

ICS 13.060
B 21
备案号: 62033-2019

DB21

辽 宁 省 地 方 标 准

DB21/T 3111—2019

水质 肠球菌的测定
固定底物技术酶底物法

Water quality—Determination of *Enterococci*—Defined substrate technology
enzyme substrate method

2019-02-28 发布

2019-03-28 实施

辽宁省市场监督管理局 发布

目 次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 方法原理 1

5 试剂和材料 2

6 仪器和设备 2

7 样品 3

8 分析步骤 3

9 结果计算与表示 4

10 精密度和准确度 4

11 质量保证和质量控制 5

12 废物处理 5

13 注意事项 5

附录 A 6



前 言

本标准依据GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》起草制订。

本标准附录A为规范性附录。

本标准由大连市市场监督管理局提出。

本标准由辽宁省生态环境厅归口。

本标准起草单位：大连市环境监测中心、国家海洋环境监测中心。

本标准主要起草人：王中卫、明红霞、李翔宇、沈学崑、李玉璞、苏洁、曲翊、王琳琳、刘子成、孙沛雯、刘景泰、韩佳。



水质 肠球菌的测定 固定底物技术酶底物法

1 范围

本标准规定了测定水中肠球菌的固定底物技术酶底物法。

本标准适用于地表水、地下水、饮用水、海水、生活废水和工业废水中肠球菌的测定。

本标准的检出限：地表水、地下水、饮用水、生活废水、工业废水样品的检出限为1 CFU/100 ml，海水样品的检出限为10 CFU/100 ml。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 5750.2 生活饮用水标准检验方法 样品的采集与保存

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 17378.7 海洋监测规范 第七部分：近海污染生态调查和生物监测

HJ/T 164 地下水环境监测技术规范

HJ/T 91 地表水和污水监测技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1 肠球菌 *Enterococci*

41 ℃培养24 h，能产生 β -半乳糖苷酶（ β -D-galactosidase），分解选择性培养基中的4-甲基伞形酮- β -D-葡萄糖醛酸苷（4-methyl-umbelliferyl- β -D-glucoside，MUG）释放出荧光物质（4-甲基伞形酮）的革兰氏阳性菌。

3.2 最大可能数 most probable number (MPN)

又称稀释培养计数，是一种基于泊松分布的间接计数法。利用统计学原理，根据一定体积不同稀释度样品经培养后产生的目标微生物阳性数，查表估算一定体积样品中目标微生物存在的数量（单位体积存在目标微生物的最大可能数）。

4 方法原理

在特定温度下培养特定的时间，肠球菌能产生 β -半乳糖苷酶，分解荧光底物释放出荧光产物，在366 nm紫外灯照射下产生特征性荧光。统计荧光反应出现数量，查MPN表，计算样品中肠球菌的浓度值。

5 试剂和材料

除非另有说明，分析时均使用符合国家标准和分析纯试剂，符合GB/T 6682 三级标准的蒸馏水或去离子水。

5.1 培养基

市售Enterolert培养基，也可以使用其他等效产品。

5.2 硫代硫酸钠溶液： ρ ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) = 0.10 g/ml

称取硫代硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 10.0 g，溶于适量实验用水，定容至100 ml，临用现配。

5.3 乙二胺四乙酸二钠溶液： ρ ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) = 0.15 g/ml

称取乙二胺四乙酸二钠 ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 15.0 g，溶于适量实验用水，定容至100 ml，此溶液保质期为30 d。

5.4 无菌水

实验用水经121 °C高压蒸汽灭菌20 min，备用。

6 仪器和设备

6.1 恒温培养箱：能够恒温至41 °C，控温精度0.5 °C。

6.2 高压蒸汽灭菌器：能够加热至121 °C。

6.3 紫外灯：台式，366 nm。

6.4 封口机：用于定量盘的封口。

6.5 采样瓶：具螺旋帽或磨口塞的250 ml玻璃瓶。

6.6 三角瓶：100 ml。

6.7 97孔定量盘。

6.8 一般实验室常用仪器和设备。

注：移液管、量筒、采样瓶、三角瓶等玻璃器皿和采样器具应按无菌操作要求包扎，于121℃高压蒸汽灭菌20 min，烘干，备用。灭菌后的采样瓶，两周内未使用，需重新灭菌。

7 样品

7.1 样品采集与保存

按照 GB/T 5750.2、GB 17378.7、HJ/T 164 和 HJ/T 91 的相关规定进行样品采集。采样后水样应在4℃下冷藏保存，6 h 内开始检测。

7.2 干扰和消除

7.2.1 含活性氯（余氯）的水样，在采样瓶灭菌前需加入0.2 ml硫代硫酸钠溶液。

7.2.2 含重金属的水样，在采样瓶灭菌前需加入0.6 ml乙二胺四乙酸二钠溶液。

8 分析步骤

8.1 样品稀释

根据水样污染程度确定稀释度，避免接种水样经培养后出现全部阳性或全部阴性。接种量小于100 ml时，水样应制成稀释样品后使用，接种量为10 ml时，以无菌操作方法取10 ml水样加入到装有90 ml无菌水的三角瓶（6.6）中混匀制成1:10（稀释度）稀释的样品，其它接种量的稀释样品依次类推。

注：海水样品至少经1:10稀释后再进行检测。

8.2 接种

以无菌操作方法量取100 ml原水样或稀释样品于三角瓶（6.6）中，加入1支培养基（5.1），充分混匀，完全溶解后，全部倒入97孔定量盘（6.7）内，以手抚平定量盘（6.7）背面，去除孔内气泡，然后用封口机（6.4）封口。

8.3 培养

将封口后的97孔定量盘（6.7）放入培养箱（6.1）中培养24 h。

8.4 对照试验

8.4.1 空白对照

使用无菌水（5.4）进行实验室空白测定，培养后的97孔定量盘（6.7）不得有荧光产生，否则，该次样品测定结果无效，应重新测定。

8.4.2 阴性及阳性对照

阳性菌株参考使用粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*), 阴性菌株参考使用粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) 和绿脓杆菌 (*Aerococcus viridians*)。将菌株配制成 0.5 麦氏浊度的菌悬液按照 8.2 和 8.3 要求操作, 阳性菌株应呈阳性反应 (有荧光), 阴性菌株呈阴性反应 (无荧光), 否则该批次测定结果无效, 应重新测定。

8.5 结果判读与计数

将培养24 h后的97孔定量盘 (6.7) 进行结果判读, 水样在紫外灯 (6.3) 照射下有荧光, 则判断为肠球菌阳性。若结果可疑, 可延长培养时间到28 h进行结果判读, 超过28 h后出现的荧光反应不作为阳性结果。

9 结果计算与表示

9.1 结果计算

从97孔定量盘法MPN表 (附录A) 中查得每100 ml水样中肠球菌的MPN值, 再根据样品不同的稀释度进行计算, 每100 ml水样中肠球菌的计算公式如下:

$$C = \frac{\text{MPN值}}{f}$$

式中: C ——每100 ml水样中肠球菌浓度, CFU/100 ml;
 MPN值 ——查表得到的MPN值, CFU/100 ml;
 f ——接种样品的稀释度。

9.2 结果表示

测定结果保留两位有效数字, 大于等于100时以科学计数法表示, 结果单位为CFU/100 ml。

10 精密度和准确度

10.1 精密度

多家实验室分别对肠球菌有证标准样品 (221 ± 37 CFU/100 ml) 和低浓度 (5CFU/100 ml)、中浓度 (980CFU/100 ml)、高浓度 (114500 CFU/100 ml) 实际样品进行了测定, 实验室内的相对标准偏差范围分别为: 4.3%~5.9%、14%~22%、2.4%~4.0%、1.1%~1.4%; 实验室间的相对标准偏差分别为: 0.81%、11.2%、0.92%、0.34%; 重复性限为 0.32、0.42、0.25、0.15; 再现性限为 0.32、0.46、0.25、0.14。

10.2 准确度

多家实验室对肠球菌有证标准样品 (221 ± 37 CFU/100 ml) 进行测定, 实验室内相对误差的范围是 -1.4%~-2.9%, 相对误差的最终值为 $-2.0\% \pm 1.6\%$ 。

注: 微生物检测数据为偏态分布, 其测定结果全部经以10为底对数转换后进行计算。

11 质量保证和质量控制

每批次样品均需进行空白对照试验。每批次实验至少取待测样品数量的 10 %，进行平行双样分析，其检测所得数值全部经对数（以 10 为底）转换后数值的相对标准偏差 $\leq 25\%$ 。不同批次培养基需用有证标准菌株/标准样品进行培养基质量检验，其测定值应在保证值范围内。

12 废物处理

实验产生的废物经 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min 后，作为一般废物处理。

13 注意事项

在进行结果判读时，实验人员应带手套在黑暗环境下进行，确保荧光对准定量盘，避免直射眼睛和皮肤。



附录 A

(规范性附录)

97孔定量盘法MPN表 (CFU/100 ml)

大孔阳 性格数	小孔阳性格数																								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
0	<1	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0	12.0	13.0	14.1	15.1	16.1	17.1	18.1	19.1	20.2	21.2	22.2	23.3	24.3
1	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.1	8.1	9.1	10.1	11.1	12.1	13.2	14.2	15.2	16.2	17.3	18.3	19.3	20.4	21.4	22.4	23.5	24.5	25.6
2	2.0	3.0	4.1	5.1	6.1	7.1	8.1	9.2	10.2	11.2	12.2	13.3	14.3	15.4	16.4	17.4	18.5	19.5	20.6	21.6	22.7	23.7	24.8	25.8	26.9
3	3.1	4.1	5.1	6.1	7.2	8.2	9.2	10.3	11.3	12.4	13.4	14.5	15.5	16.5	17.6	18.6	19.7	20.8	21.8	22.9	23.9	25.0	26.1	27.1	28.2
4	4.1	5.2	6.2	7.2	8.3	9.3	10.4	11.4	12.5	13.5	14.6	15.6	16.7	17.8	18.8	19.9	21.0	22.0	23.1	24.2	25.3	26.3	27.4	28.5	29.6
5	5.2	6.3	7.3	8.4	9.4	10.5	11.5	12.6	13.7	14.7	15.8	16.9	17.9	19.0	20.1	21.2	22.2	23.3	24.4	25.5	26.6	27.7	28.8	29.9	31.0
6	6.3	7.4	8.4	9.5	10.6	11.6	12.7	13.8	14.9	16.0	17.0	18.1	19.2	20.3	21.4	22.5	23.6	24.7	25.8	26.9	28.0	29.1	30.2	31.3	32.4
7	7.5	8.5	9.6	10.7	11.8	12.8	13.9	15.0	16.1	17.2	18.3	19.4	20.5	21.6	22.7	23.8	24.9	26.0	27.1	28.3	29.4	30.5	31.6	32.8	33.9
8	8.6	9.7	10.8	11.9	13.0	14.1	15.2	16.3	17.4	18.5	19.6	20.7	21.8	22.9	24.1	25.2	26.3	27.4	28.6	29.7	30.8	32.0	33.1	34.3	35.4
9	9.8	10.9	12.0	13.1	14.2	15.3	16.4	17.6	18.7	19.8	20.9	22.0	23.2	24.3	25.4	26.6	27.7	28.9	30.0	31.2	32.3	33.5	34.6	35.8	37.0
10	11.0	12.1	13.2	14.4	15.5	16.6	17.7	18.9	20.0	21.1	22.3	23.4	24.6	25.7	26.9	28.0	29.2	30.3	31.5	32.7	33.8	35.0	36.2	37.4	38.6
11	12.2	13.4	14.5	15.6	16.8	17.9	19.1	20.2	21.4	22.5	23.7	24.8	26.0	27.2	28.3	29.5	30.7	31.9	33.0	34.2	35.4	36.6	37.8	39.0	40.2
12	13.5	14.6	15.8	16.9	18.1	19.3	20.4	21.6	22.8	23.9	25.1	26.3	27.5	28.6	29.8	31.0	32.2	33.4	34.6	35.8	37.0	38.2	39.5	40.7	41.9
13	14.8	16.0	17.1	18.3	19.5	20.6	21.8	23.0	24.2	25.4	26.6	27.8	29.0	30.2	31.4	32.6	33.8	35.0	36.2	37.5	38.7	39.9	41.2	42.4	43.6
14	16.1	17.3	18.5	19.7	20.9	22.1	23.3	24.5	25.7	26.9	28.1	29.3	30.5	31.7	33.0	34.2	35.4	36.7	37.9	39.1	40.4	41.6	42.9	44.2	45.4
15	17.5	18.7	19.9	21.1	22.3	23.5	24.7	25.9	27.2	28.4	29.6	30.9	32.1	33.3	34.6	35.8	37.1	38.4	39.6	40.9	42.2	43.4	44.7	46.0	47.3
16	18.9	20.1	21.3	22.6	23.8	25.0	26.2	27.5	28.7	30.0	31.2	32.5	33.7	35.0	36.3	37.5	38.8	40.1	41.4	42.7	44.0	45.3	46.6	47.9	49.2
17	20.3	21.6	22.8	24.1	25.3	26.6	27.8	29.1	30.3	31.6	32.9	34.1	35.4	36.7	38.0	39.3	40.6	41.9	43.2	44.5	45.9	47.2	48.5	49.8	51.2
18	21.8	23.1	24.3	25.6	26.9	28.1	29.4	30.7	32.0	33.3	34.6	35.9	37.2	38.5	39.8	41.1	42.4	43.8	45.1	46.5	47.8	49.2	50.5	51.9	53.2
19	23.3	24.6	25.9	27.2	28.5	29.8	31.1	32.4	33.7	35.0	36.3	37.6	39.0	40.3	41.6	43.0	44.3	45.7	47.1	48.4	49.8	51.2	52.6	54.0	55.4
20	24.9	26.2	27.5	28.8	30.1	31.5	32.8	34.1	35.4	36.8	38.1	39.5	40.8	42.2	43.6	44.9	46.3	47.7	49.1	50.5	51.9	53.3	54.7	56.1	57.6
21	26.5	27.9	29.2	30.5	31.8	33.2	34.5	35.9	37.3	38.6	40.0	41.4	42.8	44.1	45.5	46.9	48.4	49.8	51.2	52.6	54.1	55.5	56.9	58.4	59.9
22	28.2	29.5	30.9	32.3	33.6	35.0	36.4	37.7	39.1	40.5	41.9	43.3	44.8	46.2	47.6	49.0	50.5	51.9	53.4	54.8	56.3	57.8	59.3	60.8	62.3
23	29.9	31.3	32.7	34.1	35.5	36.8	38.3	39.7	41.1	42.5	43.9	45.4	46.8	48.3	49.7	51.2	52.7	54.2	55.6	57.1	58.6	60.2	61.7	63.2	64.7
24	31.7	33.1	34.5	35.9	37.3	38.8	40.2	41.7	43.1	44.6	46.0	47.5	49.0	50.5	52.0	53.5	55.0	56.5	58.0	59.5	61.1	62.6	64.2	65.8	67.3
25	33.6	35.0	36.4	37.9	39.3	40.8	42.2	43.7	45.2	46.7	48.2	49.7	51.2	52.7	54.3	55.8	57.3	58.9	60.5	62.0	63.6	65.2	66.8	68.4	70.0
26	35.5	36.9	38.4	39.9	41.4	42.8	44.3	45.9	47.4	48.9	50.4	52.0	53.5	55.1	56.7	58.2	59.8	61.4	63.0	64.7	66.3	67.9	69.6	71.2	72.9
27	37.4	38.9	40.4	42.0	43.5	45.0	46.5	48.1	49.6	51.2	52.8	54.4	56.0	57.6	59.2	60.8	62.4	64.1	65.7	67.4	69.1	70.8	72.5	74.2	75.9
28	39.5	41.0	42.6	44.1	45.7	47.3	48.8	50.4	52.0	53.6	55.2	56.9	58.5	60.2	61.8	63.5	65.2	66.9	68.6	70.3	72.0	73.7	75.5	77.3	79.0
29	41.7	43.2	44.8	46.4	48.0	49.6	51.2	52.8	54.5	56.1	57.8	59.5	61.2	62.9	64.6	66.3	68.0	69.8	71.5	73.3	75.1	76.9	78.7	80.5	82.4
30	43.9	45.5	47.1	48.7	50.4	52.0	53.7	55.4	57.1	58.8	60.5	62.2	64.0	65.7	67.5	69.3	71.0	72.9	74.7	76.5	78.3	80.2	82.1	84.0	85.9
31	46.2	47.9	49.5	51.2	52.9	54.6	56.3	58.1	59.8	61.6	63.3	65.1	66.9	68.7	70.5	72.4	74.2	76.1	78.0	79.9	81.8	83.7	85.7	87.6	89.6
32	48.7	50.4	52.1	53.8	55.6	57.3	59.1	60.9	62.7	64.5	66.3	68.2	70.0	71.9	73.8	75.7	77.6	79.5	81.5	83.5	85.4	87.5	89.5	91.5	93.6
33	51.2	53.0	54.8	56.5	58.3	60.2	62.0	63.8	65.7	67.6	69.5	71.4	73.3	75.2	77.2	79.2	81.2	83.2	85.2	87.3	89.3	91.4	93.6	95.7	97.8
34	53.9	55.7	57.6	59.4	61.3	63.1	65.0	67.0	68.9	70.8	72.8	74.8	76.8	78.8	80.8	82.9	85.0	87.1	89.2	91.4	93.5	95.7	97.9	100.2	102.4
35	56.8	58.6	60.5	62.4	64.4	66.3	68.3	70.3	72.3	74.3	76.3	78.4	80.5	82.6	84.7	86.9	89.1	91.3	93.5	95.7	98.0	100.3	102.6	105.0	107.3
36	59.8	61.7	63.7	65.7	67.7	69.7	71.7	73.8	75.9	78.0	80.1	82.3	84.5	86.7	88.9	91.2	93.5	95.8	98.1	100.5	102.9	105.3	107.7	110.2	112.7
37	62.9	65.0	67.0	69.1	71.2	73.3	75.4	77.6	79.8	82.0	84.2	86.5	88.8	91.1	93.4	95.8	98.2	100.6	103.1	105.6	108.1	110.7	113.3	115.9	118.6
38	66.3	68.4	70.6	72.7	74.9	77.1	79.4	81.6	83.9	86.2	88.6	91.0	93.4	95.8	98.3	100.8	103.4	105.9	108.6	111.2	113.9	116.6	119.4	122.2	125.0
39	70.0	72.2	74.4	76.7	78.9	81.3	83.6	86.0	88.4	90.9	93.4	95.9	98.4	101.0	103.6	106.3	109.0	111.8	114.6	117.4	120.3	123.2	126.1	129.2	132.2
40	73.8	76.2	78.5	80.9	83.3	85.7	88.2	90.8	93.3	95.9	98.5	101.2	103.9	106.7	109.5	112.4	115.3	118.2	121.2	124.3	127.4	130.5	133.7	137.0	140.3
41	78.0	80.5	83.0	85.5	88.0	90.6	93.3	95.9	98.7	101.4	104.3	107.1	110.0	113.0	116.0	119.1	122.2	125.4	128.7	132.0	135.4	138.8	142.3	145.9	149.5
42	82.6	85.2	87.8	90.5	93.2	96.0	98.8	101.7	104.6	107.6	110.6	113.7	116.9	120.1	123.4	126.7	130.1	133.6	137.2	140.8	144.5	148.3	152.2	156.1	160.2
43	87.6	90.4	93.2	96.0</																					

7