

环境样品中粪大肠菌群的酶底物法检测技术改进与应用

梁嘉滢

广州普诺环境检测技术服务有限公司, 中国·广东 广州 510000

摘要: 酶底物法作为检测粪大肠菌群的重要技术, 以其快速、简便的特性在环境监测中得到应用。然而, 面对复杂多样的环境样品, 该技术在实际应用中仍面临前处理要求高、抗干扰能力弱及操作标准化不足等挑战。本文系统阐述了酶底物法的现行标准流程及其在不同环境样品检测中遇到的干扰问题。在此基础上, 提出了针对样品前处理、检测准确性以及操作流程三个核心环节的综合性改进策略。进一步探讨了改进后技术在复杂样品中的应用路径, 并围绕质量控制与人员培训阐述了确保技术可靠性与推广性的关键措施, 旨在为提升环境微生物监测的效能与准确性提供参考。

关键词: 环境样品; 粪大肠菌群; 酶底物法; 技术改进

Improvement and Application of Enzyme Substrate Method for Detecting Fecal Coliforms in Environmental Samples

Liang Jiaying

Guangzhou Puno Environmental Testing Technology Service Co., Ltd., China Guangdong Guangzhou 510000

Abstract: As an important technology for detecting fecal coliforms, the enzyme substrate method has been applied in environmental monitoring due to its rapid and simple characteristics. However, in the face of complex and diverse environmental samples, this technology still faces challenges such as high requirements for sample pretreatment, weak anti-interference ability and insufficient operational standardization in practical application. This paper systematically expounds the current standard procedure of the enzyme substrate method and the interference problems encountered in the detection of different environmental samples. On this basis, a comprehensive improvement strategy is proposed for three core links including sample pretreatment, detection accuracy and operation procedure. Furthermore, the application path of the improved technology in complex samples is discussed, and the key measures to ensure the reliability and popularization of the technology are elaborated around quality control and personnel training, aiming to provide a reference for improving the efficiency and accuracy of environmental microbial monitoring.

Keywords: Environmental samples; Fecal coliforms; Enzyme substrate method; Technology improvement

0 引言

粪大肠菌群是评价水质卫生与环境污染状况的关键指示微生物。其检测结果的准确性与时效性直接关系到环境质量评估与公共卫生风险研判。相较于传统的多管发酵法和滤膜法, 酶底物法凭借其检测周期短、操作步骤简化、结果判读客观等优点, 正逐步成为环境监测领域的重要选择。该技术通过检测菌群特异性酶反应实现定性与定量结合, 但环境样品的复杂性对检测稳健性提出更高要求。不同样品基质中悬浮物、重金属等可能干扰酶反应, 影响结果可靠性。需优化技术环节以提升抗干扰能力和普适性, 建立质量控制体系, 推动技术更广泛应用。

1 酶底物法检测技术的现状与应用挑战

1.1 酶底物法检测技术的现行标准与流程

目前, 酶底物法的实际操作主要遵循国家及行业颁布的相关技术规范与标准方法。其核心流程可系统划分为四个基本阶段, 包括样品采集与运输、样品前处理、接种与培养以及最终的结果判读。标准方法中对培养温度、培养时间等关键参数作出了明确规定, 同时明确了阳性结果的判定依据, 即通过观察专用培养容器内是否出现特异性荧光信号, 来判断样品中粪大肠菌群的存在与否并进行定量估计。该标准化流程统一了关键操作环节, 为不同实验室之间检测结果的可比性与一致性提供了重要基础。然而,

现行标准在样品前处理环节上的规定仍相对简略,尤其针对成分复杂、基质干扰较大的实际样本——如高浊度水样、含有大量有机或无机杂质的固体环境样品等,缺乏系统、详尽且具有针对性的前处理指导方案。尽管现有流程的刚性设计保障了操作的基础规范性,但也因其灵活性不足,难以全面适应不同类型环境样品在实际检测过程中的特殊需求。

1.2 不同环境样品对检测过程的干扰分析

环境样品基质复杂性是影响酶底物法检测准确性与可靠性的主要干扰来源。例如,在地表水与生活污水样品中,常存在大量悬浮颗粒物和有机碎屑,这些物质不仅可能吸附粪大肠菌群细胞,阻碍其与酶底物间的充分接触,导致菌体未被有效检测、结果低估;同时也可能因自身携带类荧光物质或具有类似荧光特性的成分,产生非特异性荧光信号,造成假阳性判读。工业废水样品中可能含有的重金属离子、毒性有机污染物或极端 pH 条件,会对目标菌群的酶活性产生抑制,甚至直接导致细菌失活或死亡,从而引起假阴性结果。此外,如管网水或经过消毒处理的废水样品中若存在较高浓度余氯,且中和不彻底时,会持续抑制或杀灭目标微生物,严重影响检出率。另一样品基质中的常见干扰来源于非目标微生物,某些菌种也可能产生类似的酶类活性,引发交叉反应,干扰特异性检测结果。这些多样化的干扰因素常常共同存在、相互叠加,致使统一的标准前处理程序难以全面应对所有实际样品的特殊性^[1]。

1.3 现行技术在应用中存在的主要问题

基于当前技术标准与实际样品干扰因素的综合分析,酶底物法在现实环境监测应用中主要暴露出以下几类问题。首要问题是检测结果准确性受样品基质影响显著。在面对高浊度、深颜色或含高毒性物质的复杂环境样品时,该方法的检测结果往往与国标参考方法相比存在较大偏差,严重影响数据的可靠性与公信力。其次,方法灵敏度在复杂基质背景下可能出现明显下降。各类干扰物质的共存抬高了本底噪声水平,使得低浓度粪大肠菌群的检出限提高,削弱了其在环境监测与早期污染预警方面的应用价值。第三,标准操作流程在实际应用中适应性仍显不足。由于未能系统涵盖不同特性样品的个性化前处理需求,实际操作人员往往需依赖个人经验进行额外步骤,这不仅增加了操作的主观随意性,也引入了结果的不确定性。最后,全面质量控制环节仍有待完善。从样品采集、保存、运输,到前处理、培养和结果读数的全过程中,缺乏统一、系统且便于执行的内部质量控制与结果核查机制,难以实现对检测系统稳定性和数据一致性的持续监控与评估^[2]。

2 酶底物法检测技术的改进策略

2.1 针对样品前处理的系统化优化策略

样品前处理是环境微生物检测流程中至关重要的一步,其质量直接决定了最终检测结果的可靠性与准确性,因此必须针对不同类型的样品建立精细化、标准化的操作方案。对于浊度较高的水体样本,应系统研究并规范均质化处理程序及静置沉降条件,深入探索在较低离心力条件下进行温和离心或采用梯度过滤技术,在最大限度保留菌体完整性和活性的同时有效去除悬浮颗粒物干扰。针对成分复杂、可能含有重金属、有毒有机物等抑制成分的工业废水样品,需发展并标准化系列稀释与化学中和方法,同时研究在预处理阶段添加金属螯合剂(如 EDTA)或有机保护剂(如吐温 80)等物质,以有效缓解毒性物质对目标微生物的抑制作用,提高菌群回收率。对于可能存在余氯的样品(如自来水或经氯化消毒的废水),应通过系统实验验证硫代硫酸钠等中和剂的最佳投加量与反应时间,确保氯被完全中和且不引入二次干扰。最终,应建立一套基于样品来源、浊度、pH、电导率等性状指标进行快速判别并匹配相应前处理方法的决策流程图,推动前处理操作的标准化与规范化。

2.2 提高检测准确性与灵敏度的关键技术途径

在核心检测环节,技术优化的核心目标是增强信号响应的特异性并有效提高信噪比,从而显著提升方法的准确度与灵敏度。一方面,可针对酶底物反应体系开展深入研究,通过引入选择性代谢抑制剂或对现有底物分子结构进行修饰,进一步提高其对粪大肠菌群特征酶(如 β -半乳糖苷酶)的催化特异性,抑制非目标菌群的交叉反应,降低假阳性概率。另一方面,可探索结合荧光信号放大技术,例如使用高量子产率的荧光染料或引入核酸扩增策略,同时研究有效的背景荧光淬灭方法,从而提高阳性信号的强度和辨识度,增强对低生物量样品的检出能力。此外,还应系统研究不同环境基质(如污水、河水、海水等)对荧光读数的影响机制,建立适用于不同介质类型的阳性判定阈值或数量校正模型,使荧光结果能够更真实、准确地反映实际菌群数量,显著降低由基质效应引起的系统性偏差^[3]。

2.3 操作流程简化与检测时效提升的可行性路径

在实际应用场景中,在保证检测准确度的前提下,如何简化操作步骤、缩短检测周期具有重要的现实意义。应积极推动检测设备与配套耗材的集成化、微型化和自动化发展,例如开发一体式、预制有培养基和显色剂的一次性检测单元,用户仅需注入样品即可直接进行培养与读数,省去繁琐的试剂配制、分装、灭菌等中间环节,大幅降低

操作复杂度及外来污染风险。同时,应深入研究缩短培养时间的可行性,在保证灵敏度不降低的前提下,探索通过调节培养温度、优化反应 pH、或添加微生物生长促进因子等方式加速目标菌群的代谢活性和酶反应速率。还应编制配套的标准化操作图示、简明手册及视频演示材料,使关键操作步骤可视化、标准化,有助于实验人员快速掌握关键技术要点,减少人为操作误差,全面提升检测效率与实验再现性。

3 改进后技术的应用推广与质量控制

3.1 改进技术在复杂环境样品中的应用策略

为有效推广改进技术,必须制定分层级、差异化的详细应用指南。针对常规较清洁的水体样品,可直接采用已经优化后的标准检测流程,简化操作、提高效率。而对于组成复杂、干扰物质较多的典型复杂环境样品,例如城镇污水处理厂的进出水、重点工业行业排放的特定废水等,则应另行发布专门的应用技术说明文件。这些文件需明确推荐适用的样品前处理方法、详细指出在实际检测过程中可能遇到的各种干扰类型,并提供具体的应对建议与解决方案。此外,应积极鼓励各实验室在正式应用该技术前,开展系统的方法验证工作。通过加标回收实验评估准确度,利用平行比对实验考察重复性与稳定性,从而确认该改进技术对本实验室所测特定类型环境样品的适用性,并获取关键性能指标。同时,建议逐步建立典型复杂环境样品检测的实际案例库,系统整理不同场景下的操作要点与问题处理经验,为同行提供可参考、可复用的实践依据^[4]。

3.2 检测过程中的质量保证与控制措施

质量控制是确保环境检测数据准确可靠的基石,必须贯穿于检测活动的全过程。在实验室内,应定期使用标准菌株或标准质控样品进行阳性对照和阴性对照实验,以持续监控培养基的有效性、仪器设备的稳定性及整体检测条件的可靠性。每一批环境样品的检测均需设置平行样、空白对照,并对所有初筛阳性结果进行必要的确证试验,以排除假阳性,保证结果判断的准确性。在实验室层面之外,鼓励通过积极参加能力验证计划或机构间比对测试,客观评估和提升自身检测水平的一致性与稳定性。此外,应着力构建覆盖样品接收、保存运输、前处理、仪器检测直至最终报告发放的全流程记录与追溯体系。确保每个环节均有清晰、完整的记录,使得潜在问题可被快速定位、及时纠正,从而实现质量管理闭环,保障数据真实可靠。

3.3 操作人员的规范化培训与技术普及

任何技术方法的有效执行和落地应用,根本上依赖于操作人员的专业能力和技术素养。应组织编制内容统一、

要点突出的改进技术培训教材与实操手册,并据此开展系统化、多层次的培训工作。培训内容不应仅局限于改进后的操作步骤,还应深入讲解技术方法的原理机制、本次改进的核心要点、常见干扰因子的表现形式及其背后的应对原理,从而全面提升操作人员的理论认知水平和实际问题解决能力。建立并实施操作人员上岗资格考核与周期性的再评估制度,确保其能力持续符合岗位要求。在更大范围内,应通过学术会议、专题技术研讨会、典型应用现场示范等多种形式,积极向整个环境监测网络宣传和普及该改进技术的先进性、适用性与标准化操作规范,促进该技术获得更广泛的接受度和应用面,最终形成推动全行业检测能力整体提升的强大合力^[5]。

4 结语

酶底物法为环境样品中粪大肠菌群的监测提供了高效便捷的工具,但其实际应用效能深受复杂样品基质的制约。通过剖析该技术在当前应用中面临的前处理瓶颈、干扰难题以及标准化不足等问题,论证了对其进行系统性改进的必要性。所提出的改进策略,从前处理的精准优化、检测环节的灵敏度与特异性提升,到操作流程的合理简化,构成了一个环环相扣的技术增强体系。这些改进旨在使方法更具韧性与适应性,能够更准确地应对多样化的环境监测场景。然而,技术的改进并非终点,其价值的真正实现有赖于严谨的质量控制与规范化的推广应用。建立覆盖全流程的质量保证措施,并加强对技术人员的系统培训与普及,是确保改进后技术产出可靠数据、赢得广泛信任的根本保障。持续推进酶底物法的优化与实践,对于提升环境微生物监测工作的效率、准确性与标准化水平,从而更科学地评估环境风险、保障公众健康,具有积极而重要的意义。

参考文献:

- [1] 王前江,王怡,张馨文等.粪大肠菌群酶底物法在环境监测中的应用性研究[J].山东化工,2022(010):051.
- [2] 王恩霞,谭海廷,邢峰杰.酶底物法测定水中粪大肠菌群的方法验证及与其他主要方法的对比[J].Water Conservancy & Electric Power Technology & Application, 2023, 5(9).DOI:10.37155/2717-5251-0509-85.
- [3] 林健.酶底物法检测医疗机构废水中粪大肠菌群的适用性分析[J].海峡科学,2022(10):43-45.
- [4] 李淑辉.酶底物法和多管发酵法在废水粪大肠菌群检测中的对比[J].中国资源综合利用,2023, 41(8):21-23. DOI:10.3969/j.issn.1008-9500.2023.08.007.
- [5] 王莉莉,蒙金燕.滤膜法与酶底物法检测污水中粪大肠菌群的比较分析[J].大众科技,2023, 25(3):49-52.