Precision and Accuracy Analysis of Total Coliform Bacteria in Drinking Water by Fixed Enzyme Substrate Method

Fuchun Xiong Xiuzhen Zhu Renhe Yang Junjie Ruan*

Sichuan Panzhihua Ecological Environment Monitoring Center Station, Panzhihua, Sichuan, 617000, China

Abstract

Objective: To analyze the precision of the fixed enzyme substrate method in the determination of *Escherichia coli* and total coliform bacteria in drinking water. **Methods:** The sample is municipal drinking water (Guanyinyan water source). Positive and negative standard strains were *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, analyzing precision test results, test results of proven standard substance / standard sample, actual sample test results, and method verification / validation. **Results:** the relative standard deviation ranged from 1% to 3%. **Accuracy:** the relative error range of the certified standard substance is 1.1% to 2.6%. **Actual sample validation:** The relative standard deviation of the actual sample is 1.3%. All indicators meet the method requirements. **Limit of detection:** 1 MPN / 100 mL according to the table. **Conclusion:** Precision of fixed enzyme substrate method in the determination of *E. coli* and total coliform bacteria in drinking water.

Keywords

drinking water; total coliform; *escherichia coli*; fixed enzyme substrate method; precision

固定酶底物法测定生活饮用水中总大肠菌群精密度和准确度分析

熊付春 朱秀贞 杨仁和 阮俊杰*

四川省攀枝花生态环境监测中心站, 中国·四川攀枝花 617000

摘要

目的: 分析生活饮用水中大肠埃希氏菌和总大肠菌群测定中固定酶底物法的精密度。**方法:** 样品为市级饮用水(观音岩水源地)。阳性、阴性标准菌株分别为大肠埃希菌、铜绿假单胞菌, 分析精密度测试结果、有证标准物质/标准样品测试结果、实际样品测试结果、方法验证/确认。**结果:** 对有证标准物质分别进行6次重复测定, 其相对标准偏差范围为1%~3%。**正确度:** 有证标准物质的相对误差范围为1.1%~2.6%。**实际样品验证:** 实际样品的相对标准偏差为1.3%。各项指标满足方法要求。检出限: 根据查表得出1MPN/100mL。**结论:** 生活饮用水中大肠埃希氏菌和总大肠菌群测定中固定酶底物法的精密度高。

关键词

生活饮用水; 总大肠菌群; 大肠埃希氏菌; 固定酶底物法; 精密度

1 引言

微生物常规检测指标为大肠埃希氏菌、耐热大肠菌群、总大肠菌群, 在肠道致病菌检验中, 其均可以作为指示菌, 在卫生学评价中是重要内容^[1]。总大肠菌群指一群革兰氏阴性无芽孢杆菌, 需氧、兼性厌氧, 在37℃温度下培养24h能够发酵乳糖、产酸产气^[2]。现阶段, 在水质评价中, 总大肠菌群是一项指标, 能够将水样受到粪便污染情况反映出来。固体酶底物法、乳糖蛋白胨多管发酵法等是检测生活饮用水中大肠埃希氏菌、大肠菌群等的主要技术, 其中固定酶

底物法是一种大肠杆菌检测方法, 从美国引进, 具有简便快捷的操作, 不需要制作培养基等, 现阶段在水中大肠埃希氏菌、总大肠菌群等检测中得到了广泛应用^[3]。多管发酵法是仲裁法。本研究分析了生活饮用水中大肠埃希氏菌和总大肠菌群测定中固定酶底物法的精密度。

2 材料与方法

2.1 材料

样品为市级饮用水(观音岩水源地)。阳性、阴性标准菌株分别为大肠埃希菌、铜绿假单胞菌, 菌种号分别为CMCC(B)44102、CICC21636, 分别来源于南京便诊生物科技有限公司、中国工业菌种保藏中心。

2.2 方法

2.2.1 方法精密度测定

按照标准方法要求, 采用有证标准物质进行6次重复

【作者简介】熊付春(1986-), 女, 中国四川泸县人, 本科, 高级工程师, 从事环境监测研究。

【通讯作者】阮俊杰(1994-), 女, 中国山西朔州人, 本科, 工程师, 从事环境监测研究。

测定。根据实验室实际情况，本次验证选用 51 孔定量盘法进行方法精密度测定。做法简述：将 100mL 水样加入 100mL 无菌稀释瓶中，加入 2.7gMMO-MUG 培养基粉末，混合使之完全溶解均匀。将前述 100mL 水样全部倒入 51 孔无菌定量盘内，以手抚平定量盘背面，去除孔穴内气泡，然后用程控定量封口机封口。放入 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 的培养箱内培养 24h。

2.2.2 方法正确度测定

方法正确度采用与精密度测试一致的有证标准样品进行测定。做法简述：将 100mL 水样加入 100mL 无菌稀释瓶中，加入 2.7gMMO-MUG 培养基粉末，混摇使之完全溶解均匀。将前述 100mL 水样全部倒入 51 孔无菌定量盘内，以手抚平定量盘背面，去除孔穴内气泡，然后用程控定量封口机封口。放入 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 的培养箱内培养 24h。

2.2.3 实际样品测定

①样品采集和保存。按照 GB/T 5750.2—2023《生活饮用水标准检验方法》第 2 部分水样采集与保存的要求进行实际样品的采集和保存。样品采集和保存情况见表 1。

②样品测定结果。依据标准方法的适用范围，结合样

品实际情况，选择市级饮用水水源地水样进行测定，并对标准方法中规定的总大肠菌群进行验证。

③质量控制。第一，使用实验空白样品进行空白对照测定。第二，使用有证标准样品进行质量控制。第三，实验样品测定平行样。第四，使用有证标准菌株进行阳性和阴性对照性试验。

表 1 样品采集和保存

序号	样品类型	采样依据	样品保存方式
1	饮用水水源地	GB/T 5750.2—2023	冷藏、避光、加入保剂

3 结果

3.1 精密度测试结果分析

经验证，对有证标准物质分别进行 6 次重复测定，其相对标准偏差范围为 1%~3%。精密度测试数据见表 2，表 3。

3.2 有证标准物质 / 标准样品测试结果分析

正确度：有证标准物质的相对误差范围为 1.1%~2.6%。有证标准物质 / 标准样品测试数据见表 4。

表 2 精密度测试数据（一）

平行号 标准物质 1 (MPN/100mL)	试样						备注
	标准物质取对数	标准物质 2 (MPN/100mL)	标准物质取对数	标准物质 3 (MPN/100mL)	标准物质取对数		
测定结果 (MPN/100mL)	1	16.4	1.215	178	2.250	1780	3.250
	2	17.8	1.250	164	2.215	1920	3.283
	3	19.2	1.283	150	2.176	1920	3.283
	4	16.4	1.215	192	2.283	2070	3.316
	5	15.0	1.176	192	2.283	1500	3.176
	6	17.8	1.250	178	2.250	1780	3.250
平均值 $\bar{x}_i$ (MPN/100mL)	17.1	1.23	175.7	2.24	1828.3	3.26	
标准偏差 S_i		0.04		0.04		0.05	
相对标准偏差 RSD_i (%)		3.0		1.9		1.5	

备注：标准物质 1 浓度真值：18MPN/100mL、标准物质 2 浓度真值：196MPN/100mL、标准物质 3 浓度真值：1821MPN/100mL。

表 3 精密度测试数据（二）

检测项目	平行样品	低浓度水样	中浓度水样	高浓度水样	阳性标准株
总大肠菌群 (MPN/100; mL)	1	7.5	9.4×10^2	1.5×10^5	5.3×10^9
	2	6.4	1.0×10^3	2.5×10^5	7.4×10^9
	3	6.4	1.2×10^3	2.4×10^5	5.6×10^9
	4	6.4	8.8×10^2	3.4×10^5	3.8×10^9
	5	6.4	8.3×10^2	3.1×10^5	5.3×10^9
	6	6.4	8.8×10^2	2.9×10^5	5.6×10^9
	精密度 RSD (%)		1.6	1.3	2.0
大肠埃希氏菌 (MPN/100mL)	1	6.4	4.5×10^2	6.4×10^4	5.3×10^9
	2	5.3	5.9×10^2	2.2×10^5	7.4×10^9
	3	6.4	6.6×10^2	2.2×10^5	5.6×10^9
	4	6.4	5.3×10^2	3.4×10^5	3.8×10^9
	5	6.4	5.3×10^2	3.1×10^5	5.3×10^9
	6	6.4	4.5×10^2	2.2×10^5	5.6×10^9
	精密度 RSD (%)		2.0	1.8	4.3

表4 有证标准物质 / 标准样品测试数据

平行号		总大肠菌群						
		标准物质 (MPN/100ml)	标准物质取对数	标准物质 (MPN/100ml)	标准物质取对数	标准物质 (MPN/100ml)	标准物质取对数	备注
测定结果 (MPN/L)	1	16.4	1.215	178	2.250	1780	3.250	
	2	17.8	1.250	164	2.215	1920	3.283	
	3	19.2	1.283	150	2.176	1920	3.283	
	4	16.4	1.215	192	2.283	2070	3.316	
	5	15.0	1.176	192	2.283	1500	3.176	
	6	17.8	1.250	178	2.250	1780	3.250	
平均值 $\bar{x}_i$ (MPN/100mL)		17.1	1.23	175.7	2.24	1828.3	3.26	
有证标准物质真值 (MPN/100mL)		18		196		1821		
相对误差 (%)			2.63		2.15		1.05	

3.3 实际样品测试结果分析

实际样品验证：实际样品的相对标准偏差为 1.3%。各项指标满足方法要求。实际样品测定结果见表 5。

表5 实际样品测试数据

平行号	实际样品			备注
	样品 1			
	样品 (MPN/100mL)	样品取对数		
测定结果	1	65.9	1.819	
	2	65.9	1.819	
	3	73.8	1.868	
	4	73.8	1.868	
	5	69.7	1.843	
	6	65.9	1.819	
平均值		69.2	1.839	
相对偏差			0.02	
相对标准偏差 (%)			1.3	

备注：样品为市级饮用水（观音岩水源地）。

3.4 方法验证 / 确认汇总

根据实验室具体情况本次总大肠菌群项目的方法验证采用酶底物法开展。检出限：根据查表得出 1MPN/100mL。方法验证汇总表见表 6。

表6 方法验证 / 确认汇总表

化合物	检出限 (MPN/100mL)	精密度 (%)	准确度 (%)
总大肠菌群	1	1.5~3.0	1.1~2.6

4 讨论

本研究结果表明，对有证标准物质分别进行 6 次重复测定，其相对标准偏差范围为 1%~3%。正确度：有证标准物质的相对误差范围为 1.1%~2.6%。实际样品验证：实际样品的相对标准偏差为 1.3%。各项指标满足方法要求。检出限：根据查表得出 1MPN/100mL，说明固定酶底物法一方

面具有方便的操作、较短的培养时间与检测时间，另一方面还不需要确认试验，能够准确检测与判定水样中微生物污染情况，并对具有病原学意义的大肠埃希氏菌及大肠菌群进行同时检测，具有较高的灵敏性与特异性。原因为固定酶底物法能够将实验过程中引入的污染减少到最低限度，对二次污染的发生进行了有效避免，对实验操作环境具有较低的要求，不需要严格无菌，对检测人员的技术能力也具有较低的要求^[4-6]。同时，固定酶底物法对传统检测方法具有较长的检测时间、较低的灵敏性的不足进行了很好的弥补，能够在生活饮用水中大肠埃希氏菌、总大肠菌群检测中很好地应用，将传统方法取代，成为微生物检测的发展趋势^[7,8]。

综上所述，生活饮用水中大肠埃希氏菌和总大肠菌群测定中固定酶底物法的精密度高，值得推广。

参考文献

- [1] 雷静,廖爽,乔茜茜,等.生活饮用水中总大肠菌群三种不同检测方法比较[J].科技创新导报,2022,19(2):1-3.
- [2] 张振华,卢卓君,王惠婷,等.固定酶底物法与多管发酵法测定地表水耐热大肠菌群的综合效果比较[J].净水技术,2019,38(9):23-26+32.
- [3] 刘招椿.比较快速检测水中粪大肠菌群的方法[J].清洗世界,2020,36(12):121-122+126.
- [4] 马振,滕欣欣,于晓莉.固定酶底物法和多管发酵法测定城镇处置污泥中的粪大肠菌群的比较[J].科学咨询,2021,7(22):66-67.
- [5] 才美佳,王一村,李娜,等.固定酶底物法检测不同保存条件对水样中粪大肠菌群的影响[J].中外食品工业,2021,10(8):113-114.
- [6] 孙海涛,卜伟,朱宇芳,等.固定底物酶底物法在污水粪大肠菌群检测的适用性研究[J].污染防治技术,2019,4(2):72-75.
- [7] 温娟.污水中粪大肠菌群的两种快速检测方法比较[J].建材与装饰,2019,14(30):204.
- [8] 刘莎莎,同帆.几种金属元素对酶底物法测粪大肠菌群的影响[J].环境与发展,2019,11(3):87+89.