30 min 完成试验;无需配制琼脂,避免了配制过程中污染的可能性。平皿计数法需要现用现配试验琼脂,掌握好试验琼脂的浇灌量;不在 30 ~ 300 CFU/mL 浓度范围的样品需要重新制作(增加样品量或稀释水样);样品处理繁琐,耗时 > 2 h,操作过程中要避免器皿的污染而导致样品和琼脂的重新配制。

## 2.2 实验数据的读取

图 3 为紫外灯下的酶底物法样品圆盘(已培养 48 h),蓝色为细菌菌落。可见,菌落的荧光数清晰、均匀,能快速准确地读出个数。图 4 为经培养 48 h 后的样品平皿在菌落计数器下的状态,白色的点或斑块为细菌菌落。可见,菌落大小不一,分布不均,有较多的白斑。成斑状的菌落可能是多个白点聚集在一起而形成的,并不能确定白点的个数,计数时受检测人员的主观影响大;所以要获得准确的样品分析结果需要检测人员有较高的专业技术水平和丰富的经验。



图 3 紫外灯下圆盘状态(酶底物法)

Fig. 3 Disc under UV lamp (enzyme substrate method)

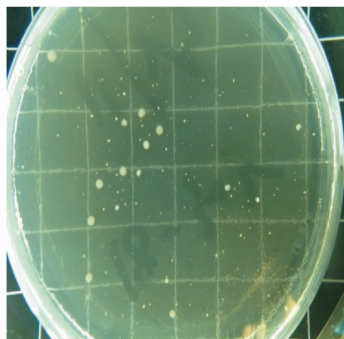


图 4 菌落计数器下平皿状态(平皿计数法)

Fig. 4 Plate state under colony counter (plate count method)

## 2.3 试验结果

### 2.3.1 标准样品的测定

分别用两种方法将标准样品(真值为 162 CFU/mL,允许的测量范围为 70 ~ 253 CFU/mL)进行处理后培养测定,每种方法制作 6 个平行样,测量结果如图 5、6 所示。

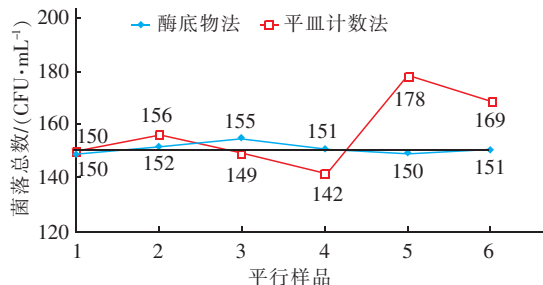


图 5 酶底物法和平皿计数法测量结果

Fig. 5 Measurement results of enzyme substrate method and plate count method

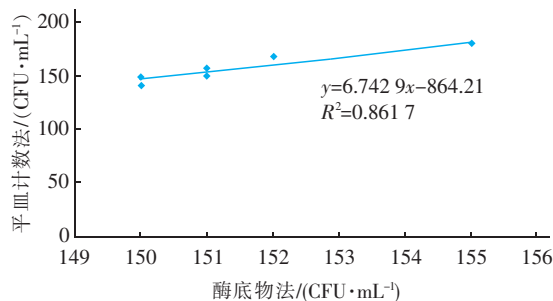


图 6 酶底物法和平皿计数法相关性分析

Fig. 6 Relationship between enzyme substrate method and plate count method

由图 5 可知,酶底物法测定结果范围为 150 ~ 155 CFU/mL,平均值为 151 CFU/mL,相对误差为 6.5%,相对标准偏差为 1.1%;平皿计数法测定结果范围为 142 ~ 178 CFU/mL,平均值为 157 CFU/mL,相对误差为 2.8%,相对标准偏差为 7.8%。两种方法的测定值均在标准样品 70 ~ 253 CFU/mL 的允许范围内。酶底物法 6 个平行样的测定数据波动不大,相对偏差较小,平皿计数法数据波动较大,数据分散。图 6 是将酶底物法和平皿计数法的测定结果做线性回归分析,二者相关性显著( $R^2 = 0.8617$ ,  $p < 0.01$ ),结果具有可比性,线性回归方程为:平皿计数法测定值 =  $6.7429 \times$  酶底物法测定值 - 864.21。

### 2.3.2 水样的测定

将两种方法同时应用于检测南方某水厂源水、



出厂水的菌落总数,连续测定5天。酶底物法测出源水中菌落总数分别为328、382、349、379、361 CFU/mL,平均值为360 CFU/mL,相对标准偏差为6.2%。水样经1:10稀释后平皿计数法测得数据分别为320、375、359、391、347 CFU/mL,平均值为358 CFU/mL,相对标准偏差为7.6%。两者数据相差不大;出厂水中均未检测出菌落总数,空白试验为未检出。结果表明,对于南方某水厂源水,酶底物法检测操作简便,检测结果准确及时;平皿计数法需要稀释样品,操作繁琐。

### 3 结论

比较了酶底物法和平皿计数法测定水样菌落总数的样品处理、测量数据的读取、计数范围、测量准确度和精密度,结果表明,酶底物法使用密封并完整包装的试剂包,无需配制无菌生理盐水、琼脂,样品处理简单、快速,样品培养完成后用时30 min即可得到检测结果。酶底物法浓度范围为1~738 CFU/mL,对真值为162 CFU/mL(允许的测量范围为70~253 CFU/mL)的标准样品,测量结果为150~155 CFU/mL,平均值为151 CFU/mL,相对误差为6.5%,相对标准偏差为1.1%,结果可信。平皿计数法需要现用现配试验琼脂,制作样品平皿时要掌握好试验琼脂的浇灌量,不在30~300 CFU/mL浓度范围的样品需要重新制作(增加样品量或稀释水样),样品处理繁琐,耗时>2 h,操作过程中要避免器皿的污染而导致样品和琼脂的重新配制。对真值为162 CFU/mL(允许的测量范围为70~253 CFU/mL)的标准样品,测量结果为142~178 CFU/mL,平

均值为157 CFU/mL,相对误差为2.8%,相对标准偏差为7.8%,结果可信。对两种方法的测定结果做线性回归分析,二者相关性显著( $R^2 = 0.8617$ ,  $p < 0.01$ )。对南方某水厂源水和出厂水的测量,平皿计数法的源水水样稀释10倍,两种方法检测结果无差异。在自来水厂每日菌落总数检测中,两种方法均适用;当水样菌落总数浓度较高或者需要频繁检测水样时,酶底物法比平皿计数法更有优势。

### 参考文献:

- [1] 张勇兵. 影响水样菌落总数的多因素研究[J]. 实用预防医学, 2008, 15(3): 887-888.
- [2] GB/T 5750.12—2006, 生活饮用水标准检验方法 微生物指标[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.



作者简介:刘玉红(1977—),女,湖北公安人,硕士,工程师,主要从事自来水处理技术研究。

E-mail: liuyh@sz-hkcw.com

收稿日期:2016-07-06

建设节水型社会,促进经济增长方式转变