

饮用水中几种细菌计数方法的比较

鲁巍,王云,张晓健

(清华大学环境科学与工程系,北京 100084)

摘要:比较采用不同培养基的平板计数(Plate Counts, PC)方法,以及不同荧光染色剂的显微镜直接计数方法与常规计数方法的差别.研究认为,常规平板计数方法并不能准确反映饮用水中实际存活的细菌数量;吡啶橙直接计数(Acridine Orange Direct Counts, AODC)的结果最高,较常规平板计数方法高出 3~4 个量级;活细菌直接计数(Direct Viable Counts, DVC)中,DVC-N.A., DVC-CTC 和 DVC-BacLight 等计数方法的结果较常规平板计数结果高出 2~3 个量级.以地表水为水源的水厂出水中活细菌数占总细菌数的比例在 10%左右.

关键词:饮用水;直接计数;平板计数;活细菌直接计数;细菌

中图分类号:X832;TU991.25 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2004)04-0167-03

Methods of Enumeration of Bacteria in Drinking Water

LU Wei, WANG Yun, ZHANG Xiao-jian

(Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Methods of the enumeration of total bacteria and Coliform in drinking water were researched in this paper. The differences between heterotrophic plate count and direct viable count method were compared. It is concluded that the total number of bacteria in R2A medium is one order of quantity higher than the traditional plate count agar, and the results of acridine orange direct counts (AODC) is the highest. Some different staining methods in direct viable count were also compared in this paper, such as nalidixic acid, CTC staining and BacLight staining. The proportion of the live bacteria to the dead is about 10%.

Key words: drinking water; enumeration; PC; DVC; bacteria

在饮用水处理中,出厂水加氯消毒后进入管网,部分存活的微生物和管网中生物膜中的微生物会利用管网水中的微量可生物降解有机物进行再生长,引起所谓的生物稳定性问题^[1].

长期以来,国内多采用异养菌平板计数法(Heterotrophic Plate Counts, HPC)和最大或然数法(Most Probable Number, MPN)来测定饮用水中的活菌数.但由于饮用水中的贫营养环境有别于传统培养基提供的富营养环境,大多数在显微镜下观察到的细菌不能在传统培养基中生长(Nonculturable),致使活菌计数结果偏低.近些年来,国外先后应用吡啶橙染色直接计数(Acridine Orange Direct Counts, AODC)、活菌直接计数(Direct Viable Counts, DVC)等方法对饮用水中的细菌总数及活菌数进行快速、直接的镜检计数.一些新的染色方法,如采用 5-氰基-2,3-联甲苯四唑盐酸盐(5-Cyano-2,3-ditolyltetrazolium chloride, CTC)、核酸探针(BacLight)等对活细菌计数,都取得了很好地效果.国内这方面的研究却未见报道.

本文应用 AO、CTC、BacLight 等试剂染色,采用显微镜直接计数对饮用水中的细菌数量进行测定,并与常规平板计数方法所得结果进行了比较与讨论.

1 试验材料和方法

1.1 水样的采集

本试验所用水样分别取自实验室自来水和北方某市管网水.水样均采用无菌磨口玻璃瓶采集.实验室自来水未经特殊处理直接测定.现场水样采集后立即放入冷却箱中保存,4h 内测定.消毒试验所用水样为实验室自配水.

1.2 细菌计数

1.2.1 总细菌计数

(1) AODC 法^[2] 水样采集后迅速加入甲醛固定,甲醛最终浓度 2%;取 10 mL 固定后水样加入 0.5 mL 0.2%吡啶橙(Acridine Orange, Sigma 公司)染色 1~2 min;将染色水样经滤膜(孔径 0.2 μm,直径 25 mm,黑色聚碳酸酯滤膜, Nuclepore 公司)过滤;过滤后将滤膜置于载玻片上,用落射荧光显微镜(日本 Nikon, EF-D 型)计数视野中发橙色或绿色荧光的菌体;显微镜光源为 200 W 汞灯,激发光滤光片

收稿日期:2003-08-07;修订日期:2003-09-25

基金项目:国家自然科学基金资助项目(50238020);国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(2002AA601140)

作者简介:鲁巍(1978~),男,博士研究生,主要从事水污染防治技术研究.

为 450 ~ 490 nm, 光束分离滤光片 510 nm, 阻挡滤光片 520 nm.

(2) BacLight 染色直接计数法 将试剂按照产品要求配制后, 取 2 mL 固定后水样加入 60 μ L 所配 BacLight 染色试剂, 避光培养 15 ~ 20 min; 然后按照 AODC 处理方法制片, 观察计数视野中发红色或绿色荧光的菌体. 所用滤光片波段同 AODC 相同.

1.2.2 活细菌计数

(1) DVC 法 方法 ①(DVC- N. A.): 向水样中加入 0.002 % 萘啶酮酸(N. A. , Nalidixic Acid, Fluka 公司) 和 0.025 % 酵母膏(均为最终浓度), 避光, 25 $^{\circ}$ C 培养 6 h, 然后 2 % 甲醛固定, 再按照 AODC 法直接镜检计数. 视野中长大或变粗的菌体被认为是活菌; 方法 ②(DVC- CTC): 将 0.2 mL 1.67 % 的 CTC 加入 10 mL 水样中(CTC 最终浓度 1 mmol/ L), 避光室温培养 4 h, 然后 2 % 甲醛固定, 再按照 AODC 法直接镜检计数视野中的红色菌体; 方法 ③(DVC- BacLight): 参见 1.2.1, 只镜检计数视野中发绿色荧光的菌体.

(2) HPC 法 采用传统营养琼脂培养基和 R2A 培养基进行平板计数, 详见相关检验手册^[3]. R2A 培养基基本组成为: 酵母浸膏 0.5 g, 蛋白胨 0.5 g, 酸水解干酪素 0.5 g, 葡萄糖 0.5 g, 可溶性淀粉 0.5 g, 丙酮酸钠 0.3 g, K₂HPO₄ 0.3 g, MgSO₄·7H₂O 0.05 g, 琼脂 15 g, 溶于 1 L 水.

1.2.3 总大肠菌群计数

消毒试验考察消毒剂的灭菌效果, 配水中投加的大肠杆菌菌液为实验室自培养.

(1) 滤膜法 常规检测方法, 详见检验手册^[3].

(2) 荧光显微计数 参见 1.2.1, 1.2.2.

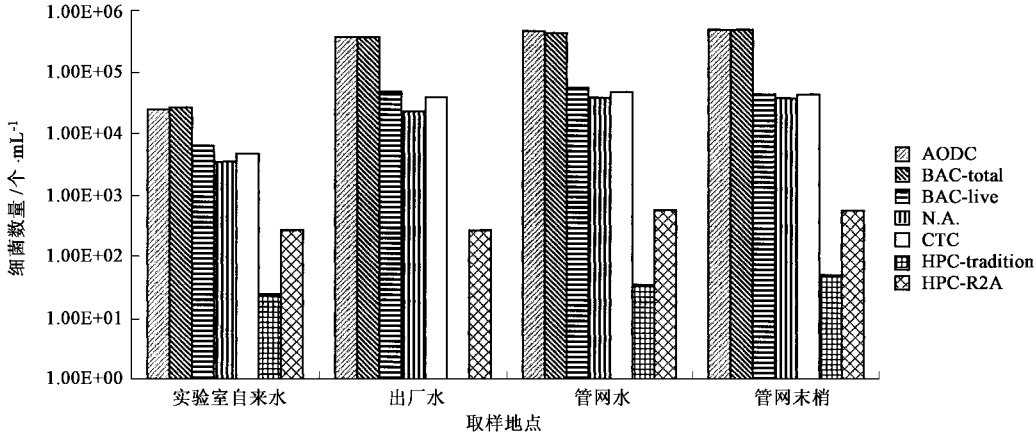


图 1 细菌计数结果

Fig.1 The results of bacteria enumeration

2 试验结果与讨论

2.1 细菌计数方法比较

应用 AODC、DVC 及 HPC 等方法对实验室自来水及城市管网水中细菌总数及活菌数计数的结果见图 1, 表 1 中计算了活菌数占总细菌数的比例.

表 1 活菌数占总细菌数的比例/ %

样 品	计数方法				
	N. A. /	CTC /	Bac- live /	HPC / AODC	
	AODC	AODC	AODC	营养琼脂	R2A
实验室自来水	13.9	17.7	25.7	0.094	1.1
某水厂出水	6.1	9.8	12.7	未检出	0.068
管网水	8.8	10.5	12.4	0.0077	0.12
管网末梢水	7.9	11.3	9.5	0.010	0.12

由图 1 可以看出, AODC 和 BacLight 2 种方法得出的总细菌数无显著性差异. 北方某市各点水样中细菌总数在 10⁵ 个/ mL 量级, 活菌数在 10⁴ 个/ mL 量级. 实验室自来水中细菌总数在 10⁴ 个/ mL 量级, 活菌数在 10³ 个/ mL 量级. 以营养琼脂作为培养基的平板计数只有几十个 CFU/ mL, 以 R2A 作为培养基的平板计数也只达到 10² 个/ mL 量级. 实验室自来水是高校自供水, 水源为地下水, 所调查水厂的水源为地表水, 水源水质差异可能是引起细菌数差异的因素之一.

由表 1 看出, 实验室自来水中活菌数所占比例在 10 % ~ 25 % 之间, 而以地表水为水源的水厂出水中活菌数所占比例基本在 10 % 左右.

活菌计数中计数结果大小顺序为: BacLight > CTC > N. A. > R2A > 营养琼脂. R2A 培养基是一种贫营养培养基, 其提供的培养条件更接近饮用水中

的贫营养环境,因此其结果较常规营养琼脂培养基高.但是由于自然环境中大多数微生物是不可培养的(Nonculturable),所以 DVC 结果又远高于平板计数结果.

萘啶酮酸可以抑制细菌 DNA 的复制,但不影响细胞中其它合成途径的继续运转,在一定浓度营养物存在下,菌体伸长、变大(如图 2 所示).但是由于部分格兰氏阳性及格兰氏阴性菌对萘啶酮酸有抗性,低浓度的 NA 不能抑制它们的繁殖,致使计数结果出现偏差^[4]. BacLight 是近年来由分子探针公司研制出的新型荧光染色剂,由 SYTO9 和碘化丙锭(propidium iodide) 2 种核酸探针组成. SYTO9 能将

所有细菌染色,发绿色荧光,而碘化丙锭能穿透细胞膜受损细胞,发红色荧光(如图 2 所示)^[5]. 由于碘化丙锭只能穿透受损细胞,因此部分细胞膜完好但实际不能存活的部分细菌未能被染色,这就导致了 BacLight 的活菌计数结果高于 CTC、NA 的计数结果.应用 CTC 进行活菌计数时,由于细菌的呼吸作用,CTC 被还原成 CTF(CTC Formazan),其在荧光显微镜下发红色荧光(如图 2 所示)^[6],从理论上讲,CTC 方法的基本原理是利用活细胞的呼吸作用,因此能够比较准确地反映活细菌的数量,而且该方法的试验费用相对较低,适合实验室研究使用.

2.2 消毒试验大肠杆菌计数



图 2 活菌计数法荧光染色图像(照片均为纯菌培养后所摄,放大倍数为近似值,仅供参考)

Fig.2 The images of fluorescent staining methods

实验室通过配水试验,考察一定浓度余氯对大肠菌群的灭活效果,大肠菌群计数方法采用常规膜滤法和 DVC 方法.当初始加氯量 0.5 mg/L 时,存活细菌数与时间的关系如图 3 所示.

不能准确反映水体中微生物的存活状况.

3 结论

(1)显微镜直接计数的结果远远高于常规平板计数,更能准确反映饮用水中的微生物数量.

(2)活菌计数中计数结果大小顺序为: DVC-BacLight > DVC-CTC > DVC-N.A. > R2A > 营养琼脂.其中 CTC 方法能够比较准确地反映活细菌的数量,而且该方法的试验费用相对较低,适合实验室研究使用.

(3)在考察消毒剂对细菌的灭活效果时,直接计数可以更准确地反映细菌存活的情况.

参考文献:

- [1] 王占生,等. 微污染源饮用水处理[M]. 北京:中国建筑工业出版社,1999.236 ~ 243 .
- [2] Hobbie J E, *et al.* Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy[J]. Appli. Environ. Microbiol., 1976, **33**(5):1225 ~ 1228 .
- [3] 俞毓馨,等. 环境工程微生物检验手册[M]. 北京:中国环境科学出版社,1990.136 ~ 144 .
- [4] Kazuhiro Kogure, *et al.* An improved direct viable count method for aquatic bacteria[J]. Arch. Hydrobiol., 1984, **102**: 117 ~ 122 .
- [5] Lina Boulou, *et al.* LIVE/ DEAD BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water [J]. J. Microbiological Methods., 1999, **37**:77 ~ 86 .
- [6] Rodriguez G G, *et al.* Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. Appli. Environ. Microbiol., 1992, **58**(6):1801 ~ 1808 .

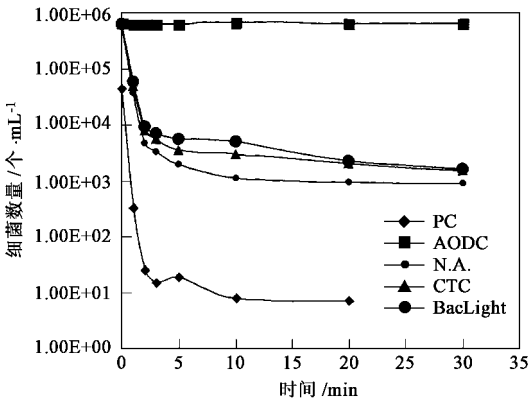


图 3 存活细菌数与时间的关系

Fig.3 The relationship of time and the number of the live bacteria

从图 3 中可以看出, AODC 计数结果基本不随时间变化,始终停留在初始量级 10^5 . N.A., CTC, BacLight 3 种药剂的 DVC 计数结果基本相同,从 10^5 逐渐下降到 10^3 . 传统的膜滤法平板计数结果同样都随着时间的推移而逐渐减少,但是计数结果与 DVC 方法存在显著的差异,这说明常规计数方法并