

样本稀释度对粪大肠菌群数量检测结果影响的分析

陈 思

(辽宁万益职业卫生技术咨询有限公司, 辽宁 沈阳 110000)

摘 要 在采用多管发酵法进行水质粪大肠菌群检测时, 如遇样品中菌群数偏高, 需要进行稀释处理, 在未知菌群大致数量的情况下, 并不能确定稀释度是否合适, 而过低或过高的稀释度都可能造成检测结果偏差, 因此有必要分析研究稀释度对检测结果的影响, 以便于更准确地进行检测实验, 矫正检测结果。本文通过对比不同稀释度的样本检测, 分析稀释倍数对粪大肠菌群检测结果的影响, 旨在为相关研究者提供参考。

关键词 粪大肠菌群; 稀释度; 多管发酵法

中图分类号: X17

文献标识码: A

文章编号: 1007-0745(2023)07-0061-03

粪大肠菌群是大肠菌群中的一种, 是生长于人和其他温血动物肠道中的一种肠道细菌, 可随粪便排出体外, 故称为粪大肠菌群。多管发酵法是目前应用最广泛且能有效检测粪大肠菌群的常用方法, 但在进行实际检测时经常遇到样品中粪大肠菌群数偏高的情况, 需要对样品进行稀释处理, 由于检测前无法判断水样中粪大肠菌群的大致数量, 若出现稀释不到位或稀释过头情况, 都无法准确检测出样品中粪大肠菌群的数量。因此, 本文采取对比法, 对粪大肠菌群含量高的水样进行不同倍数的稀释处理, 通过对比检测结果, 分析不同稀释度对检测结果产生的影响。^[1]

1 检测标准

HJ347.2-2018《水质 粪大肠菌群的测定 多管发酵法》, 本文涉及的检测实验是采用标准中规定的 15 管法进行, 检出限为 20MPN/L。

2 样品制备

1. 自制样本: 由实验室自行配置阳性 (大肠埃希氏菌) 样本, 分别为 $30\sim 3.0 \times 10^2$ MPN/L、 $3.0 \times 10^2\sim 3.0 \times 10^3$ MPN/L、 $3.0 \times 10^3\sim 3.0 \times 10^4$ MPN/L 和 $3.0 \times 10^4\sim 3.0 \times 10^5$ MPN/L 浓度的菌悬液, 编号依次为 A1~A4。

2. 采集样本: 采集 3 个不同地点的地表水样品, 分别为某中医院总院废水、某中医院东院区废水以及某发动机研究所废水, 编号依次为 B1~B3。

3 检测实验 (15 管法)

3.1 样品稀释与接种

当样品接种量小于 1mL 时, 应将样品制成稀释样品后使用。吸取 10mL 充分混匀的样品, 注入盛有 90mL

无菌水的三角烧瓶中, 混匀成 1:10 稀释样品; 吸取 1:10 稀释样品 10mL 充分混匀的样品, 注入盛有 90mL 无菌水的三角烧瓶中, 混匀成 1:100 稀释样品。其他接种量的稀释样品以此类推, 直到适宜稀释倍数。^[2]

3.2 发酵实验

稀释接种后的试管进行初发酵, 在 $37^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 下培养 $24\text{h} \pm 2\text{h}$ 。将产酸产气的阳性管进行复发酵实验, 用经火焰灼烧灭菌并冷却后的接种环将培养物分别接种到装有 EC 培养基的试管中, 在 $44.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 下培养 $24\text{h} \pm 2\text{h}$ 。培养后观察导管中产气证实为粪大肠菌群阳性。记录产气阳性管数, 查询标准中 15 管法最大可能数 (MPN) 表进行计算。

3.3 空白实验

每次实验都要用无菌水代替样品按步骤 3.1~3.2 进行空白测定。

3.4 阳性及阴性对照实验

将粪大肠菌群的阳性菌株 (大肠埃希氏菌) 和阴性菌株 (产气肠杆菌) 制成浓度 $30\sim 300$ MPN/L 的菌悬液, 分别取相应体积的菌悬液接种于试管中, 然后按初发酵实验和复发酵实验要求培养, 记录实验结果。

4 检测结果

4.1 自制样本检测结果

对实验室自制的四个浓度的样本进行多个稀释度的实验, 同时进行空白对照和阴阳性对照实验, 具体检测结果见表 1。

4.2 采集样本检测结果

本实验对来自 3 个不同地点的样品 (B1~B3) 分别

表1 A1~A3号样本粪大肠菌群检测结果

样品编号	稀释倍数	初发酵阳性管数			复发酵阳性管数			检测结果 (MPN/L)
		10mL	1mL	0.1mL	10mL	1mL	0.1mL	
空白对照	-	0	0	0	-	-	-	<20
阴性对照	-	0	0	0	-	-	-	<20
阳性对照	-	3	1	1	3	1	1	1.4×10^2
A1-0	-	3	2	1	3	2	1	1.7×10^2
A1-1	10	2	1	0	2	1	0	7.0×10^2
A1-2	10^2	1	0	0	1	0	0	2.0×10^3
A2-0	-	4	4	2	4	4	2	4.7×10^2
A2-1	10	4	2	2	4	2	2	3.2×10^3
A2-2	10^2	2	0	0	2	0	0	5.0×10^3
A3-0	-	5	5	4	5	5	4	1.6×10^4
A3-1	10	5	4	4	5	4	4	3.5×10^4
A3-2	10^2	4	4	0	1	0	0	2.0×10^4
A3-3	10^3	4	0	0	4	0	0	1.3×10^5
A4-0	-	5	5	5	5	5	5	$\geq 2.4 \times 10^4$
A4-1	10	5	5	4	5	5	4	1.6×10^5
A4-2	10^2	5	4	4	5	4	4	3.5×10^5
A4-3	10^3	4	4	1	4	4	1	4.0×10^5
A4-4	10^4	4	1	0	4	1	0	1.7×10^6
A4-5	10^5	1	0	0	1	0	0	2.0×10^6

进行多个不同稀释度的试验，同时进行空白对照和阴性阳性对照实验，具体检测结果见表2。

5 结果分析

通过对比自制样本和采集样本粪大肠菌群检测结果，可以得出以下结论：

1. 对照实验检测结果分析：空白对照实验检测结果为 <20MPN/L，说明样品在采集和运输过程中没有受到污染，检测结果真实有效；阴性对照实验检测结果为 <20MPN/L 未检出情况，阳性检测结果为检出情况，说明实验室制备的培养基可以有效对粪大肠菌群进行检测，检测结果真实有效。

2. 自制样本检测结果分析：样本 A1 为实验室自行配置的 $30 \sim 3.0 \times 10^2$ MPN/L 浓度的菌悬液，观察检测结果不稀释的检测结果为 1.7×10^2 MPN/L，在所配置的菌悬液浓度可能范围之内，当进行 10 倍和 100 倍稀释时，检测结果为 7.0×10^2 MPN/L 和 2.0×10^3 MPN/L，已经远

远超出所配置的菌悬液浓度可能范围，并且可以看出，随着稀释倍数的增加，检测结果偏离真实菌悬液粪大肠菌群浓度越大；样本 A2 和 A3 同样具备和样本 A1 的检测特点；样本 A4 为实验室自行配置的 $3.0 \times 10^4 \sim 3.0 \times 10^5$ MPN/L 浓度的菌悬液，不进行稀释的检测结果为 $\geq 2.4 \times 10^4$ MPN/L，仅能代表该样本粪大肠菌群浓度超过 2.4×10^4 MPN/L，当进一步进行 10 倍稀释时检测结果为 1.6×10^5 MPN/L，满足所配置的菌悬液浓度可能范围，说明当 15 管全部检出时，检测结果同样不是准确的，仅能代表该样本的浓度范围，仍需要进一步稀释。同样的进行 100 倍和 1000 倍和 10000 倍稀释的样本检测结果远远超出所配置菌悬液可能浓度范围，结果不具备真实性。因此可以看出，当样本粪大肠菌群浓度不高不用进行稀释时，该检测结果最准确，当稀释倍数逐渐增加时，检测结果也逐渐增加并偏离真实数据，当样本粪大肠菌群数含量偏高，不进行稀释时，

表 2 B1 ~ B3 号样本粪大肠菌群检测结果

样品编号	稀释倍数	初发酵阳性管数			复发酵阳性管数			检测结果 (MPN/L)
		10mL	1mL	0.1mL	10mL	1mL	0.1mL	
空白对照	-	0	0	0	-	-	-	<20
阴性对照	-	0	0	0	-	-	-	<20
阳性对照	-	4	1	1	4	1	1	2.1×10^2
B1-0	-	5	5	5	5	5	5	$\geq 2.4 \times 10^4$
B1-1	10	5	5	3	5	5	3	9.2×10^4
B1-2	10^2	5	3	1	5	3	1	1.1×10^5
B1-3	10^3	3	1	0	3	1	0	1.1×10^5
B1-4	10^4	1	0	0	1	0	0	2.0×10^5
B2-0	-	5	5	4	5	5	4	1.6×10^4
B2-1	10	5	4	1	5	4	1	1.7×10^4
B2-2	10^2	4	1	0	4	1	0	1.7×10^4
B2-3	10^3	1	0	0	1	0	0	2.0×10^4
B3-0	-	5	5	5	5	5	5	$\geq 2.4 \times 10^4$
B3-1	10	5	5	2	5	5	2	5.4×10^4
B3-2	10^2	5	2	1	5	2	1	7.0×10^4
B3-3	10^3	2	1	0	2	1	0	7.0×10^4
B3-4	10^4	1	1	0	2	1	0	2.0×10^5

15 管全部检出时, 该稀释度检测结果不具备真实性, 仅能代表一个浓度范围, 当进一步稀释时, 检测结果与 A1~A3 具备相同的规律, 即稀释倍数越小越接近真实数据。^[3]

3. 采集样本结果分析: 样本 B1~B3 为未知粪大肠菌群浓度的废水样本, 从检测结果来看, 当样本粪大肠菌群数偏高时, 检测结果同样仅能代表一个范围, 当进一步稀释时, 检测结果随着稀释倍数的增加而增加, 说明根据自制样本得出的结论同样有效, 因此应用自制样本所得出的结论, 稀释倍数越小越接近真实数据, 那么样本 B1~B3 的粪大肠菌群浓度应分别为: 9.2×10^4 MPN/L、 1.6×10^4 MPN/L 和 5.4×10^4 MPN/L。^[4-5]

6 结论

本文通过自制样本和采集样本的对比实验, 分析了不同稀释倍数对粪大肠菌群检测结果的影响, 结果表明当样本粪大肠菌群含量偏高时 15 管全部检出, 该检测结果偏低, 不能够反映样品真实粪大肠菌群含量, 仅能代表该样本粪大肠菌群数含量的一个大致范

围。进一步对样品进行稀释时, 稀释倍数越小, 检测结果越准确。期望通过本文的分析研究, 可以为方法 (HJ347.2-2018) 的实际操作过程提供一定的参考, 以便于更好地进行检测实验, 矫正检测结果, 提高样品分析的准确性和真实性。

参考文献:

- [1] 生态环境部. 水质粪大肠菌群的测定多管发酵法 (HJ 347.2-2018)[S]. 2019-06-01.
- [2] 黎尧, 张绍斌. 多管发酵法测定水质粪大肠菌群的探讨 [J]. 环境与发展, 2019, 31(05):116, 118.
- [3] 张贵刚, 黄博珠. 粪大肠菌群多管发酵法不确定度的评定 [J]. 资源节约与环保, 2018(08):37, 48.
- [4] 庄小玲. 多管发酵法测定水质粪大肠菌群应注意的问题 [J]. 低碳世界, 2020, 10(12):19-20.
- [5] 李永. 多管发酵法测定污水中粪大肠菌群结果不确定度的评定 [J]. 广东化工, 2013, 40(21):146-147.