

多管发酵法：生活饮用水总大肠菌群标准检验研究

马姣丽

云南省地质矿产勘查开发局中心实验室（自然资源部昆明矿产资源检测中心）滇西测试所 云南大理 671000

摘要：总大肠菌群作为饮用水卫生质量的关键指标，其存在直接反映水体受粪便污染程度，对监控饮用水安全具有不可替代的作用。在生活饮用水卫生标准检验中，多管发酵法作为一种常用的检测方法，对于严格控制总大肠菌群数至关重要。该方法能够有效揭示水中肠道致病菌的污染状况，为饮用水安全提供重要保障。因此，我们必须高度重视总大肠菌群的检测与控制工作，严格执行相关标准与规范，结合科学方法和先进技术，如多管发酵法，确保饮用水中总大肠菌群数得到有效控制，从而保障广大人民群众的生活饮用水安全与健康。这项工作对于维护公共卫生、预防水源性疾病传播具有重要意义。根据《生活饮用水卫生标准》(GB5749-2006)规定，饮用水中总大肠菌群数每100mL水样中不得超过3个。因此，使用多管发酵法来测定生活饮用水中的总大肠菌群数，是评估饮用水卫生质量的重要手段之一。

关键词：标准检验；生活饮用水；大肠菌群

一、多管发酵法的培养基与试剂

多管发酵法作为测定总大肠菌群数的经典方法，在保障饮用水安全中发挥着重要作用。此法通过一系列步骤，如初发酵、平板分离和复发酵，利用大肠菌群特性来检验水样。其结果以“最可能数”即MPN来表示，这是一种基于统计学原理的评估方法，能够科学反映水质状况。多管发酵法操作简便，准确度高，广泛应用于水质监测与评估领域。它不仅能够有效揭示水体中的大肠菌群污染程度，还是保障饮用水安全的关键环节。通过多管发酵法的应用，我们能够及时发现并解决水质问题，确保公众健康。

1. 乳糖蛋白胨培养液

(1) 成分

表1 乳糖蛋白胨培养液成分表展示

成分	数量 (g/ml)
A 蛋白胨	10
B 牛肉膏	3
C 乳糖	5
D 斜化钠	5
E 溴甲酚紫乙醇溶液 (16g/L)	1
F 蒸馏水	1000

(2) 制法

乳糖蛋白胨培养液的制法讲究精确与细致，以确

保最佳培养效果。首先，将蛋白胨、牛肉膏、乳糖及氯化钠精确称量，充分溶解于蒸馏水中，这一步关系到培养液成分的精确配比。接着，调整溶液的pH值至7.2至7.4，为微生物生长营造适宜的酸碱环境。

随后，加入适量的溴甲酚紫乙醇溶液，并搅拌均匀，使指示剂充分分布于培养液中。再将制备好的培养液分装至带有倒管的试管中，方便后续接种与观察。

最后，将分装好的培养液置于高压灭菌器中，以适当的压力和温度进行灭菌处理，彻底消除杂菌，确保培养液的纯净度。灭菌后，将培养液贮存于冷暗处，以保持其稳定性。

整个制备过程严谨而有序，每一步操作都紧密相连，确保了培养液的质量和实验结果的可靠性。通过这样的精心制备，我们能够得到高质量的培养液，为后续的微生物培养和检测工作奠定坚实的基础。

2. 二倍浓缩乳糖蛋白胨培养液

制备二倍浓缩乳糖蛋白胨培养液时，关键在于成分量的加倍调整。蛋白胨、牛肉膏、乳糖、氯化钠以及溴甲酚紫乙醇溶液等均需按原配方双倍添加，而蒸馏水量维持不变。这样既能确保浓缩效果，又避免了溶液过稀。混匀后，通过高压灭菌彻底消除杂菌，确保培养液的纯净度。最后，将制备好的浓缩培养液贮存于冷暗处，防止变质。整个制备过程简单而高效，为后续实验提供了高质量的浓缩培养液。

(1) 成分

作者简介：马姣丽（1991-1）女，汉，云南大理人，中级工程师，研究方向：检测，化学，环境，地矿。

表2 伊红美蓝培养基成分表展示

成分	数量 (g/ml)
A 蛋白胨	10
B 乳糖	10
C 磷酸氢二钾	2
D 琼脂	20-30
E 蒸馏水	1000
F 伊红水溶液 (20 g/L)	20
G 美蓝水溶液 (5 g/L)	13

成分D琼脂的量是一个范围，具体数量可以根据实际需要选择。成分F和G是以溶液的形式加入，所以给出的数量是溶液的体积。这个图表可以帮助清晰地看到每个成分所需的数量。

(2) 制法

伊红美蓝培养基的制法需精细操作以确保其质量。首先，将蛋白胨、磷酸盐和琼脂逐一溶解于蒸馏水中，确保成分充分溶解并混合均匀。随后，校正溶液的pH值为7.2，以营造适合微生物生长的环境。接着，加入乳糖并再次混匀，然后将培养基分装至适当的容器中。

将分装好的培养基进行高压灭菌处理，以68.95kPa的压力在115℃下灭菌20分钟，确保无菌状态。临用前，将琼脂加热融化，待冷却至50℃~55℃时，加入伊红和美蓝溶液，并迅速混匀。最后，将培养基倾注于平皿中，使其均匀分布，待其凝固后即可使用。此培养基可用于微生物的培养和鉴别实验。

3. 革兰氏染色液

(1) 成分

表3 结晶紫染色液成分表展示

成分	数量 (g/ml)
a 结晶紫	1
b 乙醇 (95%, 体积分数)	20
c 草酸铵水溶液 (10 g/L)	80

在这个图表中，乙醇和草酸铵水溶液的数量是用体积来表示的，单位为毫升 (ml)。结晶紫的数量则是用质量来表示的，单位为克 (g)。这样的表示方式有助于清晰地了解每个成分的数量和单位。

(2) 制法

结晶紫染色液的制法需要确保使用纯品结晶紫。首先将结晶紫溶于乙醇中，然后与草酸铵溶液混合，确保充分混合均匀。请注意，龙胆紫不能作为替代品，因为其成分不单一，可能导致假阳性结果。此外，结晶紫溶液若放置过久产生沉淀，则不宜再使用，以免影响染色效果。

4. 革兰氏碘液

(1) 成分

表4 革兰氏碘液成分表展示

成分	数量 (g/ml)
a 碘	1
b 碘化钾	2
c 蒸馏水	300

在这个图表中，我们列出了成分a (碘)、成分b (碘化钾) 以及成分c (蒸馏水) 的数量。碘和碘化钾的数量是以克 (g) 为单位表示的，而蒸馏水的数量则以毫升 (ml) 为单位表示。这个图表能够清晰地展示每个成分所需的量，方便进行配比和实验操作。

(2) 制法

首先混合碘与碘化钾，再加入少量蒸馏水并充分振荡，确保完全溶解。随后，继续加入蒸馏水至所需量。此碘液可用于生物中贮存蛋白质的鉴定及革兰氏染色。

5. 脱色剂沙黄复染液

(1) 成分

表5 脱色剂沙黄复染液成分表展示

成分	数量 (g/ml)
a 沙黄	0.25
b 乙醇 (95%, 体积分数)	10
蒸馏水	90

这个图表中，我们列出了三种成分：沙黄、乙醇 (95% 体积分数) 和蒸馏水，以及它们各自的数量。沙黄和乙醇的数量是以克 (g) 或毫升 (ml) 为单位表示的，而蒸馏水的数量也是以毫升 (ml) 为单位。通过这个图表，我们可以清晰地看到每个成分所需的量和单位，便于在实验中进行准确的配比和操作。

(2) 制法

首先，将沙黄充分溶解于乙醇中，确保完全溶解；然后，再加入适量的蒸馏水，混合均匀，即可得到所需的沙黄复染液。该溶液在染色过程中起着重要的作用。

6. 革兰氏染色法

革兰氏染色法是一种常用的细菌染色技术，步骤如下：首先，取培养18至24小时的培养物均匀涂片，固定于玻片上。接着，滴加结晶紫染色液，染色1分钟后水洗，使细菌初步着色。然后，滴加革兰氏碘液，作用1分钟再水洗，以增强染色效果。随后，用脱色剂脱色，摇动玻片至无紫色脱落，大约30秒，水洗，这是区分革兰氏阴阳性的关键步骤。最后，滴加复染剂复染1分钟，水洗后待干，镜检观察结果。整个过程逻辑清晰，操作

连贯，能有效鉴别细菌的种类。

二、多管发酵法仪器

在进行多管发酵法检测时，所需的仪器设备是确保实验顺利进行的关键。首先，我们需要一个培养箱，温度控制在 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，以维持稳定的培养环境。其次，冰箱用于储存试剂和样品，温度保持在 $0^{\circ}\text{C} \sim 4^{\circ}\text{C}$ 。此外，天平用于准确称量，显微镜用于观察微生物形态。同时，直径为9cm的平皿、试管、分度吸管（1mL和10mL）、锥形瓶和小倒管也是不可或缺的。最后，载玻片用于制备显微观察样本。这些仪器的合理组合和正确使用，将有助于提高多管发酵法的准确性和可靠性。

三、多管发酵法检验步骤

1. 乳糖发酵试验

在进行总大肠菌群检测时，我们需要针对不同水样采取相应的处理方法。对于常规的出厂自来水检验，我们可以直接取10ml水样接种到双料乳糖蛋白胨培养液中。然而，当面临污染较严重的水源水时，我们需要加大稀释度并多次接种。具体而言，我们先取1ml水样接种到单料培养液中，接着将另1ml水样进行稀释后再接种。每个稀释度都需接种5管。对于污染尤为严重的水源水，我们甚至需要进一步稀释至0.001ml，并同样在每个稀释度接种5管，共计15管。在接种1ml以下水样时，我们需进行递增稀释，并使用灭菌刻度吸管确保取样的准确性。

完成接种后，我们将所有接种管置于 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 的培养箱内，培养 $24\text{h} \pm 2\text{h}$ 。这是为了观察乳糖蛋白胨培养管的反应情况。如果所有培养管都不产气产酸，那么我们可以报告为总大肠菌群阴性，表明水样中没有检测到总大肠菌群。然而，如果有培养管出现产酸产气的现象，那么就需要按照后续的步骤进行进一步的处理和分析。通过这样的精确操作和连续观察，我们能够有效地控制水样稀释度，准确揭示肠道致病菌的污染情况，从而确保饮用水的安全性。在整个过程中，我们必须严格遵守相关标准与规范，以确保检测结果的准确性和可靠性。

2. 分离培养

将产酸产气的发酵管转种至伊红美蓝琼脂平板，置 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养18h~24h。观察菌落形态，挑选特定菌落进行后续分析。深紫黑色、具金属光泽的菌落及紫黑色、不带或略带金属光泽的菌落，以及淡紫红色、中心较深的菌落，均为可能的目标菌落。随后对这些菌落进行革兰氏染色、镜检和证实试验，以进一步确定其属性。通过这一系列步骤，我们能够精确鉴别并筛选出目标菌落，为后续的分析 and 研究提供可靠的依据。

3. 证实试验

经革兰氏染色镜检确认为阴性无芽孢杆菌后，接种至乳糖蛋白胨培养液中，于 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养 $24\text{h} \pm 2\text{h}$ 。若观察到产酸产气现象，即可证实总大肠菌群的存在。此步骤对于确保饮用水安全至关重要，有助于及时应对潜在污染风险。

4. 多管发酵法检验结果报告

根据证实为总大肠菌群阳性的管数，查MPN（most probable number，最可能数）检索表，报告每100 ml，水样中的总大肠菌群最可能数（MPN）值。稀释样品查表后所得结果应乘稀释倍数。如所有乳糖发酵管均阴性时，可报告总大肠菌群未检出。

表6 阳性和阴性结果组合时的最可能数（MPN）

阳性管数	最可能数（MPN）
0	<2.2
1	2.2
2	5.1
3	9.2
4	16.0
5	>16

结语

多管发酵法是一种重要的微生物学检测方法，广泛应用于生活饮用水总大肠菌群的标准检验中。它采用特定培养基与试剂，通过精确操作与仪器设备，有效确保检验结果的准确性和可靠性。此方法简便易行，成本相对较低，适用于大规模检测。通过定期监测饮用水，可及时发现健康风险，保障饮水安全。

参考文献

- [1] 李彦贞.生活饮用水微生物检验方法和评价标准探讨[J].临床医药文献电子杂志, 2020
- [2] 丛聪, 肖雯, 唐云飞.生活饮用水水质微生物检验分析的重要性[J].皮革制作与环保科技, 2023
- [3] 黎尧, 张绍斌.多管发酵法测定水质粪大肠菌群的探讨[J].环境与发展, 2019
- [4] 李永.多管发酵法测定污水中粪大肠菌群结果不确定度的评定[J].广东化工, 2013
- [5] 王朝霞.水质粪大肠菌群多管发酵法样品保存条件研究[J].现代农业科技, 2020
- [6] 楼小平, 林增飞.多管发酵法和酶底物法检测总大肠菌群的结果差异性[J].净水技术, 2020(06)