

城镇水系统全流程水质监测技术专栏

郑亦舟. 生活饮用水中细菌总数检测的方法比较与应用[J]. 净水技术, 2022, 41(5):150-154.

ZHENG Y Z. Comparison and application of methods for detecting total bacteria in drinking water[J]. Water Purification Technology, 2022, 41(5):150-154.



扫我试试?

生活饮用水中细菌总数检测的方法比较与应用

郑亦舟

(上海浦东威立雅自来水有限公司, 上海 200127)

摘要 自《生活饮用水卫生标准》(GB 5749—2006)实施以来,市场上涌现出各种针对生活饮用水样品的细菌总数检测方法。文中选取了检测中常见的营养琼脂异养菌平板计数(HPC)检测方法、R2A HPC 检测方法、复合酶底物检测方法和 ATP 生物荧光检测方法,分别对标准物质样品和上海浦东某水厂样品进行了对比检测。结果表明,除 ATP 生物荧光法外,其余 3 种方法的检测结果均在标准物质样品真值的 3 倍标准偏差可接受范围内。培养法中 HPC 涂布检测方法对生活饮用水中微生物指标的检测灵敏性更高,但检测周期较长、人员和环境要求严格,在实际市场应用时需根据检测需求配套使用其他检测方法。而 ATP 生物荧光检测方法检测效率很高,平均单个样品检测时间为 5 min,操作简单、环境要求较低,结果可以间接反映水中微生物含量,适用于时效性要求较高的检测任务。酶底物法可用于移动实验室等无法很好保证环境在无菌情况下的检测场景。

关键词 生活饮用水 细菌总数 异养菌平板计数(HPC) ATP 生物荧光检测 酶底物法检测

中图分类号: TU991.2;X832 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-0177(2022)05-0150-05

DOI: 10.15890/j.cnki.jsjs.2022.05.023

Comparison and Application of Methods for Detecting Total Bacteria in Drinking Water

ZHENG Yizhou

(Shanghai Pudong Veolia Water Co., Ltd., Shanghai 200127, China)

Abstract Since the implementation of *Standards for Drinking Water Quality* (GB 5749—2006), various total bacteria testing methods for drinking water samples have emerged on market. This article selected common nutrient agar heterotrophic plate count (HPC) detection method, R2A HPC detection method, enzyme substrate technique and ATP biofluorescence detection method that were common in detection market. It was compared with a sample from a water plant in Pudong, Shanghai. Results showed that, except for ATP biofluorescence method, detection results of other three methods were all within the acceptable range of 3 times the standard deviation of the true value of standard material sample. In the culture method, HPC coating detection method was more sensitive to the detection of microbial indicators in drinking water, but it had a long detection cycle and strict personnel and environmental requirements. In actual market applications, other detection methods must be used according to detection requirements. ATP biofluorescence detection method had a high detection efficiency. Average detection time for a single sample was 5 minutes. It was easy to operate and environmental requirements were low. Results can indirectly reflect microbial content in water, which was suitable for detection tasks with high timeliness requirements. Enzyme substrate technique can be used for testing tasks in mobile laboratories where

[收稿日期] 2021-12-03

[基金项目] 上海市科技攻关项目(19DZ1204400)

[作者简介] 郑亦舟(1995—),男,助理工程师,主要从事生活饮用水生物安全性及微生物检测技术研究, E-mail: zhengyz@ pudongwater.com。

the sterility of environment cannot be guaranteed.

Keywords drinking water total number of bacteria heterotrophic plate count (HPC) ATP biofluorescence detection enzyme substrate technique

近年来,随着人们生活品质的不断提高,对高品质饮用水的需求也愈加迫切,而饮用水中生物安全性指标是保证饮用水品质的重要一环。2018年1月4日,上海市政府发布的《上海市城市总体规划(2017—2035年)》提出“提高入户水质,满足直饮需求”。相应供给端的检测市场对于生活饮用水中微生物指标检测方法的研究也随着需求提升不断开展,各种产品化的检测试剂盒也是层出不穷。其中,供水企业常用的水中细菌总数检测方法有异养菌平板计数法(heterotrophic plate count, HPC)、酶底物法以及ATP生物荧光检测法。《生活饮用水卫生标准》(GB 5749—2006)中生活饮用水的菌落总数限值规定为 <100 CFU/mL。通过样品在营养琼脂上有氧条件培养,对所得水样中含菌落的数量进行计数,以反映水中微生物的生长情况。由于培养温度高、培养时间相对短,营养琼脂HPC方法具有一定局限性,很多报道中会用R2A HPC检测异养菌数量来代替营养琼脂HPC检测样品中的微生物水平,通过一种低营养含量的培养基(R2A培养基),配合较低的培养温度和延长的培养时间,以获得更加适用于生活饮用水中微生物实际水平的检测结果^[1-3]。

酶底物法(defined substrate technology, DST)在生活饮用水的检测中多被研究应用于总大肠菌群和嗜肺军团菌的检测,其灵敏度更高、操作流程简单,具有很好的应用前景^[4-5]。该方法通过选择性培养基来对产生某种酶的细菌群组进行检测。但在细菌总数的检测中应用较少,理论上它可以通过选择性培养基分解色原底物从而释放色原体,使培养基呈现颜色变化,通过计数变色的孔径数量来检测水中的细菌总数。因此,酶底物法在生活饮用水细菌总数检测中的应用及其与培养法的对比是值得研究的课题。

三磷酸腺苷(ATP)生物发光法检测:ATP是细菌、藻类、植物和动物细胞等所有生命形式的主要能量载体,测量样品中ATP的浓度可以获得微生物浓度和其健康状况的关键数据。20世纪70年代中期该技术逐渐形成并产生,ATP可以存在于活性微生物细胞内(cATP,胞内ATP)和游离在细胞以外

(dATP、胞外ATP),通过使用照度计来测量ATP和萤光素酶催化反应的发光强度(RLU)来进行样品中ATP浓度的定量分析。目前,已有研究表明微生物浓度和ATP含量之间存在相互关系,可以通过ATP浓度的测定来反映细菌浓度的实际情况^[6]。将ATP生物荧光法用于生活饮用水中细菌总数的检测须通过膜过滤富集,同时适当添加缓冲剂、荧光剂等^[7],其应用场景和检测过程的便捷性是检测市场十分关注的问题。

本文从水质检测实验室细菌总数检测方法应用的角度,通过4种生活饮用水细菌总数检测方法分别对标准物质样品、水源水样品及出厂水样品进行对比检测,以探究各检测方法所适用的检测场景,以期对高品质饮用水的保障手段进行探讨。

1 材料与方法

采集上海浦东某水厂出厂水样品和水源水样品,采购IDEXX菌落总数质控样品(产品编号:HPCQC,批号:200820),采用营养琼脂培养基(PCA)、R2A培养基、ATP试剂盒以及IDEXX SimPlate复合酶底物来对样品进行检测。

使用121℃下灭菌20min的玻璃细菌瓶,预先加入少量摩尔浓度为0.001 mol/L的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 中和出厂水中的余氯。秉持无菌操作的原则对采样龙头进行消毒后,采集水源水样和出厂水样。质控样品按照标准样品说明书制备。

1.1 培养基的成分

PCA:蛋白胨10g、牛肉膏3g、氯化钠5g、琼脂10~20g、蒸馏水1000mL。pH值控制在7.4~7.6,在103.43 kPa(121℃,20min)下灭菌后,分装待用。

R2A培养基:酵母浸出粉0.5g、蛋白胨0.5g、酪蛋白水解物0.5g、葡萄糖0.5g、可溶性淀粉0.5g、磷酸氢二钾0.3g、无水硫酸镁0.024g、丙酮酸钠0.3g、琼脂15.0g。pH值控制在7.4~7.6,在103.43 kPa(121℃,20min)下灭菌后,分装待用。

1.2 检测方法的选择

菌落总数的检测:按照《生活饮用水标准检验

方法微生物指标》(GB/T 5750.12—2006) 1.1 节平皿计数法的检验步骤,将水样在营养琼脂上有氧条件 37 °C 培养 48 h 后,测量所得 1 mL 水样所含菌落的总数。

异养菌计数法的检测:分别用平板倾注法和平板涂布法将水样在 R2A 培养基上有氧条件(25 °C) 培养 7 d 后,测量所得 1 mL 水样所含异养菌菌落的总数。

酶底物法的检测:将水样加入 SimPlate 培养基,混匀后加入 SimPlate 定量盘使之装满所有的孔槽;倒置培养定量盘在 (36±1) °C 培养 48 h;于紫外灯下读取荧光的孔格,对照 MPN 表读取检测结果。

ATP 生物荧光法的检测:将 50 mL 水样经过富集后的过滤器萃取液放入测试管,加入试剂盒配套的荧光素酶试剂,再加入稀释液后旋转摇匀并在 10 s 内读数;该结果减去空白值后记为样品中 ATP 发光强度,从而用于 ATP 的定量分析。

2 结果与讨论

2.1 微生物培养法对不同来源样品的检测结果

基于菌落培养原理对生活饮用水中的生物稳定性进行评价的 3 种方法分别是营养琼脂 HPC 检测方法、R2A HPC 倾注检测方法、R2A HPC 涂布检测方法。表 1 罗列了应用这 3 种培养方法对同一标准物质样品、水源水样品及出厂水样品检测的结果。其中,出厂水样品为生活饮用水检测实验室中常见的低浓度样品,标准物质样品的细菌总数控制在 10² CFU/mL 数量级代表中等浓度样品,水源水样品为生活饮用水检测实验室中常见的高浓度样品。首先,对于已知浓度的标准质控样品,3 种方法的检测结果都在其真值的 2 倍标准偏差可接受范围内,都能较好地反映水样中异养菌含量。其次,3 种检测方法对中低高这 3 个浓度梯度样品的检测结果呈现一致性的大小排序,HPC 涂布法检测结果略高于 HPC 倾注法检测结果,HPC 倾注法检测结果略高于平皿计数法,但基本在同一数量级上。造成该结果的原因可能是 HPC 倾注法与 HPC 涂布法取样量的差异,倾注法的取样量是涂布法的 10 倍,因此,检测结果为乘以差异的倍数来计数最终的报告结果,其中无法排除取样量的不同而造成的结果影响。另外,温度在 45 °C 左右的培养基在倾注的过程中会将

某些好氧菌灭活或者会被覆盖在培养基的中间区域,在培养过程中无法生长为菌落参与结果计数,造成结果偏低。

表 1 培养法检测各样品结果

Tab. 1 Results of Each Sample Tested by Culture Method

检测方法	标准物质样品	水源水样品	出厂水样品
平皿计数法/(CFU·mL ⁻¹)	101	680	1
HPC 倾注法/(CFU·mL ⁻¹)	127	1 112	5
HPC 涂布法/(CFU·mL ⁻¹)	160	1 900	10

注:表中的数值皆为用培养法平行测定 3 次所取的平均值,且相对标准偏差(RSD)均小于 5%

平皿计数法与 HPC 计数法相比,培养基、培养时间和培养温度均不同。HPC 计数法通过低营养含量配合更长的培养时间和较低的温度,使其生长的环境更接近生活饮用水,从而能够对饮用水中的一些受抑制的耐氯菌、假单胞菌等有更好的检出限和灵敏性^[8]。因此,平皿计数法在较高温度和较短时间条件下,培养产生的菌落数低于 HPC 计数法贫营养培养基在低温和长时间下培养的菌落数。对于生活饮用水样品而言,菌落数较少,HPC 计数法具有更高的灵敏度,更能反映水样中真实的生物稳定性变化。

综合 3 种培养方法的检测结果,R2A HPC 涂布法在 25 °C 下,培养 7 d,所得的 1 mL 样品所含的菌落总数结果具有更高的灵敏度,能够更真实地反映水样中的微生物生长情况。

2.2 酶底物法对不同来源样品的检测结果

实际应用酶底物法检测生活饮用水中细菌总数的最大难点,在于其检测原理与结果计数方法和培养法完全不同而导致最后结果的表示方式不同,酶底物法的计数结果以统计学概念中最大可能数(MPN/mL)来表示,而培养法的计数结果以菌落形成数(CFU/mL)来表示。基于检测原理的限制,两类方法的检测结果不能完全等同比较。对不同来源样品的检测结果如表 2 所示,对于已知浓度的标准质控样品,酶底物法的检测结果能够落在其真值的 3 倍标准偏差可接受范围内,能够定量地反映水样中异养菌数量。对于水源水和出厂水样品,虽然计数结果表示方式不同,但其检测结果都能够和培养法在同一数量级上,最大可能数的取值整体高于

菌落生成数的数量。在实际检测市场中,由于生活饮用水国家标准的微生物指标限值由 CFU/mL 来计数,在一定程度上限制了酶底物法在部分市场中的应用。不过该方法有其显著的优势和适用场景,将会在下文进一步讨论。

表 2 酶底物法检测各样品结果

Tab. 2 Result of Each Sample Detected by Enzyme Substrate Method

检测方法	标准物质样品	水源水样品	出厂水样品
酶底物法/(MPN·mL ⁻¹)	250	4 760	<2

注:表中的数值皆为用培养法平行测定 3 次所取的平均值,且相对标准偏差(RSD)均小于 5%

2.3 ATP 检测法对不同来源样品的检测结果

应用 ATP 生物荧光法对不同来源样品的检测结果如表 3 所示,该方法通过使用照度计来测量 ATP 和萤光素酶催化反应产生的 RLU,因此,所得的定量值为荧光发光的强度,间接定量计算出生活饮用水中每毫升样品 ATP 的含量。而本文中第二代 ATP 检测方法在检测生活饮用水时的富集和过滤阶段将 <0.45 μm 的游离 ATP 或溶解 ATP 去除在过滤器之外,因此,由过滤器萃取液中检测所得的 ATP 含量是 cATP,更能反映生活饮用水内的微生物含量。此法的检测结果表示与酶底物法有同样的应用难点问题,由于检测原理的限制所得结果与培养法和酶底物法所得的检测只能趋势性和相关性上找到一些联系,从而进行快速的判断与分析。以文中生活饮用水样品中标准物质样品的检测结果来看,ATP 生物荧光检测法与营养琼脂 HPC 检测法之间的关系式为 $y = 12.30x^2 - 130.11x + 247.58$,相关性判定系数 R^2 为 0.821 8,具有一定的相关性。ATP 生物荧光检测法与培养法之间的结果相关性研究也是国内外细菌总数检测应用研究的热点^[9]。国内生活饮用水检测的多数标准和限值是以菌落总数平皿计数法的结果作为基准来衡量生活饮用水的生物安全性,但是该方法存在明显的滞后性,对于生活饮用水这样无时无刻在被使用及流动的物质而言,ATP 生物荧光法此类有着较短检测时间和简易操作过程的检测方法也有一定的市场需求,有其得天独厚的检测优势。

表 3 ATP 生物荧光法检测各样品结果

Tab. 3 ATP Method Test Results of Each Sample

检测方法	标准物质样品	水源水样品	出厂水样品
ATP 生物荧光法/(pg ATP·mL ⁻¹)	1.46	21.67	0.31

注:表中的数值皆为用培养法平行测定 3 次所取的平均值,且相对标准偏差(RSD)均小于 5%

2.4 各检测方法检测过程比较与适用场景讨论

各检测方法检测过程的比较结果如表 4 所示。在方法依据上营养琼脂 HPC 检测法是国内主流的检测生活饮用水中微生物指标的方法,其他的 3 种检测方法的使用范围有限,数据量积累不多,但都有其比较明显的优势。酶底物法与 ATP 生物荧光法在人员要求和环境要求上只需简单的培训后在现场或户外场地即可进行试验操作,省去了人员培训的周期和场地的限制,大大增加了细菌总数检测的机动性和应急性。除此之外,ATP 生物荧光法的检测时间可以控制在 5 min 之内出具结果,检测仪器较小、携带方便。但是其检测成本耗材价格较高,单次检测成本为培养法的数十倍,且无法将 ATP 的来源加以区分,也不能识别微生物的种类。有时样品或 ATP 提取剂等来源的某些离子会对 ATP 的测定造成干扰和抑制发光作用,其灵敏度仍不能满足某些样品的直接检测要求。因此,在检测低浓度微生物时,检测结果不够准确^[9],产生假阳性的可能性较大^[10],需结合其他技术辅助检测进一步验证。而对于浓度较高的样品,例如水源水样品,其检测结果中 ATP 含量可能有一部分是源于其他微生物甚至是动物或植物细胞,这时造成检测结果偏高的值是不可忽略不计的,这也是 ATP 检测结果会与实际样品中存在的细菌真值出现较大误差的重要原因之一。目前水质应急事件保障过程中,可行的方案是同步采集水样,采用菌落总数平皿计数法和 ATP 生物荧光法检测,先根据 ATP 生物荧光法检测结果进行一些时效性高的应急处理措施。随后水样的微生物指标达标与否需参考菌落总数平皿计数法的结果与国家标准进行符合性判定。而酶底物法可能应用的场景是移动实验室等无法很好地保证环境无菌的情况下对生活饮用水中微生物含量的检测,能够尽可能避免环境污染,保证检测结果的有效性。

表 4 各检测方法检测过程比较

Tab. 4 Comparison of the Detecting Process of Each Detection Method

项目	营养琼脂 HPC 检测法	R2A HPC 检测法	酶底物法	ATP 生物荧光法
方法依据	《生活饮用水标准检验方法微生物指标》(GB/T 5750.12—2006)	<i>Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater</i> 9215 Heterotrophic Plate Count	广东省地方标准《水中菌落总数复合酶底物检测方法》(DB 44/T 1163—2013)	第二代 ATP 测试盒说明书
人员要求	需全程无菌操作,具有一定的细菌总数检测和结果判读的经验	需全程无菌操作,具有丰富的细菌总数检测和结果判读的经验	简单的培训后即可操作	简单的培训后即可操作
检测成本	低	低	中	高
检测时间	48 h	7 d	45~72 h	5 min
环境要求	无菌室	无菌室	户外及现场	户外及现场

3 结论

通过应用不同检测方法分别对标准物质样品和上海浦东某水厂样品进行微生物指标的检测,ATP 生物荧光检测方法检测效率最高,平均单个样品检测时间为 5 min,且操作简单,适用于水质应急事件等时效性要求较高的突发事件的现场处理。在实际市场应用时,根据不同水质检测需求可配套使用多种其他检测方法。培养法中 R2A HPC 涂布检测方法对生活饮用水中微生物指标的检测灵敏性更高,但检测周期较长、人员和环境要求严格,在实际市场应用时需根据检测需求配套使用其他检测方法。酶底物法可用于移动实验室等无法很好地保证环境无菌情况下的细菌总数检测。

参考文献

- [1] 白晓慧,吴汉靓,王海亮,等. 饮用水中异养菌平板计数检测方法的比较[J]. 净水技术, 2007(5):65-67.
[2] 沈朕,刘宗涵,王晓芳. 三种自来水中微生物检测方法比较

[J]. 供水技术, 2021,15(2):23-26.

- [3] 杨雪英,俞学才,谢金林. 管网水中菌落总数检测方法的探讨[J]. 当代化工研究, 2017(12):46-47.
[4] 高艳,李啸,段杉,等. 酶底物法与过滤培养法检测非饮用水中嗜肺军团菌的比较[J]. 净水技术, 2020,39(8):8-12.
[5] 孙杰. 3种总大肠菌群和大肠埃希氏菌酶底物法检测试剂性能比较[J]. 净水技术, 2020,39(10):13-19.
[6] 林小峰,吴玉萍,陈学军,等. ATP 检测方法研究进展[J]. 中国农学通报, 2013,29(36):33-38.
[7] 冉强三,康建伟,冯萃敏,等. 荧光检测技术在水质检测中的应用[J]. 应用化工, 2020,49(7):1780-1785.
[8] 龙智云,杨家轩,杨晓航,等. 饮用水水质生物稳定性评价方法研究进展[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2017,49(2):182-188.
[9] 尹子波,侯玉柱,尹建军,等. ATP 生物发光技术在微生物检测中的应用[J]. 食品研究与开发, 2012,33(2):228-232.
[10] VANG Ó K, CORFITZEN C B, SMITH C, et al. Evaluation of ATP measurements to detect microbial ingress by wastewater and surface water in drinking water[J]. Water Research, 2014,48:309-320. DOI:10.1016/j.watres.2014.07.015.

水厂视界

郑州航空港区高品质现代化水厂

郑州航空港第二水厂设计规模为 80 万 m³/d,一期供水规模为 20 万 m³/d,于 2015 年 9 月开工建设,2017 年 8 月建成通水,以打造“安全、智慧、绿色、环保”的发展理念,采用“南水北调水+黄河水”的双水源保障手段;设置以超滤膜处理工艺为核心的全工艺处理流程;充分运用自动化、信息化、物联网等先进技术,以达成生产运营全过程自动化及生产现场无人值守的目标。保障了机场、园博园、安置区等港区重要项目用水,进一步完善了港区供水体系,实现了港区双水厂供水保障。

(供稿单位:郑州航空港水务发展有限公司)



扫描二维码阅读全文