

孙杰. EasyDisc 法与传统平皿计数法检测水中菌落总数的比较[J]. 净水技术, 2022, 41(3): 167-172.

SUN J. Comparison between EasyDisc method and conventional plate count for detection of total bacteria count in water[J]. Water Purification Technology, 2022, 41(3): 167-172.



扫我试试?

EasyDisc 法与传统平皿计数法检测水中菌落总数的比较

孙 杰

(上海城市水资源开发利用国家工程中心有限公司, 上海 200082)

摘 要 采用 EasyDisc 法与平皿计数法对水中菌落总数进行检测。通过检测质控样品及质控稀释样品, 计算其检测结果与真值的相对误差及相对误差的标准偏差, 结果表明: EasyDisc 法相对误差更小, 更接近于真值, 结果更为准确; 两种方法相对误差的标准偏差为 $SD(\text{平皿计数法}) = 5.84\%$, $SD(\text{EasyDisc 法}) = 3.66\%$, EasyDisc 法与真值相对误差的标准偏差更小, 其连续检测的稳定性优于平皿计数法; 通过检测管网水和二次供水, 并对两种方法检测结果进行统计学分析, 发现两种方法具有相关性, 且在统计学上无显著性差异。与平皿计数法相比, EasyDisc 法测定水中菌落总数具有准确度高、稳定性好、操作简便等优势, 满足了实验室对水中菌落总数的检测要求。

关键词 EasyDisc 法 平皿计数法 菌落总数 管网水样 二次供水

中图分类号: X832 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-0177(2022)03-0167-06

DOI: 10.15890/j.cnki.jsjs.2022.03.024

Comparison between EasyDisc Method and Conventional Plate Count for Detection of Total Bacteria Count in Water

SUN Jie

(Shanghai National Engineering Research Center of Urban Water Resources Co., Ltd., Shanghai 200082, China)

Abstract Total number of bacteria in water was detected by EasyDisc method and plate counting method. By testing quality control samples and quality control diluted samples, the relative error of truth value and standard deviation of relative error between test result were calculated. Results showed that the relative error of EasyDisc method was smaller, closer to true value, and result was more accurate. Relative error standard deviation of the two methods was $SD(\text{plate counting method}) = 5.84\%$, $SD(\text{EasyDisc method}) = 3.66\%$, and relative error standard deviation of EasyDisc method was smaller, indicating that the continuous detection stability of method was better than plate counting method. Furthermore, pipe network water and secondary supply water samples were detected, and the detection results of these two methods were statistically analyzed. It was found that two methods were correlated, and there was no statistically significant difference. Compared with plate counting method, EasyDisc method had the advantages of high accuracy, good stability and simple operation, which met the requirements of laboratory for detection of total number of bacteria in water.

Keywords EasyDisc method plate count method total bacteria count pipelines network water sample secondary water supply

水中菌落总数作为常规微生物检测项目之一, 可以及时反映水体受微生物污染的程度。目前, 国内检测标准大多以传统平皿计数法作为水中菌落总数的主要检测方法。但随着细菌种类的

不断更新, 传统平皿计数法并不适用于检测厌氧菌、嗜中温及对繁殖所需营养有特殊要求的细菌^[1]; 在试验过程中因操作步骤复杂易引入污染; 试验结果判定困难易造成较大的人为误差, 对试验技术人员和检测环境要求极高, 部分实验室难以达到。因此, 不能满足实验室应急样品及大批量样品的检测需求。与传统平皿计数法相比, EasyDisc 法具有操作简便、外来污染及人为误差

[收稿日期] 2021-12-24

[基金项目] 上海供排水系统病原微生物检测能力建设与供水系统病原微生物风险特征研究(20dz1200801)

[作者简介] 孙杰(1987—), 男, 硕士, 主要从事微生物检测工作, E-mail: sunjie3330@163.com。

小、无菌环境要求低等优点,且大量试验数据证实 EasyDisc 法与传统平皿计数法在检测水中菌落总数结果上无明显差异。因此,该方法可以广泛应用于水中菌落总数的检测。相较于 2002 年美国环保署(EPA)批准使用酶底物法(SimPlate 法)检测饮用水以及地表水中的菌落总数,传统的平皿计数法已 30 余年未更新。2013 年广东省中山市供水有限公司最早将 SimPlate 法写入广东省地方标准(DB44/T 1163—2013)^[2]。2019 年张颖^[3]等采用定量盘法(HPC for quanti-tray)检测水中菌落总数,该方法在原理上与 SimPlate 法类似,与传统平皿计数法的检测结果相比也没有显著差异,但其检测时需要 100 mL 样品,且要使用封口机和紫外灯等辅助设备,操作相对繁琐。

EasyDisc 法于 2021 年研发成功,是一种新型的水中菌落总数检测方法,目前在国内外还处于试用阶段。其基本原理是在 EasyDisc 平皿底部添加有显色底物的脱水 PCA 培养基,微生物在该培养基上生长代谢时所产生的酶会促进相应显色底物反应生成蓝色物质,便于计数,降低了结果判定的人为误差。与传统平皿计数法相比,该方法无需配制培养基,检测过程简便,每个样品前处理耗时不足 1 min,显著降低了外来污染和人为误差,提高了检测结果的准确性及稳定性,适用于应急样品及大批量样品的检测需求。

本文采用传统平皿计数法和新型检测技术 EasyDisc 法两种检测方法对 NSI 定量质控样品和上海地区实际水样进行检测,并比较分析两种方法的检测结果^[4-5]。

1 试验部分

1.1 试验试剂及设备

EasyDisc 平皿、HPC 定量质控样品(NSI 200317)、无菌 PBS 缓冲液、无菌取样瓶等耗材由 IDEXX 公司提供。营养琼脂培养基购自北京陆桥技术股份有限公司;试验使用国产隔水式恒温培养箱,温控精度为 ± 0.5 °C,经计量部门校准合格。

1.2 试验步骤

1.2.1 水样采集

管网水水样取自上海某地区的管网监测点,二次供水水样为上海居民的龙头水。参照《生活饮用

水标准检验方法 水样的采集与保存》(GB/T 5750.2—2006),选取一次性无菌采样瓶(含硫代硫酸钠)作为采样容器,并在 4 h 内对采集水样进行检测^[6-8]。

1.2.2 质控样品制备

将 NSI 定量质控样品从 -10 °C 冰箱取出,在室温下平衡 10~15 min 后,转移至 100 mL 无菌 PBS 缓冲液中,水平振荡摇匀,待 NSI 定量质控样品完全溶解后,30 min 内进行检测。

1.2.3 质控稀释样品制备

将质控样品充分混匀后,取 10 mL 质控样品转移至 100 mL 无菌取样瓶中,用无菌水稀释至刻度线,配制成稀释 10 倍的质控稀释样品溶液。

1.2.4 平皿计数法测定水中菌落总数方法

平皿计数法测定水中菌落总数参照《生活饮用水标准检验方法 微生物指标》(GB/T 5750.12—2006)^[8]。

1.2.5 EasyDisc 法测定水中菌落总数方法

量取 1 mL 待测样品加入 EasyDisc 平皿,充分摇匀,使样品均匀分布于整个平皿,在室温下静置 20 min 后正置放入 (36 ± 1) °C 培养箱中培养 (48 ± 3) h 后统计分析菌落总数结果。

2 结果分析

2.1 质控样品检测结果分析

分别以平皿计数法和 EasyDisc 法平行检测同一定量质控样品 15 次,其检测结果表明两种方法的检测结果均在质控样品结果可接受范围内。为进一步评价两种方法检测结果的准确性,计算检测结果与真值的相对误差,如表 1、图 1 所示。EasyDisc 法检测结果与真值的相对误差更小,更接近于真值,准确度更高;计算两种方法相对误差的标准偏差可得 $SD(\text{平皿计数法}) = 5.84\%$, $SD(\text{EasyDisc 法}) = 3.66\%$ 。综上,EasyDisc 法检测结果与真值相对误差的标准偏差更小,表明其与真值的相对误差离散程度较小,性能更加稳定。

2.2 质控稀释样品检测结果分析

为验证两种方法在低浓度样品检测中的准确性和稳定性,分别以平皿计数法和 EasyDisc 法平行检测同一稀释 10 倍的定量质控样品 15 次,其检测结果如表 2、图 2 所示。结果表明:平皿计数法合格率

表 1 两种方法检测质控样品的结果

Tab. 1 Detection Results of QC Samples by Both Methods

样品名称	平皿计数法 检测结果/ (CFU·mL ⁻¹)	相对 误差	EasyDisc 法 检测结果/ (CFU·mL ⁻¹)	相对 误差
1	224	1%	215	-3%
2	221	0	223	1%
3	194	-12%	226	2%
4	218	-1%	218	-1%
5	203	-8%	203	-8%
6	223	1%	233	5%
7	206	-7%	223	1%
8	220	0	216	-2%
9	182	-18%	227	3%
10	203	-8%	226	2%
11	203	-8%	210	-5%
12	223	1%	224	1%
13	194	-12%	212	-4%
14	200	-10%	211	-5%
15	207	-6%	224	1%

注:平皿法真值为(221±9) CFU/mL,可接受值为 179~263 CFU/mL

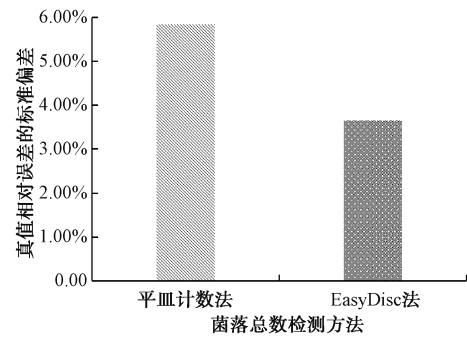


图 1 两种方法检测结果真值的相对误差的标准偏差

Fig. 1 Standard Deviation of Relative Error between Test Samples and True Values by Both Methods

为 80%, EasyDisc 法合格率为 100%; EasyDisc 法检测结果与真值的相对误差更小,更接近于真值,准确度更高;两种方法检测结果与真值相对误差的标准偏差为 $SD(\text{平皿计数法}) = 14.31\%$, $SD(\text{EasyDisc 法}) = 9.28\%$ 。综上, EasyDisc 法检测低浓度样品的准确性更高,性能更稳定。

2.3 实际样品检测结果分析

选取上海地区 30 组管网水样品及 50 组二次供水样品,分别以平皿计数法和 EasyDisc 法检测选取

表 2 两种方法检测质控稀释样品的结果

Tab. 2 Detection Results of QC Dilution Samples by Both Methods

样品名称	平皿计数法检测 结果/(CFU·mL ⁻¹)	检测结果真实值 /(CFU·mL ⁻¹)	相对误差	EasyDisc 法检测 结果/(CFU·mL ⁻¹)	检测结果真实值 /(CFU·mL ⁻¹)	相对误差
1	22	220	0	22	220	0
2	18	180	-19%	19	190	-14%
3	26	260	18%	19	190	-14%
4	25	250	13%	21	210	-5%
5	21	210	-5%	23	230	4%
6	23	230	4%	21	210	-5%
7	20	200	-10%	19	190	-14%
8	22	220	0	22	220	0
9	17	170	-23%	19	190	-14%
10	22	220	0	19	190	-14%
11	17	170	-23%	23	230	4%
12	17	170	-23%	18	180	-19%
13	26	260	18%	25	250	13%
14	18	180	-19%	23	230	4%
15	21	210	-5%	21	210	-5%

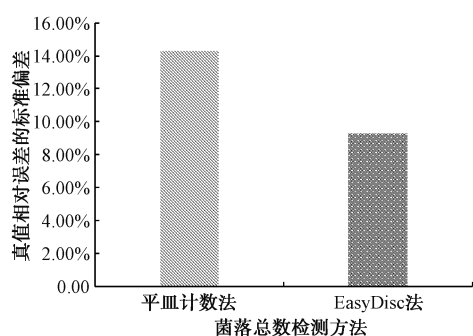


图2 两种方法检测结果真值的相对误差的标准偏差
Fig. 2 Standard Deviation of Relative Error between Test Samples and True Values by Both Method

的 80 组实际样品,其检测结果如表 3 所示。为探究两种方法在实际样品检测中的相关性,根据检测数据绘制折线图,如图 3 所示。结果表明:两种方法的检测结果趋势基本相同,具有很强的相关性。

为进一步探究两种方法在检测实际样品时是否存在差异性,以及使检测结果呈正态分布,将运用 SPSS Statistics 软件对平皿计数法和 EasyDisc 法的检测结果,作对数处理后进行 t 检验分析,结果如表 4 所示。平皿计数法与 EasyDisc 法的泊松相关系数为 0.894,属极强相关性; t 检验 $P=0.325 (>0.05)$,说明两种检测方法的检测结果无显著差异,具有高

表 3 两种方法检测实际样品的结果

Tab. 3 Detection Results of Practical Samples by Both Methods

样品序号	样品名称	平皿计数法 检测结果/ (CFU·mL ⁻¹)	EasyDisc 法 检测结果/ (CFU·mL ⁻¹)	样品序号	样品名称	平皿计数法 检测结果/ (CFU·mL ⁻¹)	EasyDisc 法 检测结果/ (CFU·mL ⁻¹)
1	管网水 1	14	17	41	二次供水 11	175	158
2	管网水 2	1	3	42	二次供水 12	8	11
3	管网水 3	17	17	43	二次供水 13	1	1
4	管网水 4	2	3	44	二次供水 14	8	6
5	管网水 5	110	125	45	二次供水 15	15	11
6	管网水 6	6	5	46	二次供水 16	4	5
7	管网水 7	5	8	47	二次供水 17	11	10
8	管网水 8	16	16	48	二次供水 18	10	8
9	管网水 9	5	2	49	二次供水 19	2	4
10	管网水 10	0	0	50	二次供水 20	19	4
11	管网水 11	3	3	51	二次供水 21	78	82
12	管网水 12	1	1	52	二次供水 22	270	272
13	管网水 13	2	4	53	二次供水 23	225	248
14	管网水 14	0	0	54	二次供水 24	261	226
15	管网水 15	2	2	55	二次供水 25	31	30
16	管网水 16	2	2	56	二次供水 26	246	201
17	管网水 17	7	3	57	二次供水 27	293	258
18	管网水 18	2	1	58	二次供水 28	234	184
19	管网水 19	1	0	59	二次供水 29	178	162
20	管网水 20	6	5	60	二次供水 30	4	4
21	管网水 21	1	2	61	二次供水 31	0	5
22	管网水 22	1	2	62	二次供水 32	1	2
23	管网水 23	3	0	63	二次供水 33	3	5
24	管网水 24	0	1	64	二次供水 34	5	6
25	管网水 25	2	1	65	二次供水 35	2	5

(续表3)

样品序号	样品名称	平皿计数法 检测结果/ (CFU·mL ⁻¹)	EasyDisc 法 检测结果/ (CFU·mL ⁻¹)	样品序号	样品名称	平皿计数法 检测结果/ (CFU·mL ⁻¹)	EasyDisc 法 检测结果/ (CFU·mL ⁻¹)
26	管网水 26	24	35	66	二次供水 36	6	10
27	管网水 27	73	74	67	二次供水 37	1	10
28	管网水 28	1	1	68	二次供水 38	3	6
29	管网水 29	23	25	69	二次供水 39	13	24
30	管网水 30	4	3	70	二次供水 40	0	6
31	二次供水 1	2	1	71	二次供水 41	0	0
32	二次供水 2	8	8	72	二次供水 42	0	0
33	二次供水 3	6	1	73	二次供水 43	1	2
34	二次供水 4	9	10	74	二次供水 44	2	4
35	二次供水 5	1	4	75	二次供水 45	5	17
36	二次供水 6	8	11	76	二次供水 46	2	5
37	二次供水 7	14	12	77	二次供水 47	119	130
38	二次供水 8	4	6	78	二次供水 48	5	1
39	二次供水 9	2	8	79	二次供水 49	5	2
40	二次供水 10	76	47	80	二次供水 50	262	194

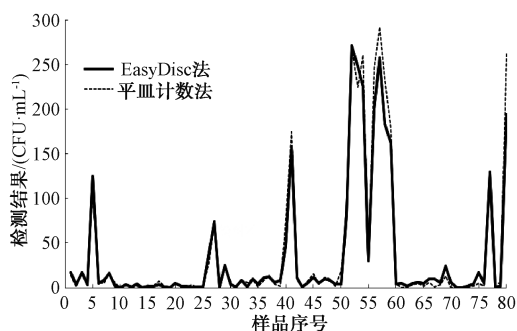


图3 两种方法检测实际样品的结果

Fig. 3 Detection Results of Practical Samples by Both Methods

度一致性。可认为平皿计数法、EasyDisc 法均可有效检测水中菌落总数。

3 讨论

3.1 质控样品检测

平皿计数法和 EasyDisc 法对 HPC 定量质控样品检测结果的真值相对误差绝对值的平均值分别为 6.27% 和 3.02%。EasyDisc 法检测 HPC 定量质控结果的真值相对误差相较于平皿计数法的真值相对误差更小,表明 EasyDisc 法的检测结果更接近真值,准确度更高。与真值相对误差的标准偏差的计

表4 两种方法对实际样品检测结果的 t 检验

Tab. 4 t-Test of Results of Practical Sample by Both Methods

检测方法	均值	标准偏差	样品数据	泊松相关系数	自由度	t	P
平皿计数法-EasyDisc 法	0.361 2	0.326 22	80	0.894	79	0.990	0.325

算结果表明,EasyDisc 法与真值相对误差的标准偏差更小,其检测结果与真值的相对误差离散程度较小,性能更加稳定。

3.2 质控稀释样品检测

平皿计数法和 EasyDisc 法对稀释 10 倍的低浓度 HPC 定量指控样品检测结果的真值相对误差绝

对值的平均值分别为 11.98% 和 8.86%;平皿计数法和 EasyDisc 法的检测合格率分别为 80% 和 100%。EasyDisc 法检测 HPC 稀释 10 倍的低浓度定量质控结果的真值相对误差相较于平皿计数法的真值相对误差更小、合格率更高,表明在低浓度的情况下 EasyDisc 法的检测结果准确度仍优于平皿计

数法。

3.3 实际样品检测

对管网水和二次供水等实际样品,平皿计数法和 EasyDisc 法的检测结果泊松相关系数为 0.893,属极强相关性, t 检验 P 为 0.325 (>0.05),表明两种方法检测数据在统计学意义上无显著差异,均可检测水中菌落总数。

3.4 EasyDisc 法优势

EasyDisc 法于 2021 年研发成功,是一种新型的水中菌落总数检测方法,对传统平皿计数法进行了显著革新,相较于传统的 90 mm 平皿,其 47 mm 的平皿既能减少废弃物处理的成本又能增加实验室检测量。其 PCA 培养基已脱水固定于平皿底部,省去传统方法中配置培养基的过程,节省大量时间的同时减少了配置培养基带来的污染。EasyDisc 法产品的 1 年保质期,在优化实验室管理流程的同时,也降低了相应耗材的浪费。在 PCA 培养基中添加显色底物,与微生物生长代谢所产生的酶相互反应形成蓝色菌落,配合白色底部及网格线更加便于观察,降低人为计数误差。同时,通过大量数据分析水中菌落总数检测干扰菌种,添加杂菌生长抑制剂,使 PCA 培养基对检测环境要求大幅降低。与传统平皿计数法相比,EasyDisc 法测定质控样品及质控稀释样品时,准确度及稳定性均优于传统的平皿计数法;测定实际样品时,其检测结果与平皿计数法无显著差异,但因 EasyDisc 法无需制备培养基,操作更加简便,对无菌环境及检测人员技术无明显要求等优势,更适用于大批量样品及应急突发样品的检测。

4 结论

(1)平皿计数法测定水中菌落总数,配制培养基操作繁琐,要求严格;使用高温灭菌设备需相应资格证;试验结果读数人为误差大。因此,平皿计数法不能满足实验室应急样品及大批量样品检测的需求。EasyDisc 法无需配制培养基,每个样品前处理耗时不足 1 min,检测过程简便,显著降低了外来污染和人为误差,且在实际样品检测中可以发现其检

测结果与平皿计数法无明显差异。

(2)采用 EasyDisc 法测定水中菌落总数,具有操作更加简便、人为误差少、计数便捷、对试验技术人员及试验环境要求低等优势,其质控样品与真值相对误差的标准偏差为 3.66%,低于平皿计数法的 5.84%,质控稀释样品的合格率为 100%,高于平皿计数法的 80%,表明其检测结果的准确性及稳定性均优于传统的平皿计数法,可以满足实验室对水中菌落总数的检测要求。同时,该方法在应急突发样品现场检测方面也有很大的应用前景。

(3)鉴于 EasyDisc 法测定水中菌落总数操作简便、结果准确、实验室检测环境要求及采购设备成本低,更适用于中小型实验室在大批量样品及应急突发样品的检测,在未来必将成为一种发展趋势。

参考文献

- [1] 武利平,丁理,孙宗科. 水中菌落总数检测方法的等效性判定[J]. 环境与健康杂志, 2017,34(3): 246-248.
- [2] 刘红霞,路孝梅. 酶底物法和国标法测定饮用水中菌落总数的比较[J]. 福建分析测试, 2017,26(4): 60-62.
- [3] 张颖,高杰. 新型检测方法定量盘法与传统平皿计数法检测水中菌落总数的比较[J]. 净水技术,2019,38(6): 17-20.
- [4] JACKSON R W, OSBORNE K, BARNES G, et al. Multiregional evaluation of the SimPlate heterotrophic plate count method compared to the standard plate count agar pour plate method in water [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2000, 66(1):453-454.
- [5] VULINDIU M, CHARLETT A, SURMAN S, et al. Comparison of agar-based methods for the isolation and enumeration of heterotrophic bacteria with the new multidose IDEXX SimPlate method [J]. Water Science & Technology, 2004, 50(1):277-280.
- [6] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. 生活饮用水标准检验方法 水样的采集与保存: GB/T 5750.2—2006[S]. 北京:中国标准出版社,2007.
- [7] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 4版. 北京:中国环境科学出版社,2002.
- [8] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. 生活饮用水标准检验方法 微生物指标: GB/T 5750.12—2006[S]. 北京:中国标准出版社,2007.