

生化培养箱在多管发酵法的应用

1. 多管发酵法

初发酵实验 发酵管内装有单倍或三倍乳糖蛋白胨培养液，并在内倒置有小玻璃管。每个样品用三个不同的水样量接种，同一接种水样量要有五管，将水样分别接种到装有乳糖蛋白胨培养液的发酵管中，在 $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 下培养 $24\text{h} \pm 2\text{h}$ 。乳糖能起选择作用，因为很多细菌不能发酵乳糖，而大肠菌群能发酵乳糖并产酸产气。培养液中加入溴甲酚紫作为酸度指示剂，细菌产酸后，培养液即由原来的紫色变成黄色。产酸产气的发酵管表明试验阳性，如在倒管内产气不明显，可轻拍发酵管，有小气泡升起为阳性。

复发酵实验 轻微振荡初发酵试验阳性结果的发酵管，用 3mm 接种环将培养物(2-3 环)转接到 EC 培养液中，在 $44.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 下培养 $24\text{h} \pm 2\text{h}$ (提高培养温度可造成不利于来自自然环境的大肠菌群的生长)。培养后立即观察，发酵管产气则证实为粪大肠菌群阳性。

2. 滤膜法

滤膜是一种微孔性滤膜，孔径 $0.45\mu\text{m}$ 。将水样注入已灭菌的放有滤膜的过滤器中，经过抽滤，细菌即被截留在膜上，然后将滤膜贴于 M-FC 培养基上，在 $44.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 下培养 $24\text{h} \pm 2\text{h}$ 。粪大肠菌群菌落在 M-FC 培养基上呈蓝色或蓝绿色，其他非粪大肠菌群菌落成灰色、淡黄色或无色。正常情况下，由于温度和玫瑰酸盐试剂的选择性作用，在 M-FC 培养基上很少见到非粪大肠菌菌落。

二. 两种方法的注意事项

1. 培养温度的要求 总大肠菌群中的细菌除生活在肠道中外，在自然环境中的水与土壤中也经常存在，但此等在自然环境中生活的大肠菌群培养合适温度为 25°C 左右，如在 37°C 培养则仍可生长，但如将培养温度再升高至 44.5°C ，则不再生长，而直接来自粪便的大肠菌群细菌，习惯于 37°C 左右生长，如将培养温度升高至 44.5°C 仍可继续生长。因此，可用提高培养温度的方法将自然环境中的大肠菌群与粪便中的大肠菌群区分，两种方法也都基于此理。将接种好的样品或装有滤膜的培养基放入 培养皿要沉到水浴箱底部。

2. 加氯水样的处理 经氯处理消毒过的水样，水中含有一定量的余氯，使大肠菌群处于受损或受抑制状态，在采集水样时应提前在采样瓶中加入硫代硫酸钠，硫代硫酸钠可以脱氯，使受损的细菌得以复苏与修复，从而避免出现计数结果偏低甚至假阴性的现象。此外余氯对滤膜法培养的细菌其抑制作用尤为明显，所以抽滤时应对水样进行大量无菌水稀释，以减少余氯的残留。

3. 样品的保存 采样用的容器使用前应盖好瓶盖，用牛皮纸将瓶盖和瓶颈处包裹好，置干燥箱 160°C - 170°C 干热灭菌 2h，或用高压蒸汽灭菌器 121°C 灭菌 15min。采样后水样的

正确保存也很重要，如保存不当可使样品中的大肠菌群细菌死亡或在一定条件下再生长，这些都将影响检测结果的准确性。检测室接到水样后，应立即检测，如因故不能检测时，应立即将样品置于冰箱内(2℃-10℃)并于2小时内检测。

4. 培养物质的制备与保存

(1). 多管发酵法所使用的培养液在分装于各发酵管中后，应将发酵管尽快放于高压蒸汽灭菌器中，在115℃灭菌20min(注意：这个温度也应控制好，既达到灭菌的作用，还要防止培养物质分解流失)，然后贮存于冰箱或暗处备用。

(2). 滤膜法所采用的M-FC培养基多使用外购的成品，培养基中苯胺蓝的纯度和质量往往影响菌落的颜色，因此，无菌包装的成套培养基在使用前，最好先接种典型粪大肠菌，以观察对比菌落的颜色，来鉴定其稳定性。

5. 结果统计

(1). 多管发酵法的结果是根据不同接种量的发酵管所出现阳性结果的数目，从MPN表中查得相应的MPN指数，来计算每升水中粪大肠菌群细菌的MPN值。MPN是“Most Probable Number”的缩写，指最大可能数，它是根据统计学理论，估计水体中的菌群密度和卫生质量的一种方法，所以准确判断不同接种量发酵管的阳性数是非常重要的，否则将导致较大偏差。

(2). 滤膜法的结果是计数滤膜上呈蓝或蓝绿色的菌落，来计算出每升水样中的粪大肠菌群数。所以为便于计数，减少误差，理想的水样体积是一片滤膜上生长20-60个粪大肠菌群菌落。

三. 在实际中的应用探讨

1. 检测方法对样品的适用性

(1). 多管发酵法由于只需要根据水样的取样量来决定将样品培养于何种培养液中(单倍或是三倍乳糖)进行培养，因此理论上可适用于各种水样，但由于受发酵管容积的限制，其更适合检测水源水、地表水和污染源废水(取样量不大)，而且如果接种的水样量不是MPN表中的三种接种量时，还需用公式进行换算。

(2). 滤膜法主要是采用抽滤装置将细菌截留在滤膜上，然后将滤膜贴附在固体培养基上培养，因此可用于检测体积较大的水样，但受滤膜孔径的限制，在检测混浊度高(污染源废水)、非大肠杆菌类细菌密度大(河湖水)的水样时，对菌落计数统计有一定影响，此外，如水样中有毒性物质较高，也会在滤膜上形成累积，抑制细菌培养。

2. 检测时间及操作过程的繁琐度

(1). 多管发酵法需要经过初发酵试验和复发酵试验两个过程后才能根据不同接种量的发酵管所出现阳性结果的数目，从MPN表中查得相应的MPN指数，从而最后得出每升水中粪大肠菌群细菌的MPN值。可以看出，多管发酵法的培养时间至少需要2天以上，且对接种

量、每一接种量的发酵管数都有严格要求(MPN表多采用9管、15管发酵管,接种量为10ml、1ml、0.1ml³种体积查询),否则结果难以统计。

(2).滤膜法目前主要采用成套NPS(滤膜+培养基+培养皿)进行细菌截留和培养,操作简单,使用时只需用少量无菌水润湿培养基垫即可使用,培养时间1天左右,能比多管发酵法更快地获得结果,还具有高度的再现性和精密性。此外由于采用单片无菌包装,节省了灭菌时间,还避免操作过程中的二次污染,并且长有菌落的滤膜片可在紫外线灭菌、干燥后作为检测记录永久保存,更符合计量认证规范。

3. 检测成本的考虑

(1).多管发酵法所用的发酵管、小玻璃倒管和塑料盖可在清洗、高压灭菌和紫外线消毒后重复使用,液态培养基可自行配制或采用市售已配好的综合培养基,检测的成本不高。由于其方法较繁琐,目前正有一种经过US EPA认证的水和废水中粪大肠菌群检测的标准方法逐步取代它,这种在美国、日本和加拿大等国家广泛使用的检测技术在国内也有一定使用(北京市环境检测中心、北京市排水集团检测中心等),这种方法就是使用IDEXX colilert试剂来检测水中粪大肠菌,虽然它是基于多管发酵法原理,不过却将其操作大大简化了。当然,伴随着操作的简化,检测成本也大幅提高,设备基本上全是进口的,前期投入大概在8万元至10万元人民币之间,且由于采样瓶、试剂和密封计数盘都是一次性使用,单个样品的检测成本也将达到200元人民币左右。

(2).滤膜法主要采用的抽滤装置(抛光不锈钢3歧管过滤器、500ml漏斗、无油隔膜真空正压两用泵和手动无菌水加液器)也基本上来自于进口,目前很多单位使用的都是德国赛多利斯公司生产的产品,其前期投入大概在2万元至3万元人民币左右(包括100套无菌包装的NPS,12元/每套)。由于每个样品需采用3种不同的稀释比进行过滤培养,要使用3套NPS,所以单个样品的检测成本在50元人民币左右。

四. 建议

从两者在几个方面的比较可以看出,滤膜法具有省时、省料、设备要求低以及可以采集较多的检测水样等优点,而且随着应急检测机制的建立,当需要我们对各种突发环境污染事件(医院废水是否加氯处理、河湖是否受生活废水污染)迅速做出反应,更快地获得肯定结果的时候,其优点越发突出。

因此在实际检测工作中,我们可以将滤膜法作为主要检测方法,并采取措施克服其易受水样混浊度、其它菌种和有毒物质干扰的局限性,快速反映水质情况,为监督管理部门提供科学数据;将多管发酵法作为辅助方法,通过其来对滤膜法培养的可疑菌种进行鉴定,从而使检测结果更加准确,只有这样,水中的细菌学检测才能顺利、高效的开展。