

ICS 编号
CCS 编号

团 体 标 准

T/LNHES XXX—XXXX

水质 菌落总数的测定 酶底物法

Water quality—Determination of Total bacteria — Heterotrophic
Plate Count method

(征求意见稿)

20XX-XX-XX 发布

20XX-XX-XX 实施

辽宁省水利学会 发布

目 次

前 言	10
1 适用范围	11
2 规范性引用文件	11
3 术语和定义	11
4 方法原理	11
5 试剂和材料	11
6 仪器和设备	12
7 样品	13
8 分析步骤	13
9 实验数据处理	13
10 精密度和正确度	16
11 质量保证和质量控制	16
12 废物处理	17
附录 A（资料性附录）菌落总数检测记录推荐格式	10
参考文献	11

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020 《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》、GB/T 20001.4—2015 《标准编写规则 第 4 部分：试验方法标准》和 T/CHES 53—2021 《水质监测分析方法标准编制技术导则》的规定起草。

本文件共分为 12 章和 1 个附录，主要内容包括酶底物法测定水中菌落总数的适用范围、方法原理、方法测定所用的试剂和材料、样品的采集与保存以及具体的分析步骤等。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由辽宁省水利学会归口。

本文件主编单位：辽宁省河库管理服务中心（辽宁省水文局）

本文件主要起草人：吕宝阔、李荧荧、周宇、白伟桦、费卓越、周鸿飞、周寒、孙阳、万太斌、景丽彬、刘阳、孙岩、张静、胡耘赫、李芳雨。

水质 菌落总数的测定 酶底物法

1 适用范围

本文件规定了饮用水和地下水中菌落总数的测定方法。

本文件适用于饮用水和地下水中菌落总数的测定。

本文件未稀释水样的检测范围为 $\leq 738\text{MPN/mL}$ 。当样品中菌落总数含量超过 738MPN/mL 时，宜经稀释后测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 5750.12—2023 生活饮用水标准检测方法 第12部分：微生物指标

EPA 40 CFR Part 136.9215 水环境中细菌总数的测定

EPA 9223 大肠菌群检测 B 酶底物法

SL 219-2013 水环境监测规范

HJ 1000-2018 水质 细菌总数的测定 平皿计数法

3 术语和定义

3.1 菌落总数 Total bacteria

在一定条件下，经一定时间培养所得单位体积水样中的微生物菌落的总数。

3.2 最大可能数 Most probable number; MPN

一种源自于统计学和微生物学结合的定量检测方法。基于泊松分布，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，估算一定体积样品中目标微生物存在的数量，即单位体积目标微生物的最大可能数。

4 方法原理

利用复合酶技术，在培养基中加入多种独特的酶底物，每一种酶底物都针对不同的细菌酶设计，且包含最常见的介水传播的细菌，所有的酶底物在被分解时均产生相同的信号。检测过程中，水样中存在的细菌分解一种或者多种酶底物，之后产生一个相同的信号，在检测菌落总数时，这个信号即为在波长 366nm 紫外灯下所产生的荧光。复合酶底物培养基中的酶底物被微生物酶水解，在 $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 下培养 48h 后能够最大限度地释放4-甲基伞形酮，4-甲基伞形酮在 366nm 紫外灯照射下发出蓝色荧光，对呈现蓝色荧光的培养盘孔槽计数并查阅MPN表，可以确定原始水样中最可能的菌落总数。

5 试剂和材料

除非另有说明，分析时均使用符合国家标准的分析纯试剂或生物试剂，实验用水

为蒸馏水或去离子水。

5.1 复合酶底物培养基

5.1.1 成分

可根据如下成分配制，也可选用符合质量控制要求的制品：

a)	葡萄糖	1.25g
b)	无水硫酸镁	0.2g
c)	蛋白胨	5.0g
d)	酵母提取物	3.5g
e)	4-甲基伞形酮磷酸酯	0.0375g
f)	4-甲基伞形酮-β-D-葡萄糖苷	0.03g
g)	纯水	1000mL

5.1.2 制法

将上述成分溶解于纯水中，用 0.1 mol/L HCL 或 0.1 mol/L NaOH 溶液，调整 pH 为 6.7~7.3，经 0.22 μm 滤膜过滤除菌，或经 121℃ 高压蒸汽灭菌 20min。制备好的培养基于 2~8℃ 条件下保存备用，48h 以内有效。成品培养基则按照产品说明书要求进行保存，一般于 2~30℃ 条件下避光干燥保存，15 个月内有效。

5.2 生理盐水

5.2.1 成分

按如下成分配制：

a)	氯化钠	8.5g
b)	纯水	1000mL

5.2.2 制法

充分溶解后，经 121℃ 高压蒸汽灭菌 20min。

5.3 硫代硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)。

5.4 乙二胺四乙酸二钠($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。

5.5 硫代硫酸钠溶液: $\rho(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)=0.10\text{mg/L}$

称取 15.7g 硫代硫酸钠 (5.3)，溶于适量水中，定容至 100mL，临用现配。

5.6 乙二胺四乙酸二钠溶液: $\rho(\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O})=0.15\text{mg/L}$

称取 15g 乙二胺四乙酸二钠 (5.4)，溶于适量水中，定容至 100mL，此溶液可保存 30 天。

5.7 盐酸: $\rho(\text{HCL})=0.1\text{mol/L}$ 。

5.8 氢氧化钠: $\rho(\text{NaOH})=0.1\text{mol/L}$ 。

5.9 玻璃珠: 直径 3~8mm。

6 仪器和设备

6.1 采样容器: 无菌玻璃瓶、无菌塑料瓶或无菌塑料袋。

6.2 电子天平: 精度为 0.0001g。

6.3 滤膜: 孔径 0.22 μm。

6.4 抽滤装置。

6.5 高压蒸汽灭菌器: 121℃、101.3kpa。

要求容量足够，能提供均匀的温度，并且能够在 30min 之内达到所需的灭菌温度。

6.6 培养盘: 定量培养用无菌塑料盘，含有 84 个孔槽，每个孔槽容纳 0.06mL 待测水样。

- 6.7 培养箱： $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。
- 6.8 紫外灯：波长为 366nm。
- 6.9 pH 计：至少准确至 0.1。
- 6.10 一般实验常用仪器和设备：玻璃器皿要严格灭菌。

7 样品

7.1 样品采集

点位布设及采样频次按照 SL219-2013 的相关规定执行。

如果采集的是含有活性氯的样品，需在样品采集时加入硫代硫酸钠溶液（每 125mL 容积加入 0.1mL 硫代硫酸钠溶液（5.5）），以去除活性氯对细菌的抑制作用；如果采集的是重金属离子含量较高的样品，则在采样瓶灭菌前加入乙二胺四乙酸二钠溶液（每 125mL 容积加入 0.3mL 乙二胺四乙酸二钠溶液（5.6）），以消除干扰。

7.2 样品保存

采样后应在 2h 内检测，否则，应 10°C 以下冷藏但不超过 6h。实验室接样后，不能立即开展检测的，将样品于 4°C 以下冷藏并在 2h 内检测。

8 分析步骤

8.1 水样稀释

检测所需水样为 1mL。若水样污染严重，可对水样进行稀释。以无菌操作方法用无菌吸管或移液器吸取 1mL 充分混匀的水样，注入盛有 9mL 无菌生理盐水的试管中，充分振荡混匀后取 1mL 进行检测，必要时可加大稀释度，以 10 倍逐级稀释。

8.2 接种培养

向无菌试管中加入 9mL 制备好的液体培养基；如选用符合要求的成品培养基，则向装有 0.1g 培养基的试管中加入 9mL 无菌生理盐水。取 1mL 水样加入上述试管中，振荡混匀。

将混匀后的水样倒入培养盘中心位置，将培养瓶盖好，放置在水平桌面上，紧贴桌面顺时针轻柔晃动培养盘，将待测水样分配到培养盘的所有孔槽中。

将培养盘 $90^{\circ} \sim 120^{\circ}$ 竖起，使多余的水样由盘内海绵条吸收，将培养盘缓慢翻转过来，倒置放于 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养箱中，培养 48h。可叠放培养，不宜超过 10 层。

8.3 结果计数

将培养后的培养盘取出，倒置于暗处或紫外灯箱内，在 6W 366nm 紫外等下约 13cm 处观察，记录产生蓝色荧光的孔数。如未放置在紫外灯箱内，观察时需佩戴防紫外线的护目镜。培养盘中的 84 个孔，无论荧光强弱，只要呈现蓝色荧光即为阳性，但海绵条的荧光不计入结果。

9 实验数据处理

9.1 结果报告

根据显蓝色荧光的孔数，对照表 1 查出孔数对应的每毫升样品中的菌落总数的 MPN 值。如果样品进行了稀释，读取结果应乘以稀释倍数并报告之，结果以 MPN/mL 表示。如果所有孔均未显荧光，则可报告为菌落总数未检出。

表 1 菌落总数 MPN 表

阳性孔数	菌落总数/(MPN/mL)	95%置信区间	
		下限	上限
0	<2	<0.3	<14
1	2	0.3	14
2	4	1	16
3	6	2	19
4	8	3	22
5	10	4	25
6	12	6	27
7	15	7	30
8	17	8	33
9	19	10	36
10	21	11	39
11	23	13	42
12	26	15	45
13	28	16	48
14	30	18	51
15	33	20	54
16	35	22	58
17	38	23	61
18	40	25	64
19	43	27	67
20	45	29	70
21	48	31	74
22	51	33	77
23	53	35	80
24	56	38	84
25	59	40	87
26	62	42	91
27	65	44	94
28	68	47	98
29	71	49	102
30	74	51	106
31	77	54	109
32	80	56	113
33	83	59	117
34	86	62	121
35	90	64	126
36	93	67	130
37	97	70	134
38	100	73	139
39	104	76	143

阳性孔数	菌落总数/(MPN/mL)	95%置信区间	
		下限	上限
40	108	79	148
41	112	82	152
42	116	85	157
43	120	88	162
44	124	91	167
45	128	95	173
46	132	98	178
47	137	102	183
48	141	106	189
49	146	109	195
50	151	113	201
51	156	117	207
52	161	121	213
53	166	125	220
54	171	130	227
55	177	134	234
56	183	139	241
57	189	144	249
58	195	149	257
59	202	154	265
60	209	159	273
61	216	165	282
62	223	171	292
63	231	177	302
64	239	183	312
65	248	190	323
66	257	197	335
67	266	204	347
68	276	212	361
69	287	220	375
70	299	229	390
71	311	238	407
72	324	248	425
73	339	258	444
74	355	270	466
75	372	282	491
76	392	296	519
77	414	311	551
78	440	328	589
79	470	348	636
80	507	371	695

阳性孔数	菌落总数/(MPN/mL)	95%置信区间	
		下限	上限
81	555	398	775
82	623	432	899
83	738	476	1146
84	>738	>476	>1146

9.2 不同稀释度的选择及报告方法

选择菌落总数在 ≤ 738 MPN/mL 范围内的稀释度,如果只有一个稀释度的结果符合此范围,则将结果乘以稀释倍数报告结果。

若有两个或两个以上稀释度的结果均落在 ≤ 738 MPN/mL 范围内,则选择稀释度最小的结果乘以稀释倍数报告结果。

若所有稀释度的培养盘上均无蓝色荧光,则以未检出报告结果。

10 精密度和正确度

10.1 精密度

6 个实验室分别对饮用水(含量小于 100MPN/mL)、低含量地下水(含量小于 100MPN/mL)、中含量地下水(含量 100~500MPN/mL)、高含量地下水(含量大于 1000MPN/mL)的四种实际样品进行了 6 次重复测定:实验室内相对标准偏差范围分别为 0.00%~4.93%、0.71%~2.97%、0.98%~2.34%、0.40%~2.45%;6 个实验室分别对同一个有证标准样品(含量为 229MPN/mL,可接受范围为(115~344)MPN/mL)进行了 6 次重复测定:实验室内相对标准偏差范围为 0.02%~2.40%,实验室内间相对标准偏差为 1.19%。

10.2 正确度

6 个实验室分别对菌落总数含量为 229MPN/mL 的标准样品进行了 6 次重复测定:相对误差范围为-3.15%~2.27%,相对误差最终值为-0.41% $\pm$ 4.46%。

注:微生物检测数据为非正态分布,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

11.1 阳性对照

每新购或新配制一批培养基,都应做阳性对照,可选有证的菌落总数质控标样,按其标准证书要求配制标准样品。接种培养步骤应符合 8.2 的要求,按照 8.3 进行结果计数,试验数据处理应符合 9 的要求。

11.2 阴性对照

每新购或新配制一批培养基,都应做阴性对照,用 1mL 无菌水代替实际水样。接种培养步骤应符合 8.2 的要求,试验数据处理应符合 9 的要求。如无荧光产生则为阴性。

对于钙镁离子含量较高的地下水样品,钙镁离子本身不会影响菌落生长,但会导致结果的荧光强度降低,可采用阴性对照进行比照,以便于结果读取。

12 废物处理

使用后的样品瓶和定量盘等器皿和耗材，需经 121℃ 高压灭菌器灭菌 30min。灭菌后器皿方可清洗，废物作为一般废物处理。

附录 A

(资料性附录)

菌落总数检测记录推荐格式

分析日期:

温度 (°C):

湿度 (%):

采样日期:

检测项目			标准依据				检出限		
仪器名称						仪器型号			
培养基 （试剂）		培养温度（℃）		培养体积（mL）		接种日期		观察日期	
序号	站名	接种时间	观察时间	取样体积（mL）	阳性孔数	稀释倍数	含量 （MPN/mL）	平均值 （MPN/mL）	相对偏差 （%）
1									
2									
3									
4									
5									
6									
7									
8									
9									
10									

检测:

校核:

复核:

参考文献

- [1] GB/T 14848-2017 地下水质量标准
- [2] ISO 9308-2018 水质大肠埃希氏菌和大肠菌群检测 第2部分：最大可能数法
- [3] GB4789.28-2024 食品安全国家标准食品 微生物学检验 培养基和试剂的质量要求