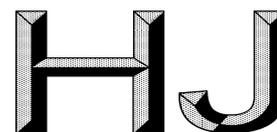


附件 2



中华人民共和国国家环境保护标准

HJ □□□-201□

部分代替HJ/T 347-2007

水质 粪大肠菌群的测定 多管发酵法

Water quality-Determination of fecal coliform-

Manifold zymotechnics

(征求意见稿)

201□-□□-□□发布

201□-□□-□□实施

环 境 保 护 部 发布

目 次

前 言.....	i
1 适用范围.....	1
2 术语和定义.....	1
3 方法原理.....	1
4 干扰和消除.....	1
5 试剂和材料.....	1
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.....	5
11 质量保证和质量控制.....	5
12 废物处理.....	6
附录 A（资料性附录） 最大可能数（MPN）表.....	7

前 言

为贯彻《中华人民共和国环境保护法》和《中华人民共和国水污染防治法》，保护环境，保障人体健康，规范水中粪大肠菌群的测定方法，制定本标准。

本标准规定了测定地表水、地下水和废水中粪大肠菌群的多管发酵法。

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准是对《水质 粪大肠菌群的测定 多管发酵法和滤膜法（试行）》（HJ/T 347-2007）多管发酵法部分的修订，与原标准相比主要修改内容如下：

在干扰与消除、水样、分析步骤、结果计算与表示、精密度和准确度、质量控制和质量保证等方面做了具体的要求。

本标准首次发布于 2007 年，原标准起草单位为中国环境监测总站等单位。本次为第一次修订。

自本标准实施之日起，《水质 粪大肠菌群的测定 多管发酵法和滤膜法（试行）》（HJ/T 347-2007）废止。

本标准由环境保护部环境监测司、科技标准司组织制修订。

本标准主要起草单位：辽宁省环境监测实验中心。

本标准的验证单位：大连市环境监测中心、丹东市环境监测中心站、锦州市环境监测中心站、辽阳市环境监测站、沈阳市疾病预防控制中心、辽宁北方环境检测技术有限公司。

本标准环境保护部 20□□年□□月□□日批准。

本标准自 20□□年□□月□□日起实施。

本标准由环境保护部解释。

水质 粪大肠菌群的测定 多管发酵法

1 适用范围

本标准规定了测定水中粪大肠菌群的多管发酵法。

本标准适用于地表水、地下水和废水中粪大肠菌群的测定。

本方法的检出限：12管法为3 MPN/L，适用于清洁的水样；15管法为20 MPN/L，适用于受到不同程度污染的水样。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

2.1

粪大肠菌群 fecal coliforms

又称耐热大肠菌群。44.5℃培养24 h，能发酵乳糖产酸产气的需氧及兼性厌氧的革兰氏阴性无芽孢杆菌，是总大肠菌群的一部分。

2.2

最大可能数 most probable number, MPN

微生物检验常用发酵法，又称稀释法，是一种利用统计学原理定量检测微生物浓度的方法。它根据不同稀释度一定体积水样中被检微生物存在与否的频率，查表求得水样中微生物的浓度，与直接报告菌落数的平板计数法不同，它最终报告的是水样中最有可能存在的目标微生物浓度，这个以最大可能存在的浓度，就被称为最大可能数（most probable number，缩写为MPN）。

3 方法原理

将一定量的水样，以无菌操作方式接种到含有乳糖培养基的试管中，在特定的温度（44.5℃）培养24 h，当细菌生长繁殖时，产酸使培养液pH值降低，溴甲酚紫由紫色变为黄色，指示产酸；脱氢酶分解底物产生气体，利用倒管指示产气。通过指示剂的颜色变化和倒管中无气体判断是否产酸产气，从而确定是否存在粪大肠菌群，并通过查MPN表，以MPN表示粪大肠菌群浓度值。

4 干扰和消除

氯具有氧化性，较高浓度的重金属离子具有毒性，它们都能破坏微生物细胞内酶的活性，最终导致细胞死亡。可分别加入硫代硫酸钠和乙二胺四乙酸二钠排除氯或重金属的干扰。

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化学试剂。

5.1 乳糖蛋白胨培养液

成分：

蛋白胨	10 g
牛肉浸膏	3 g
乳糖	5 g
氯化钠	5 g
1.6%溴甲酚紫乙醇溶液	1 ml

制法：将蛋白胨、牛肉浸膏、乳糖、氯化钠加热溶解于 1000 ml 蒸馏水或去离子水中，调节 pH 值到 7.2~7.4，再加入 1.6%溴甲酚紫乙醇溶液 1 ml，充分混匀，分装于含有倒置小玻璃管的试管中，115℃高压蒸汽灭菌 20 min，储存于冷暗处备用。

乳糖蛋白胨培养液可选用市售成品培养基。

5.2 三倍乳糖蛋白胨培养液：按上述配方比例三倍（除蒸馏水或去离子水外），配成三倍乳糖蛋白胨培养液，制法同上。

5.3 EC 培养液成分：

胰胨	20 g
乳糖	5 g
胆盐三号	1.5 g
磷酸氢二钾 (K_2HPO_4)	4 g
磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)	1.5 g
氯化钠	5 g

制法：将上述成分或含有上述成分的市售成品加热溶解于 1000 ml 蒸馏水或去离子水中，然后分装于有玻璃倒管的试管中，115℃高压蒸汽灭菌 20 min，灭菌后 pH 值应为 6.9。

5.4 无菌水：新制备的蒸馏水或去离子水经 121℃高压蒸汽灭菌 20 min，备用。

5.5 硫代硫酸钠 ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$)。

5.6 乙二胺四乙酸二钠 ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$)。

5.7 硫代硫酸钠溶液： $\rho(Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O) = 0.10$ g/ml

称取硫代硫酸钠 10 g，溶于适量蒸馏水或去离子水，定容至 100 ml，现配。

5.8 乙二胺四乙酸二钠溶液： $\rho(C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O) = 0.15$ g/ml

称取乙二胺四乙酸二钠 15 g，溶于适量蒸馏水或去离子水中，定容至 100 ml，此溶液保质期 30 d。

6 仪器和设备

6.1 采样瓶：500 ml 带螺旋帽或磨口塞的广口玻璃瓶。

6.2 高压蒸汽灭菌器：121℃、101.3 kpa。

6.3 隔水式恒温培养箱：温度偏差 $\pm 0.5^\circ C$ 。

6.4 pH 计：准确到 0.1 pH 单位。

6.5 接种环：直径 3 mm。

6.6 一般实验室常用仪器和设备。

注：玻璃器皿及采样器具试验前要按无菌操作要求包扎，121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min 备用。

7 样品

7.1 样品采集

与其他项目一同采样时，先单独采集微生物水样。采样瓶不得用水样冲洗，按无菌操作要求采集水样于灭菌的采样瓶中。清洁水的采样量不低于 400 ml，其余水体采样量不低于 100 ml。瓶内须留下足够的空间，用以摇匀水样。

采集江、河、湖、库等地表水水样时，可握住瓶子下部直接将带塞采样瓶插入水中，距水面 10~15 cm 处，瓶口朝水流方向，拔瓶塞，使水样灌入瓶内然后盖上瓶塞，将采样瓶从水中取出。如果没有水流，可握住瓶子水平前推。水样采好后，迅速扎上无菌包装纸。

从水龙头采集样品时，不要选用漏水的龙头，采水前可先将水龙头打开至最大，放水 3~5 min，然后将水龙头关闭，用火焰灼烧约 3 min 灭菌，开足龙头，再放水 1 min，以充分除去水管中的滞留杂质。采样时控制水流速度，小心接入瓶内。

采集地表水、废水样品及一定深度的水样时，可使用灭菌过的专用采样装置采样。

在同一采样点进行分层采样时，应自上而下进行，以免不同层次的搅扰。

如果采集的是含有余氯或经过加氯处理的水样，需在采样瓶灭菌前加入硫代硫酸钠溶液（5.7），以除去余氯对细菌的抑制作用（每 125 ml 容积加入 0.1 ml 的硫代硫酸钠溶液）；如果采集的是重金属离子含量较高的水样，则在采样瓶灭菌前加入乙二胺四乙酸二钠溶液（5.8），以消除干扰（每 125 ml 容积加入 0.3 ml 的乙二胺四乙酸二钠溶液）。

注：10 mg 硫代硫酸钠可保证去除水样中 1.5 mg 余氯，硫代硫酸钠用量可根据水样实际余氯量调整。

7.2 样品保存

采样后 2 h 内检测，否则，需 10°C 以下冷藏并不得超过 6 h。实验室接样后，不能立即开展检测的，应将样品放入 0~4°C 冰箱并 2 h 内测定。

8 分析步骤

8.1 样品稀释

当接种水样量为 10 ml 或 1 ml 时，充分混匀后备用。

当接种水样量小于 1 ml 时，水样应制成稀释样品后使用。接种量为 0.1 ml、0.01 ml 时，分别制成 1:10 稀释样品、1:100 稀释样品。其他接种量的稀释样品依次类推。

1:10 稀释样品的制作方法为：吸取 10 ml 水样，注入盛有 90 ml 无菌水的试管中，混匀，制成 1:10 稀释样品。其他稀释度的稀释水样同法制作。

8.2 接种

将水样充分混匀后，对于清洁的水样，在 2 支装有已灭菌的 50 ml 三倍乳糖蛋白胨培养液的大试管中（内有倒管），以无菌操作各加入水样 100 ml，在 10 支装有已灭菌的 5 ml 三倍乳糖蛋白胨培养液的试管中（内有倒管），以无菌操作各加入水样 10 ml，共计 12 管两个稀释度。对于较清洁水样，接种量为 10 ml、1 ml、0.1 ml；对于受到污染的水样，接种量为 1 ml、0.1 ml、

0.01 ml 或 0.1 ml、0.01 ml、0.001 ml 等，共计 15 管三个稀释度，水样接种量参考表见表 1。

表 1 水样接种量参考表

水样种类	接种量 (ml)							
	10	1	0.1	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
湖水、水源水	▲	▲	▲					
河水			▲	▲	▲			
生活污水					▲	▲	▲	
医疗机构排放污水（处理后）		▲	▲	▲				
畜禽养殖业等排放废水						▲	▲	▲

8.3 初发酵试验

将已充分混匀的水样以无菌操作分别接种到盛有乳糖蛋白胨培养液的试管中，在 37±0.5℃ 下培养 24±2 h。

产酸和产气的试管表明试验阳性。如在倒管内产气不明显，可轻拍试管，有小气泡升起的为阳性。

8.4 复发酵试验

轻微振荡在初发酵试验中显示为试验阳性的试管，用接种环将培养物转接到 EC 培养液中。在 (44.5±0.5)℃ 下培养 24±2 h。接种后所有试管必须在 30 min 内放进培养箱中。

培养后立即观察，倒管中产气证实为粪大肠菌群阳性。

9 结果计算与表示

9.1 结果计算

根据不同接种量的阳性发酵管数量，查表 A.1 或表 A.2 (参见附录 A)。接种 12 份水样时，查表 A.1 可得每升粪大肠菌群 MPN 值。接种 15 份水样时，查表 A.2 得到 MPN 值，再经公式 (1) 换算成每升水样中粪大肠菌群 MPN 值。

$$C=10 \times M \times f \quad (1)$$

式中：C——每升水样中粪大肠菌群 MPN 值，MPN/L；

10——将 MPN 值的单位 MPN/100 ml 转换为 MPN/L；

M——查表得到的 MPN 值，MPN/100 ml；

f——水样稀释倍数。

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，结果的单位为 MPN/L。平均值以几何平均计算。

10 精密度和准确度

10.1 精密度

6个实验室对低浓度(约 50 MPN/L)、中浓度(约 5.0×10^4 MPN/L)和高浓度(约 3.5×10^7 MPN/L)三个不同浓度粪大肠菌群的 actual 水样和有证标准样品(浓度为 3670 MPN/L, 可接受范围为 330~7710 MPN/L)进行了测定, 实验室内相对标准偏差范围分别为 2.3%~3.8%, 2.0%~11%, 1.1%~5.4%和 5.1%~17%; 实验室间相对标准偏差分别为 3.4%, 11%, 1.6%和 5.4%; 实验室间 95%置信区间见表 2。

表 2 实验室间 95%置信区间

低浓度 (MPN/L)		中浓度 (MPN/L)		高浓度 (MPN/L)		有证标准样品 (MPN/L)	
均值	95%置信区间	均值	95%置信区间	均值	95%置信区间	均值	95%置信区间
54	47~62	2.7×10^4	$9.6 \times 10^3 \sim 7.9 \times 10^4$	2.8×10^7	$2.2 \times 10^7 \sim 3.6 \times 10^7$	3725	2413~5751

10.2 准确度

6家实验室对粪大肠菌群有证标准样品(浓度为 3670 MPN/L, 可接受范围为 370 MPN/L~7710 MPN/L)进行测定, 实验室内相对误差范围为 -6.2%~8.4%; 相对误差最终值为 $-1.7\% \pm 11\%$ 。

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

11.1 培养基检验

更换不同批次培养基时要进行阳性和阴性菌株检验, 以确保其符合要求。

11.2 培养基保存

配制好的培养基不宜保存过久, 以少量勤配为宜。存放时应避免阳光直射, 并且要避免杂菌侵入和水分蒸发。当培养液颜色变化, 或体积变化明显时废弃不用。

11.3 空白试验

每次试验都要用无菌水做实验室空白测定, 培养后的试管中不得有任何颜色反应。否则, 该次样品测定结果无效, 应查明原因后重新测定。

11.4 阳性及阴性对照

粪大肠菌群测定的阳性菌株(如大肠埃希氏菌 *Escherichia coli*), 阴性菌株(如产气肠杆菌 *Enterobacter aerogenes*)。将标准菌株配成浓度为 300~3000 个/ml 的菌悬液, 分别取相应水量的菌悬液按“8.2 接种”要求接种于试管中, 然后按“8.3 初发酵试验”和“8.4 复发

酵实验”要求培养，阳性菌株应呈现阳性反应，阴性菌株应呈现阴性反应。否则，该次样品测定结果无效，应查明原因后重新测定。

12 废物处理

使用后的器皿及废弃物须经 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min 后，器皿方可清洗，废弃物作为一般废物处置。

附录 A
 (资料性附录)
 最大可能数 (MPN) 表

表 A.1 12 管法最大可能数 (MPN) 表

10 ml 水量的阳性管数	100 ml 水量的阳性瓶数		
	0	1	2
	1 L 水样中粪大肠菌群数	1 L 水样中粪大肠菌群数	1 L 水样中粪大肠菌群数
0	<3	4	11
1	3	8	18
2	7	13	27
3	11	18	38
4	14	24	52
5	18	30	70
6	22	36	92
7	27	43	120
8	31	51	161
9	36	60	230
10	40	69	>230

注：接种 2 份 100 ml 水样，10 份 10 ml 水样，总量 300 ml。

表 A.2 15 管法最大可能数 (MPN) 表

各接种量阳性份数			MPN/100 ml	95%置信限		各接种量阳性份数			MPN/100 ml	95%置信限	
10 ml	1 ml	0.1 ml		下限	上限	10 ml	1 ml	0.1 ml		下限	上限
0	0	0	<2			3	0	0	8	1	19
0	0	1	2	<0.5	7	3	0	1	11	2	25
0	0	2	4	<0.5	7	3	0	2	13	3	31
0	0	3	5			3	0	3	16		
0	0	4	7			3	0	4	20		
0	0	5	9			3	0	5	23		
0	1	0	2	<0.5	7	3	1	0	11	2	25
0	1	1	4	<0.5	11	3	1	1	14	4	34
0	1	2	6	<0.5	15	3	1	2	17	5	46
0	1	3	7			3	1	3	20	6	60
0	1	4	9			3	1	4	23		
0	1	5	11			3	1	5	27		
0	2	0	4	<0.5	11	3	2	0	14	4	34

续表

各接种量阳性份数			MPN/100 ml	95%置信限		各接种量阳性份数			MPN/100 ml	95%置信限	
10 ml	1 ml	0.1 ml		下限	上限	10 ml	1 ml	0.1 ml		下限	上限
0	2	1	6	<0.5	15	3	2	1	17	5	46
0	2	2	7			3	2	2	20	6	60
0	2	3	9			3	2	3	24		
0	2	4	11			3	2	4	27		
0	2	5	13			3	2	5	31		
0	3	0	6	<0.5	15	3	3	0	17	5	46
0	3	1	7			3	3	1	21	7	63
0	3	2	9			3	3	2	24		
0	3	3	11			3	3	3	28		
0	3	4	13			3	3	4	32		
0	3	5	15			3	3	5	36		
0	4	0	8			3	4	0	21	7	63
0	4	1	9			3	4	1	24	8	72
0	4	2	11			3	4	2	28		
0	4	3	13			3	4	3	32		
0	4	4	15			3	4	4	36		
0	4	5	17			3	4	5	40		
0	5	0	9			3	5	0	25	8	75
0	5	1	11			3	5	1	29		
0	5	2	13			3	5	2	32		
0	5	3	15			3	5	3	37		
0	5	4	17			3	5	4	41		
0	5	5	19			3	5	5	45		
1	0	0	2	<0.5	7	4	0	0	13	3	31
1	0	1	4	<0.5	11	4	0	1	17	5	46
1	0	2	6	<0.5	15	4	0	2	21	7	63
1	0	3	8	1	19	4	0	3	25	8	75
1	0	4	10			4	0	4	30		
1	0	5	12			4	0	5	36		
1	1	0	4	<0.5	11	4	1	0	17	5	46
1	1	1	6	<0.5	15	4	1	1	21	7	63
1	1	2	8	1	19	4	1	2	26	9	78
1	1	3	10			4	1	3	31		
1	1	4	12			4	1	4	36		
1	1	5	14			4	1	5	42		
1	2	0	6	<0.5	15	4	2	0	22	7	67
1	2	1	8	1	19	4	2	1	26	9	78
1	2	2	10	2	23	4	2	2	32	11	91

续表

各接种量阳性份数			MPN/100 ml	95%置信限		各接种量阳性份数			MPN/100 ml	95%置信限	
10 ml	1 ml	0.1 ml		下限	上限	10 ml	1 ml	0.1 ml		下限	上限
1	2	3	12			4	2	3	38		
1	2	4	15			4	2	4	44		
1	2	5	17			4	2	5	50		
1	3	0	8	1	19	4	3	0	27	9	80
1	3	1	10	2	23	4	3	1	33	11	93
1	3	2	12			4	3	2	39	13	110
1	3	3	15			4	3	3	45		
1	3	4	17			4	3	4	52		
1	3	5	19			4	3	5	59		
1	4	0	11	2	25	4	4	0	34	12	93
1	4	1	13			4	4	1	40	14	110
1	4	2	15			4	4	2	47		
1	4	3	17			4	4	3	54		
1	4	4	19			4	4	4	62		
1	4	5	22			4	4	5	69		
1	5	0	13			4	5	0	41	16	120
1	5	1	15			4	5	1	48		
1	5	2	17			4	5	2	56		
1	5	3	19			4	5	3	64		
1	5	4	22			4	5	4	72		
1	5	5	24			4	5	5	81		
2	0	0	5	<0.5	13	5	0	0	23	7	70
2	0	1	7	1	17	5	0	1	31	11	89
2	0	2	9	2	21	5	0	2	43	15	110
2	0	3	12	3	28	5	0	3	58	19	140
2	0	4	14			5	0	4	76	24	180
2	0	5	16			5	0	5	95		
2	1	0	7	1	17	5	1	0	33	11	93
2	1	1	9	2	21	5	1	1	46	16	120
2	1	2	12	3	28	5	1	2	63	21	150
2	1	3	14			5	1	3	84	26	200
2	1	4	17			5	1	4	110		
2	1	5	19			5	1	5	130		
2	2	0	9	2	21	5	2	0	49	17	130
2	2	1	12	3	28	5	2	1	70	23	170
2	2	2	14	4	34	5	2	2	94	28	220
2	2	3	17			5	2	3	120	33	280
2	2	4	19			5	2	4	150	38	370

续表

各接种量阳性份数			MPN/100 ml	95%置信限		各接种量阳性份数			MPN/100 ml	95%置信限	
10 ml	1 ml	0.1 ml		下限	上限	10 ml	1 ml	0.1 ml		下限	上限
2	2	5	22			5	2	5	180	44	520
2	3	0	12	3	28	5	3	0	79	25	190
2	3	1	14	4	34	5	3	1	110	31	250
2	3	2	17			5	3	2	140	37	340
2	3	3	20			5	3	3	180	44	500
2	3	4	22			5	3	4	210	53	670
2	3	5	25			5	3	5	250	77	790
2	4	0	15	4	37	5	4	0	130	35	300
2	4	1	17			5	4	1	170	43	490
2	4	2	20			5	4	2	220	57	700
2	4	3	23			5	4	3	280	90	850
2	4	4	25			5	4	4	350	120	1000
2	4	5	28			5	4	5	430	150	1200
2	5	0	17			5	5	0	240	68	750
2	5	1	20			5	5	1	350	120	1000
2	5	2	23			5	5	2	540	180	1400
2	5	3	26			5	5	3	920	300	3200
2	5	4	29			5	5	4	1600	640	5800
2	5	5	32			5	5	5	≥2400	800	

注 1: 接种 5 份 10 ml 水样、5 份 1 ml 水样、5 份 0.1 ml 水样。
注 2: 如果有超过三个的稀释度用于检验, 在一系列的十进稀释当中, 计算 MPN 时, 只需要用其中依次三个的稀释度, 取其阳性组合。选择的标准是: 先选出 5 支试管全部为阳性的最大稀释(小于它的稀释度也全部为阳性试管), 然后再加上依次相连的两个更高的稀释。用这三个稀释度的结果数据来计算 MPN 值。