

滤膜法测定水中粪大肠菌群方法验证

李海帆

商洛水文水资源勘测中心，陕西商洛，726000；

摘要：粪大肠菌主要来自人和动物粪便，是判断水体污染状况的重要指标之一，因此，在水质检测中，粪大肠菌群可判断水体的污染程度，有助于及时发现和治理相关水体污染的传播。目前，测定粪水中大肠菌群的方法有多管发酵法、滤膜法、酶底物法。本文试验，采用滤膜法测定水中的粪大肠菌群，并对影响滤膜法的实验条件进行了验证，旨在为相关检测人员在工作中选择合适的检测方法提供参考。

关键词：滤膜法；粪大肠菌群；方法验证；水质

DOI：10.69979/3041-0673.25.07.094

1 概述

粪大肠菌群（Fecal coliforms）作为耐热性微生物，其典型特征是在44.5℃条件下仍保持代谢活性，能够通过乳糖发酵作用产生酸性物质和气体。该菌群属于需氧及兼性厌氧的革兰氏阴性菌，且不形成芽孢。粪大肠菌群作为粪便污染的核心指示菌，其超标不仅反映环境卫生问题，更直接关联多重危害。①、健康威胁：疾病传播与公共卫生风险，会导致消化道疾病、系统性感染等健康问题；②、食品安全危机：从农田到餐桌的污染链，会导致农产品污染、水产养殖污染、土壤污染。③生态破坏：水体与土壤系统的连锁反应，会导致水体耗氧量增加、藻类爆发、微生物失衡；④、耐药性扩散：隐形公共卫生危机，会导致耐药菌富集、医疗负担加重、治疗成本上升、死亡率攀升；⑤、社会经济影响：治理成本与生产力损失，会导致污水处理成本上升、农产品出口受限、旅游业受到影响。作为人畜粪便的主要指示微生物，检测水体中粪大肠菌群浓度可直接反映粪便污染程度，为水质评估提供重要依据，以便指导污染物的防治工作。

2 方法内容

2.1 方法原理

本方法基于膜过滤技术，具体操作流程如下：（1）过滤阶段：将待测水样通过0.45 μm微孔滤膜进行过滤，微生物被有效截留在膜表面；（2）培养阶段：将载菌滤膜转移至含胆盐三号的MFC选择性培养基，在44.5±0.5℃条件下培养24±2小时；（3）显色机制：胆盐三号选择性抑制革兰氏阳性菌，而目标菌群通过代谢

乳糖产生酸性物质，引发培养基pH指示剂颜色变化；

（4）结果判读：通过计数培养基上显现的蓝色/蓝绿色特征性菌落，实现粪大肠菌群的定量检测。

2.2 方法适用范围

本方法的技术特征如下：（1）适用对象：涵盖自然水体（地表水、地下水）和人工排放水体（生活污水、工业废水）中的粪大肠菌群检测；（2）灵敏度指标：采用100mL接种量时方法检测下限为10CFU/L，当增大取样量至500mL时，检测灵敏度提升至2CFU/L；（3）标准依据：检测流程严格遵循HJ 347.1-2018技术规范。

2.3 实验仪器与装置

本实验所需的主要仪器设备包括：（1）样品采集容器：广口玻璃采样瓶（具螺旋密封盖或磨口塞），1L、500mL及250mL三种容量；（2）灭菌、培养系统：可调温高压蒸汽灭菌装置（工作温度范围115-121℃）、精密恒温培养箱（控温精度44.5℃±0.5℃）；（3）砂芯过滤系统（含真空抽滤泵），最大工作压力限值：≤50kPa负压；（4）辅助检测仪器：高精度pH测定仪（分辨率0.1pH）、标准培养皿（规格：Φ90mm）；（5）其他配套设备：常规实验室分析仪器、基本实验操作器材。

2.4 试剂材料

MFC培养基、无菌滤膜、无菌水、硫代硫酸钠、乙二胺四乙酸二钠。

2.5 样品保存规范

本方法对样品保存条件作出如下严格要求：（1）现场采样后处理时限：采集后2小时内完成分析，特殊情况无法即时检测，需立即将样品置于≤10℃低温环境

中保存，低温保存时间严格控制在6小时以内；（2）实验室样品管理：接收样品后，实验室应优先安排接收样品的检测工作，如遇特殊情况需延迟检测，必须将样品保存于≤4℃冷藏环境，且必须在接收后2小时内完成分析。（3）保存注意事项：所有冷藏样品需记录入库时间和温度，超过保存时限的样品应重新采集，样品转运过程需保持低温。

2.6 实验环境控制

本实验对环境条件实施严格管控，具体规范如下：

（1）环境调控系统：采用精密空调系统进行温湿度双重控制配备数字式温湿度自动记录仪（精度±0.5℃），实施四时段监测制度（08:00/12:00/16:00/20:00）；

（2）关键参数标准：温度控制范围为20~26℃（符合ISO 17025标准），相对湿度为40~60%RH，洁净度等级为百级层流超净工作台；（3）质量控制措施：每日执行环境参数校准，建立环境监控电子档案，异常情况应急处理预案。（4）特殊区域配置：独立设置的微生物检测区，正压维持的样品预处理区，紫外线消毒的器材传递区。

2.7 实验操作流程

本实验的微生物检测操作分为以下五个关键步骤：

（1）样品前处理与过滤，根据样品特性确定最佳接种

表 3-1 标准方法确认表

序号	方法类别	检测标准（方法）名称	标准编号（含年号）	是否有效	是否最新版本	核查日期
1	行标	水质 粪大肠菌群的测定 滤膜法	HJ 347.1-2018	是	是	2025.02.15

3.2 验证结果

3.2.1 精密度

对低浓度（地下水）、中浓度（地表水）、高浓度（生活污水）三种不同浓度的实际水样以及有证标准样品进行了6次重复测定（样品采集后低温冷藏立即送至实验室进行分析），并计算平均值、标准偏差、相对标准偏差。精密度测试数据具体见表3-2。

表 3-2 精密度测试数据

测次	低浓度 (地下水)	中浓度 (地表水)	高浓度 (生活污水)
	(CFU/L)		
1	2.7×10^2	4.1×10^4	5.0×10^7
2	2.5×10^2	4.4×10^4	4.7×10^7

体积（最低处理量为10mL），当预计菌落数超出计数范围时，采用十倍梯度稀释法调整浓度。操作要点包括：无菌条件下安装0.45μm孔径滤膜、采用三级体积过滤策略（预估量及其1/10、10倍量）、抽滤完成后维持5秒负压确保完全吸附、使用无菌水清洗滤器内壁三次去除残留。（2）选择性培养，将截留有微生物的滤膜转移至MFC培养基时需注意：①使用预灭菌器械操作②确保滤膜与培养基界面无气泡③采用倒置培养方式④严格控制培养条件：44.5±0.5℃恒温，24±2小时。（3）菌落特征鉴定，根据显色反应进行特异性识别：①目标菌落：呈现典型蓝绿色（乳糖发酵阳性）；②非目标菌落：显示灰色/淡黄色（判定为干扰菌）；③计数范围：直径0.5~2mm的特征性菌落。（4）定量分析模型：采用标准计算公式： $C = (N \times 10^3) / V$ ，其中：C—菌群浓度(CFU/L)，N—特征菌落计数结果，V—实际过滤体积(mL)， 10^3 —体积换算系数。（5）数据报告规范 检测结果按以下要求呈现：

①常规范围：整数显示(≤ 99 CFU/L)；②高浓度样品：科学记数法($\geq 1 \times 10^2$ CFU/L)；③有效数字：最多保留两位。

3 方法的验证

3.1 方法的有效性

3	2.5×10^2	4.2×10^4	4.4×10^7
4	2.6×10^2	4.3×10^4	4.8×10^7
5	2.7×10^2	4.5×10^4	5.4×10^7
6	2.5×10^2	4.3×10^4	5.0×10^7
平均值 \bar{X}	2.41	4.63	7.69
标准偏差 S	0.02	0.01	0.03
相对标准偏差 RSD%	0.68	0.31	0.39

注：、S、RSD是用原始数据以10为底，对数计算后所得。

由表3-2数据可知，低、中、高标样检测值相对标准偏差范围分别为0.68、0.31、0.39，均在0.81%~12%以内，符合HJ 347.1-2018《水质 粪大肠菌群的测定 滤膜法》对分析相对偏差的要求。

3.2.2 准确度

对有证标准样品进行了6次平行测定,分别计算平均值、相对误差。有证标准样品采购于中国工业微生物菌种保藏管理中心。有证标准样品信息详见表3-3。准确度测试数据具体见表3-4。

表3-3 有证标准样品信息表

编号	名称	批号	参考值 (MPN/L)	参考值范围 (MPN/L)
HJQC-002	水质粪大肠菌群质控样品	20242023	20	7—26000

表3-4 有证标准样品测试数据

测次	结果	结果对数值
	(CFU/L)	
1	25	1.40
2	23	1.36
3	23	1.36
4	24	1.38
5	25	1.40
6	22	1.34
平均值 \bar{X}	—	1.37
标准偏差 S	20	1.30
相对标准偏差 RSD%	—	5.58

由表3-4数据可知,有证标准物质检测值相对误差均在-0.7~22%,符合HJ 347.1-2018《水质 粪大肠菌群的测定 滤膜法》对分析相对偏差的要求。

4 结论与建议

4.1 结论

通过“人、机、料、法、环、测”等方面验证,分析人员熟悉方法原理、操作步骤及流程,验证过程中使

用仪器、设备、试剂等符合方法要求,该方法本次验证相对标准偏差、相对误差等特征指标均符合要求。可以进行地表水、地下水、生活污水中粪大肠菌群检测工作。

4.2 建议

4.2.1 质量控制措施

(1) 空白对照试验:每批次检测均需设置无菌水空白对照,培养后的滤膜应保持原始色泽。若出现显色反应,表明实验过程存在污染,需终止检测流程,系统排查污染源后重新进行实验。

(2) 对照试验验证:①阳性对照:采用标准粪大肠菌群菌株(如ATCC 25922),需呈现典型蓝绿色菌落;②阴性对照:使用无菌生理盐水,培养后应无任何菌落生长。当对照试验结果不符合预期时,该批次所有检测数据视为无效,需重新建立实验条件后复测。

4.2.2 实验废弃物处理规范

(1) 灭菌处理:所有接触样品的器材必须经过高压蒸汽灭菌121℃维持30分钟。

(2) 后续处置:灭菌后的玻璃器皿需经去离子水冲洗后高温烘干,固体废弃物按生物危害废物分类处置,液体废弃物中和后纳入实验室废水处理系统。

参考文献

- [1] 中华人民共和国水利行业标准.水环境监测规范 [M]. SL219-2013
- [2] 中华人民共和国国家环境保护标准.水质 粪大肠菌群的测定 滤膜法 [M]. HJ 347.1-2018
- [3] 潘均悦.粪大肠菌群检测方法探究 [J].生物化工, 2020(8):152-155.