

附件 7

《水质 细菌总数的测定 平皿计数法
（征求意见稿）》
编制说明

《水质 细菌总数的测定 平皿计数法》标准编制组

二〇一七年九月

项目名称：水质 细菌总数的测定 平皿计数法

项目统一编号：988

承担单位：辽宁省环境监测实验中心

编制组主要成员：张峥、吕晓洁、卢雁、姜永伟、郑培生、王星蒙、
丁振军、王朝霞、付友生、刘勇、刘茜

标准所技术管理负责人：周羽化、张虞

环境监测司项目负责人：张宗祥

目 录

1	项目背景.....	1
1.1	任务来源.....	1
1.2	工作过程.....	1
2	标准制修订的必要性分析.....	3
2.1	标准被测对象的环境危害.....	3
2.2	相关环保标准和环保工作的需要.....	3
3	国内外相关分析方法研究.....	4
3.1	国际组织相关分析方法研究.....	4
3.2	国内相关分析方法研究.....	5
4	标准制修订的基本原则和技术路线.....	6
4.1	标准制修订的基本原则.....	6
4.2	标准制修订的技术路线.....	6
5	方法研究报告.....	8
5.1	方法研究的目标.....	8
5.2	方法原理.....	8
5.3	试剂和材料.....	9
5.4	仪器和设备.....	9
5.5	样品.....	10
5.6	分析步骤.....	11
5.7	结果计算.....	19
5.8	质量保证和质量控制.....	21
5.9	废物处理.....	22
6	方法验证.....	22
6.1	方法验证方案.....	22
6.2	方法验证过程.....	23
7	与开题报告的差异说明.....	23
8	参考文献.....	24
附一	方法验证报告.....	26

《水质 细菌总数的测定 平皿计数法》编制说明

1 项目背景

1.1 任务来源

根据国家环境保护部（原国家环境保护总局）《关于下达 2007 年度国家环境保护标准制修订项目计划的通知》（环办函〔2007〕544 号），辽宁省环境监测实验中心（原辽宁省环境监测中心站）承担《水质 细菌总数的测定 培养法》，项目编号 986。

1.2 工作过程

1.2.1 成立标准编制组

辽宁省环境监测实验中心（原辽宁省环境监测中心站）接到制订《水质 细菌总数的测定 培养法》标准的任务后，成立了标准编制组。

1.2.2 查阅国内外标准及文献，编写开题报告和标准草案

标准编制组成立后，迅速开展相关的调研工作，收集国内外关于水中细菌总数测定的分析方法，包括 EPA、ISO、APHA（美国公共卫生协会）及国内有关生活饮用水、饮用天然矿泉水、生活垃圾渗沥水、泳池水、食品及饲料等标准中关于细菌总数的测定方法，并结合微生物分析相关的实验室质量保证、实验室的器具、洗涤和灭菌、培养基的制备、微生物样品采集、保存和储藏，在广泛阅读、认真研究相关资料的基础上，编写了标准的开题论证报告和标准草案。

1.2.3 开题论证

2009 年 12 月 8 日在北京召开了标准开题论证会，与会专家听取了标准编制单位的标准开题论证报告和标准初稿内容介绍，经质询、讨论，认为该标准材料齐全、内容较完整；对国内外相关标准及文献进行了较为充分的调研；标准技术路线合理可行。最后提出了如下修改意见和建议：

（1）按照《环境监测分析方法标准制订技术导则》（HJ/T 168）和《国家环境污染物监测方法标准制修订工作暂行要求》（环科函〔2009〕10 号）的要求开展实验、验证和标准草案的编制工作；

（2）将标准名称由“水质 细菌总数的测定 培养法”改为“水质 细菌总数的测定 平皿计数法”；

（3）进一步确定结果统计方法；

（4）进一步细化操作过程及过程中的质量控制要求；

（5）增加原始数据及报告的具体内容及要求。

1.2.4 方法验证工作

①2012年9月至2013年5月,根据专家建议和已确实的目标及技术路线,编制完成了《水质 细菌总数的测定 平皿计数法》标准制订项目开题论证报告及标准文本草案。②2014年6月~2015年4月,对编制的课题论证报告进行修改和完善。同时,开展了大量条件摸索实验,包括样品采样保存时间的选择、不同培养基和不同生产厂家生产的相同培养基对不同类型水中细菌总数的影响、培养基倾倒温度和培养时间对结果的影响等,根据查阅的资料和实验数据编制了《水质 细菌总数的测定 平皿计数法》标准制订项目编制说明及标准文本征求意见稿初稿。③2015年3月~4月,通过应用本方法分析不同性质的实际样品及标准菌株对方法的适用性进行了检验,并对征求意见稿初稿进一步修改完善。④2015年7月6日~10日从省内环境监测系统、第三方检测公司和卫生防疫系统选取了6家有资质的实验室分别对地下水、地表水和生活污水的细菌总数进行方法验证,在此基础上进行了数据的汇总和分析整理,同时完善了《水质 细菌总数的测定 平皿计数法》标准征求意见稿及编制说明。

1.2.5 召开标准研讨会

2015年11月23日,在北京召开国家环境保护标准研讨会,专家意见如下:

(1)在文本中,适用范围中的“生活污水、工业废水”统一写成“废水”;根据实际情况,重新编写规范性引用文件,补充术语和定义;将附录中内容移至文本中;在精密度部分删去重复性限和再现性限,改用置信区间表达。

(2)在编制说明中,补充国内外方法内容比较;补充培养基类型、培养温度、培养时间等实验条件选择的依据及本实验室内的验证数据;验证过程中补充精密度和准确度结论;经充分调研,补充质量保证与质量控制的要求和说明。

(3)按照《环境监测 分析方法标准制修订技术导则》(HJ 168-2010)和《环境保护标准编制出版技术指南》(HJ 565-2010)对标准文本进行编辑性修改。

2015年12月~2016年12月,标准编制组按照专家意见逐条对标准文本和编制说明进行了修改,并补充开展了培养基类型、培养温度、培养时间的条件试验。

1.2.6 召开技术审查会

2017年1月12日,在北京召开国家环境保护标准征求意见稿技术审查会,审查委员会听取了标准主编单位关于标准征求意见稿的主要技术内容、编制工作过程的汇报,经质询、讨论,形成如下审查意见:

(1)标准主编单位提供的材料齐全、内容完整、格式规范;

(2)制订的标准具有科学性、适用性和可操作性,能满足地表水、地下水、废水等水体中细菌总数测定的需要;

审查委员会通过标准文本和编制说明的征求意见稿的技术审查,提出如下修改意见和建议,经修改后可公开征求意见:

(1)在文本中,“9.1 样品的稀释”样品震荡中加玻璃珠并明确玻璃珠直径;“4 方法原理”中删除“废水 36±2℃培养 24±2 h”;“11.1 精密度”中置信区间部分增加均值;去掉检出限。

(2) 在编制说明中, 增加实验室内 95%置信区间的内容, 增加检出限的说明。

(3) 根据专家意见将标准中部分文本进行修改。

根据本次技术审查会中专家的修改意见和建议, 标准编制组对标准文本和编制说明进行修改, 形成本征求意见稿。

2 标准制修订的必要性分析

2.1 标准被测对象的环境危害

2.1.1 细菌的基本理化性质

细菌外形一般为球形、杆形或螺旋形, 通常以二分裂方式进行繁殖。细菌的个体微小, 一般球菌直径为 0.5~1.0 微米, 杆菌宽 1 微米, 长 2 微米。细菌在自然界的分布很广, 存在于土壤、水、空气和动植物体表面及消化道等处。大多数细菌为异养, 少数为自养, 包括化能自养和光能自养。

细菌总数就是指在一定条件下(如培养基、培养温度和培养时间等)每毫升水样所生长出来的细菌菌落总数。本标准规定, 在需氧及兼性厌氧情况下, 36±2℃条件下培养 48±2 h 后, 能在普通营养琼脂平板上生长的细菌菌落总数。在现有条件下, 厌氧及有特殊营养要求的以及嗜中温的细菌难以繁殖生长。因此, 细菌总数并不表示实际中的所有细菌总数。另外, 细菌总数并不能区分其中细菌的种类, 所以有时也被称为杂菌数。

2.1.2 细菌的环境危害

据世界卫生组织统计, 全球 1400 余种人类传染病中, 60% 以上源于动物源性病原细菌(如沙门氏菌、弯曲杆菌、肉毒梭菌等); 美国每年约有 4800 万人受到动物源性病原细菌的困扰, 全球每年约有三分之一的人群受到致病菌侵害, 发展中国家更加严重。有些细菌产生的毒素能使人、畜和水生生物群发性致病, 严重影响人体健康和养殖业的发展。致病菌除直接导致人和动物致病外, 尚能引起细菌抗药性的产生、耐药基因的转移, 进一步导致药物的大量使用、滥用, 危害生态环境。

水中存在的细菌大致可分为三类, 一类是天然水中存在的细菌, 一般认为这类细菌对健康人体是非致病的。第二类是土壤细菌, 它们在水中生存的时间不长, 在水处理的过程中较容易去除。第三类是肠道细菌, 它们生存在温血动物的肠道中, 通过粪便进入水中, 这类细菌中如沙门氏菌、大肠杆菌、弯曲杆菌、金黄色葡萄球菌等均为常见致病菌。

2.2 相关环保标准和环保工作的需要

我国的《地下水质量标准》(GB/T 14848-93) 等标准中均有细菌总数指标, 我国现有标准中对细菌总数的分类及限值见表 1。

表 1 我国现有标准中对细菌总数的分类及限值

序号	标准号	标准名称	水质分类	标准值	单位
1	GB/T 14848-93	地下水质量标准	I类~III类	≤100	个/ml
			IV类	≤1000	个/ml
			V类	>1000	个/ml
2	CJ/T 206-2005	城市供水水质标准		≤80	CFU/ml
3	GB 5749-2006	生活饮用水卫生标准	表 1 ^{注1}	100	CFU/ml
			表 4 ^{注2}	500	CFU/ml
4	GB 9667-1996	游泳场所卫生标准	表 1 ^{注3}	≤1000	个/ml

现在只在地下水、饮用水、游泳池水等水质中有细菌总数测定的标准方法，没有适用于一般性水质的细菌总数测定的标准方法，不能满足现有环境保护工作的需求。

3 国内外相关分析方法研究

3.1 国际组织相关分析方法研究

目前国际标准中平皿计数法测定细菌总数的操作步骤均为取一定量水样或稀释水样置于无菌平皿中，倾注培养基并混匀后，在一定的培养温度和培养时间条件下，计数产生的菌落数。只是不同的方法中，培养基、培养温度、培养时间、培养基倾倒温度存在细微差异。国际标准中细菌总数不同培养条件比较见表 2。

表 2 国际标准中细菌总数不同培养条件比较

标准名称	培养基	培养温度	培养时间	培养基倾倒温度
EPA-HQ-OW-2013	平板计数琼脂(PCA)	35±0.5℃	48±3 h	44~46℃
ISO6222:1999	酵母粉琼脂	36±2℃	44±4 h	44~46℃
APHA 9215-2012	平板计数琼脂(PCA)	35℃	48 h	44~46℃

在计数结果的统计中，EPA 和 APHA 优先选择菌落数 30~300 之间者进行计算，如果两个稀释倍数的菌落数均在此范围内，每个稀释度分别计算出每毫升样品产生的菌落数后，再取两者的平均值；ISO 则采用大平均方式进行计数，即总菌落数除以总体积来计算每毫升样品中产生的细菌总数。

3.2 国内相关分析方法研究

国内外测定细菌总数的方法原理基本一致，国内“细菌总数测定”也有人称为“菌落总数测定”，生活饮用水、饮用天然矿泉水、游泳池水、生活垃圾渗沥水、食品及饲料中均有相应国家标准或行业标准的细菌总数测定方法，国内标准中细菌总数不同培养条件比较见表3。

表3 国内标准中细菌总数不同培养条件比较

标准名称	培养基	培养温度	培养时间	培养基倾倒温度
GB/T 5750.12-2006 生活饮用水标准检验方法 微生物指标	营养琼脂	36±1℃	48 h	45℃左右
GB/T8538-2008 饮用天然矿泉水检验方法	营养琼脂	36±1℃	48 h	45℃左右
GB/T 18204.9-2000 游泳池水微生物检验方法 细菌总数测定	营养琼脂	36±1℃	48 h	45℃
CJ/T 3018.14-93 生活垃圾渗沥水 细菌总数 的检测 平板菌落计数法	营养琼脂	36±1℃	24±2 h	45~47℃
GB4789.2-2016 食品安全国家标准 食品微 生物学检验 菌落总数测定	平板计数琼脂 (PCA)	36±1℃	48±2 h	45~47℃
GB/T13093-2006 饲料中细菌总数的测定	营养琼脂	30±1℃	72±3 h	45~47℃

在计数结果的统计中，国内标准与 EPA 和 APHA 一致，与 ISO 存在差异，标准编制组对两种方法进行了方法比对，结果显示二者无显著性差异。见 5.7.2。

目前，国内尚没有针对一般性水体的细菌总数测定方法，本标准方法制定完成后将部分代替以上标准方法，适用于地表水、地下水和废水等一般性水体细菌总数的测定。

课题组同时查阅了大量国内有关细菌总数测定的文献资料，曾超鹏（1996）比较了营养琼脂和 TTC 营养琼脂（营养琼脂中加入红四氮唑，在细菌脱氢酶的作用下，TTC 便接受氢被还原成不溶于水的红色的三苯基甲脂，便于观察计数）对矿泉水中细菌总数的影响，结果显示：二者计数结果无显著性差异（ $P > 0.05$ ）。黄智钟等（1999）比较了三种不同来源营养琼脂培养基（分别为：按国家标准 GB4789.28 -94 自配的营养琼脂、广东某厂生产的营养琼脂干燥培养基和江苏某厂生产的营养琼脂干燥培养基）对菌落总数的影响，结果表明：三种

不同培养基检测各种样品中的菌落总数效果差别无显著性 ($H=0.14, P>0.05$)。边藏丽等 (2000) 比较了营养琼脂和平板计数琼脂 (PCA) 在 37℃ 条件下恒温培养 24 h、48 h、72 h 和 96 h 后形成的菌落数, 结果表明: 24 h 形成的菌落数最少, 菌落数随培养时间延长而增多; 24 h 与 48 h 形成的菌落数差异显著, 48 h 与 72 h, 72 h 与 96 h 形成的菌落数无显著差异; 营养琼脂与平板计数琼脂形成的菌落数无显著差异。吴俊鹏 (2003) 对 65 份糕点进行了不同培养时间对细菌总数的影响实验, 结果表明: 培养 24 h 与 48 h 细菌总数有显著差异 ($P<0.01$), 培养 72 h 与培养 48 h 的菌落数相比, 结果虽有增加, 但无显著性差异 ($P>0.05$)。并且, 培养时间过长 (72 h) 混杂的霉菌生长旺盛, 影响结果的计数。杜宗绪 (2014) 比较了 3 个不同厂家的平板计数琼脂 (36℃ 培养 48 h, 白色念珠菌为 28℃ 培养 48 h) 对大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌、伤寒沙门氏菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌和白色念珠菌 6 种标准菌株菌落数的影响, 结果表明: 6 株标准菌株在 3 种 PCA 培养基 (PCA-101, PCA-202, PCA-303) 中的菌落数无显著差异。

4 标准制修订的基本原则和技术路线

4.1 标准制修订的基本原则

4.1.1 方法的检出限问题

细菌总数的检测方法不同于理化指标, 目前国内外尚无细菌总数方法检出限的要求及计算方法, EPA、ISO、APHA 及国内有关生活饮用水、饮用天然矿泉水、生活垃圾渗沥水、泳池水、食品及饲料等标准中均无细菌总数测定的方法检出限。本标准编制之初, 标准编制组应用《环境监测 分析方法标准制修订技术导则》(HJ 168-2010) 中理化指标方法检出限的计算方法, 计算得出本标准方法检出限为 2.7 CFU/ml, 2017 年 1 月 12 日在北京召开的技术审查会上, 专家讨论后一致认为 HJ 168-2010 中的检出限计算方法适用对象是理化指标, 并不适用于细菌总数, 菌落计数时, 即使有一个菌落生长也应视为有检出。考虑到同以上国内外标准相统一, 专家审查意见中建议“去掉检出限”, 因此, 标准文本及编制说明中有关检出限的内容均予以删除。

4.1.2 方法具有普遍适用性, 易于推广和使用

当前国内没有针对一般性水体通用性的测定细菌总数的标准方法, 对于地表水、企业排放水等没有明确适用的方法标准, 在适用上容易造成混乱。本标准使用国内外广泛采用的平皿计数法, 经反复条件摸索及实验验证, 制定了针对一般性水质的通用的细菌总数测定标准方法。

4.2 标准制修订的技术路线

4.2.1 拟采用的实验条件

目前国内外应用平皿计数法测定细菌总数的标准方法之间的差异主要集中在培养基、培养温度、培养时间和培养基倾倒温度四个方面, 对以上四个实验条件分别进行方法条件实验后, 确定了本标准中拟采用的实验条件。

(1) 营养琼脂、酵母粉琼脂和平板计数琼脂对细菌总数培养结果无显著性差异，考虑历史数据的连续性，采用营养琼脂培养基。

(2) 30℃、34℃、35℃、36℃、37℃和 38℃对细菌总数培养结果无显著差异，为使国内各实验室多数培养箱能够满足培养要求，采用 ISO 标准中范围较宽的 36±2℃。

(3) 废水经 24 h 培养后，细菌总数已处于稳定生长期，但此时菌落较小；地表水中细菌总数培养 24 h 后，细菌尚处于快速生长期，40 h 后细菌总数基本稳定，为使细菌大小和形态更加便于计数，确定细菌总数培养时间为 48±2 h。

(4) 培养基倾倒温度在 45±1℃和 46±1℃条件下结果无显著差异，本标准设定培养基倾倒温度为 44~47℃。

4.2.2 实验条件前景分析

目前国内环境监测工作中测定细菌总数主要参照《水和废水监测分析方法（第四版）》，本标准通过方法条件实验将书中的培养时间由 24 h 增加至 48 h，其余部分基本保持一致，该方法需要的培养基配制简单，培养温度、培养时间和培养基倾倒温度容易控制，对仪器设备准确度要求较低，因此，本标准在目前国内环境监测工作中的推广和应用是完全可以普适的。

4.2.3 技术路线图

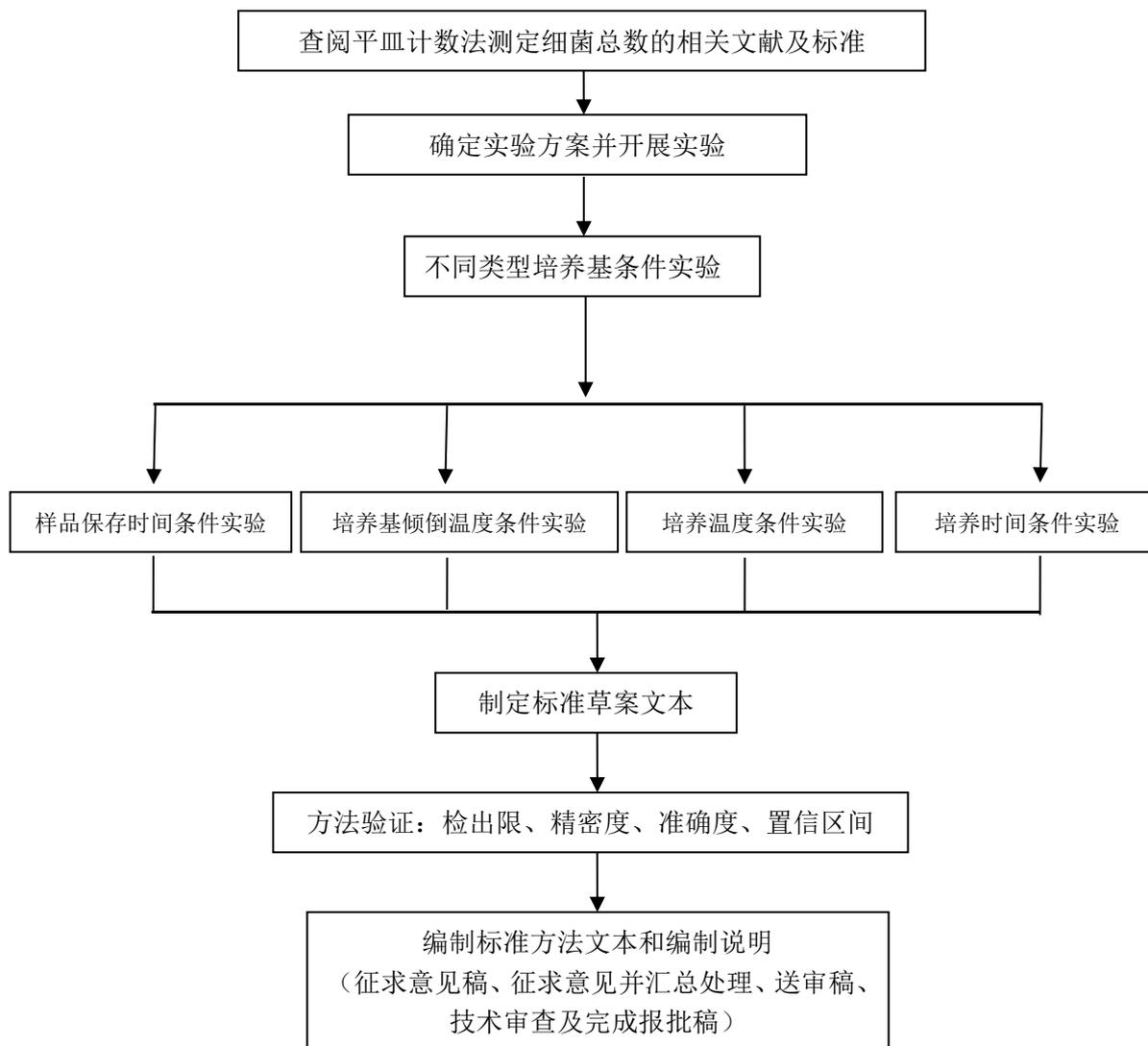


图 1 细菌总数标准编制技术路线图

5 方法研究报告

5.1 方法研究的目标

建立适用于测定地下水、地表水、废水等一般性水体中细菌总数的方法标准。

当前，国内测定水体中细菌总数的方法涉及到生活饮用水（GB/T 5750.12-2006）、饮用天然矿泉水（GB/T 8538.12-2008）、游泳池水（GB/T 18204.9-2000）和生活垃圾渗沥水（CJ/T 3018.14-2006）四类水体，地下水、地表水（不含生活饮用水）和废水等水体中的细菌总数尚没有相关标准，编制组拟通过大量方法验证实验建立适用于以上各类水体细菌总数测定的标准方法。

5.2 方法原理

每一种细菌均有其一定的生理特性，应用不同的营养物质和特定的物理条件（如培养温

度、培养时间和 pH 等) 去满足它, 才能分别将各种细菌培养出来。实际工作中最常用的方法是: 将 1 ml 水样置于营养琼脂中, $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ 进行培养, $48\pm 2\text{ h}$ 后计算所生长的细菌菌落总数。本方法所得结果只包括一群能在营养琼脂上生长发育的嗜中温性需氧及兼性厌氧的细菌菌落总数, 实质上可能低于真正存在的活细菌的数目。

5.3 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化学试剂。

5.3.1 营养琼脂

(1) 成分:

蛋白胨	10 g
牛肉膏	3 g
氯化钠	5 g
琼脂	15g~20 g

(2) 制法: 将上述成分或含有上述成分的市售成品溶解于 1000 ml 蒸馏水或去离子水中, 调整 pH 值到 7.4~7.6, 分装于玻璃容器中, 经 121°C 灭菌 20 min, 储存于冷暗处备用。

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

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

5.3.4 硫代硫酸钠溶液: $\rho(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)=0.10\text{ g/ml}$

称取硫代硫酸钠 10g, 用水溶解并定容至 100 ml, 现配。

5.3.5 乙二胺四乙酸二钠溶液: $\rho(\text{EDTA-Na}_2)=0.15\text{ g/ml}$

称取乙二胺四乙酸二钠 15 g, 用水溶解并定容至 100 ml, 此溶液保质期为 30 d。

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

5.3.7 玻璃珠: 直径 3~8 mm。

5.4 仪器和设备

5.4.1 采样瓶: 250 ml 带螺旋帽或磨口塞的广口玻璃瓶。

5.4.2 高压蒸汽灭菌器: 121°C 、101.3 kpa。

要求容量足够, 能提供均匀的温度(121°C 的高压灭菌温度), 并且能够在 30 分钟之内达到所需的灭菌温度。

5.4.3 恒温培养箱: 温度偏差 $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

要求温度变化不可超过 $\pm 2.0^{\circ}\text{C}$ 。此处变化是随着 ISO 的标准进行变化的。原有培养要严格控制培养温度在 $37.0\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, 但一般的空气恒温的培养箱很难达到 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 的培养条件, 大部分地区配备的常规培养箱为空气恒温培养箱, 因此该条件很难达到。ISO 调整了培养温度限制, 放宽温度控制的范围, 使得大部分地区的各种类型培养箱均可满足细菌总数测定的需要, 便于该项目的开展。

5.4.4 pH 计: 至少准确到 0.1 pH 单。

5.4.5 放大镜或菌落计数器。

5.4.6 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。

5.5 样品

5.5.1 样品采集

(1) 与其他项目一同采样时，先单独采集微生物水样。采样瓶不得用水样洗涤，按无菌操作要求采集水样约200 ml于灭菌的采样瓶中。

(2) 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。

(3) 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。

(4) 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。

(5) 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。

5.5.2 样品保存

对样品的保存时间与测定结果的关系进行试验。试验方法：采集一桶浑河鸟岛断面水样（地表水），混匀后分装于一系列样品瓶内，然后放置在冰箱中，4℃保存，每小时取一瓶水样，进行细菌总数含量分析，样品保存时间试验结果见表4和图2。

表4 样品保存时间试验结果

单位：CFU/ml

时间	1 小时	2 小时	3 小时	4 小时	5 小时	6 小时	7 小时
计数结果	210,230	240,160	230,250	240,220	250,250	260,240	300,240
结果均值	220	200	240	230	250	250	270
时间	8 小时	9 小时	10 小时	11 小时	12 小时	13 小时	14 小时
计数结果	300,320	300,260	330,330	350,290	380,440	460,420	400,480
结果均值	310	280	330	320	410	440	440
时间	15 小时	16 小时	17 小时	18 小时	19 小时	20 小时	21 小时
计数结果	520,500	500,460	550,570	520,640	670,610	650,590	760,700
结果均值	510	480	560	580	640	620	730
时间	22 小时	23 小时	24 小时	25 小时	26 小时		
计数结果	750,710	790,850	900,880	980,860	920,880		
结果均值	730	820	890	920	900		

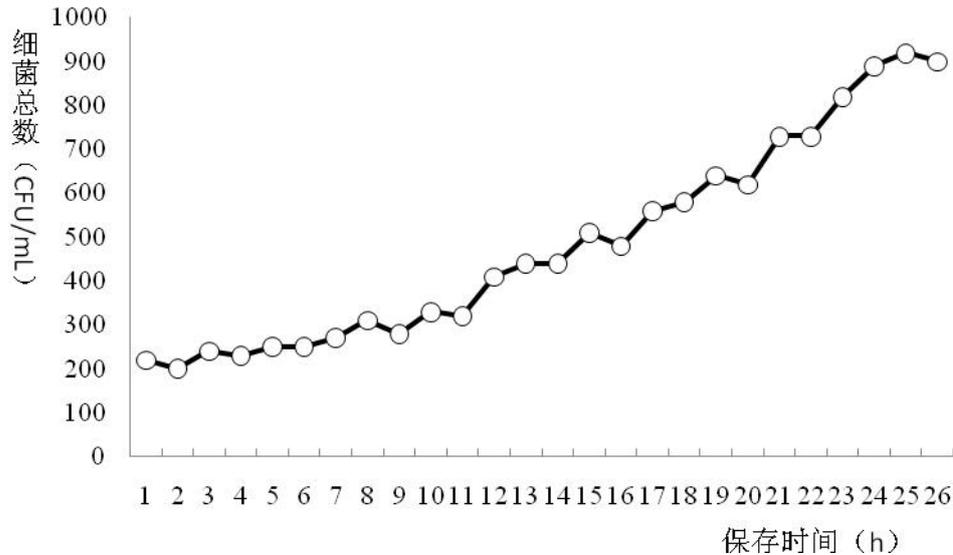


图2 样品保存时间试验结果结果

由表4和图2可以看出，在冷藏条件下6h内水中粪大肠菌群无明显变化，6h后粪大肠菌群数量开始逐渐上升，故水样采集后应尽快检测，否则，水样需在10℃以下冷藏，并不得超过6h。实验室接样后，不能立即开展检测的，应将样品放入0~4℃冰箱并2h内测定。

5.6 分析步骤

5.6.1 材料的灭菌

对操作中使用的培养基、稀释水及移液管等均需灭菌，灭菌方法采用高压蒸汽灭菌器121℃灭菌20分钟。

5.6.2 试验步骤

先打开紫外灯对无菌室灭菌30分钟以上，关掉紫外灯30分钟后，进入无菌室进行接种操作。

将水样充分混匀后，根据水样污染的程度确定水样的稀释倍数。同一稀释倍数要有2份平行。每个水样至少应稀释3个适宜浓度。

接种后的样品放到恒温培养箱内， $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ 培养 48 ± 2 h后，进行菌落计数，即为1ml水样中的细菌总数。

(1) 不同培养基条件实验

由于EPA、ISO和现行国内标准测定细菌总数的培养基不同，EPA为和GB4789.2-2010采用平板计数琼脂，ISO采用酵母粉琼脂，除GB4789.2-2010之外的其它国内标准均采用营养琼脂，标准编制组分别应用标准样品、满堂污水处理厂入口水（生活污水）、大伙房水库水（水库水）、浑河鸟岛断面水（河水）和沈阳市郊农户地下井水（地下水）对以上三种培养基进行结果比对，三种培养基测定结果比较见表5。

表 5 三种培养基测定结果比较

单位: CFU/ml

序号	水样类型	培养基		
		营养琼脂	酵母粉琼脂	平板计数琼脂
1	标准样品	77	81	61
2		83	72	78
3		75	89	76
4		70	77	82
5		68	75	79
6		77	80	72
7	生活污水	21700	23700	25200
8		22300	21300	23100
9		19800	20600	23600
10		20000	21300	20100
11		18600	19900	18700
12		17500	18600	18500
13	水库水	320	270	300
14		220	310	270
15		300	270	260
16		250	300	290
17		230	200	320
18		260	230	280
19	河水	1750	1810	1690
20		1310	1960	1600
21		1630	1670	1730
22		1580	1430	1610
23		1670	1600	1580
24		1550	1250	1320
25	地下水	149	146	173
26		183	189	223
27		134	168	159
28		169	152	187
29		155	158	165
30		170	165	147

选取营养琼脂与酵母粉琼脂对标准样品、生活污水和水库水中细菌总数计数结果进行配对 T 检验, 为了使两组数据呈正态分布, 先对数据进行对数处理, 检验结果见表 6、表 7 和表 8。

表6 两种培养基对细菌总数标准样品配对T检验结果

	差异性比较					t	df	P 值
	均值	标准偏差	标准误差	95%置信区间				
				下限	上限			
营养琼脂-酵母粉琼脂	-.02252	.04599	.01878	-.07079	.02575	-1.199	5	.284

表7 两种培养基对污水中细菌总数配对T检验结果

	差异性比较					t	df	P 值
	均值	标准偏差	标准误差	95%置信区间				
				下限	上限			
营养琼脂-酵母粉琼脂	-.01979	.02059	.00840	-.04139	.00182	-2.354	5	.065

表8 两种培养基对水库水中细菌总数配对T检验结果

	差异性比较					t	df	P 值
	均值	标准偏差	标准误差	95%置信区间				
				下限	上限			
营养琼脂-酵母粉琼脂	.00089	.09220	.03764	-.09586	.09765	.024	5	.982

由上表可见，使用营养琼脂培养基和酵母粉琼脂培养基测定细菌总数的结果在统计学意义上没有显著性差异（ $P=0.284$ ； $P=0.065$ ； $P=0.982$ ）。

选取营养琼脂与平板计数琼脂对河水和地下水中细菌总数计数结果进行配对 T 检验，仍然先对数据进行对数处理，两种培养基对河水和地下水中细菌总数配对 T 检验结果见表 9 和表 10。

表9 两种培养基对河水中细菌总数配对T检验结果

	差异性比较					t	df	P 值
	均值	标准偏差	标准误差	95%置信区间				
				下限	上限			
营养琼脂-平板计数琼脂	-.00198	.05278	.02155	-.05737	.05341	-.092	5	.930

表10 两种培养基对地下水中细菌总数配对T检验结果

	差异性比较					t	df	P 值
	均值	标准偏差	标准误差	95%置信区间				
				下限	上限			
营养琼脂- 平板计数 琼脂	-.03883	.05423	.02214	-.09574	.01808	-1.754	5	.140

由上表可见,使用营养琼脂培养基和平板计数琼脂培养基测定细菌总数的结果在统计学意义上没有显著性差异 (P=0.930; P=0.140)。

综上所述,应用营养琼脂培养基与酵母粉琼脂培养基、平板计数琼脂培养基对细菌总数测定在统计学意义上没有显著性差异,为保证历史数据的延续性,本标准采用国内标准中应用最为广泛的营养琼脂培养基。

(2) 培养基倾注温度条件实验

由于倾注培养基的温度会对细菌的培养结果造成一定影响,课题组对培养基进行倾注温度条件实验。采用平行样品测定的方式,分别在培养基温度为45℃、46℃、55℃、65℃、75℃条件下,选取了满堂河水(1#)、辽宁环保科学园湖水(2#)、东陵公园龙尾湖湖水(3#)、满堂污水处理厂出水(4#)和东陵公园龙王庙井水(5#)5个不同来源的水样进行适当稀释后,各取1 ml,每个水样或稀释水样3个平行,置36±2℃恒温培养箱进行培养,48±2h后计数,培养基倾注温度比对结果见表11和图3。

表11 培养基倾注温度比对结果

CFU/ml

培养基温度		45℃	46℃	55℃	65℃	75℃
1#	计数结果	7900,7400,7700	7800,6700,7500	2400,2200,2500	560,240,310	7,11,0
	平均值	7700	7300	2400	370	6
	结果对数	3.89	3.86	3.38	2.57	0.78
2#	计数结果	680,720,680	750,660,710	200,140,130	33,17,20	0,6,3
	平均值	690	710	160	27	3
	结果对数	2.84	2.85	2.20	1.43	0.48
3#	计数结果	5400,5800,5500	5200,5600,5500	1300,1100,980	110,60,80	4,1,2
	平均值	5600	5400	1100	83	2
	结果对数	3.75	3.73	3.04	1.92	0.30
4#	计数结果	9900,9600,9300	8300,9200,8700	3300,3100,3500	1100,560,530	0,2,0
	平均值	9600	8700	3300	730	1
	结果对数	3.98	3.94	3.52	2.86	0.00
5#	计数结果	340,370,320	330,360,290	68,110,80	6,9,11	0,1,0
	平均值	330	330	86	9	0
	结果对数	2.53	2.52	1.93	0.95	0.00

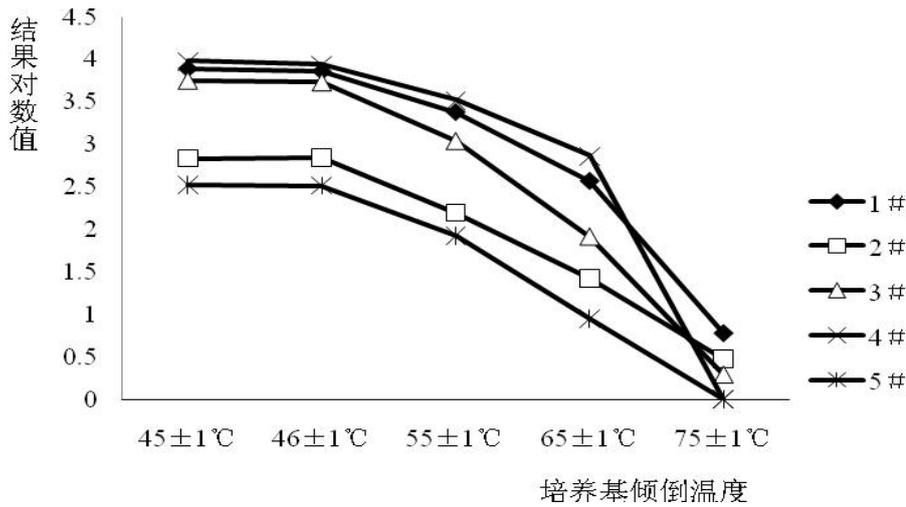


图3 培养基倾倒温度比对结果

对培养基不同倾倒温度结果进行比对可以看出，45±1℃和46±1℃条件下，结果无显著差异，随着温度的升高，不同的倾倒温度对结果的影响显著，高温致使部分或全部细菌死亡。因此，要严格控制培养基温度，使用水浴，使之达到45±1℃，必要时，可以使用另一瓶培养基插入温度计测温，进行温度控制。本标准最终确定倾注培养基温度为44~47℃。

(3) 培养温度条件实验

美国 EPA 规定的培养温度为 35±0.5℃，APHA 为 35℃，ISO 则为 36±2℃，国内标准中除 GB/T13093-2006 饲料中细菌总数的测定规定培养温度为 30±1℃外，其余均规定 36±1℃，与国际标准存在细微差异。课题组分别设置了 30℃、34℃、35℃、36℃、37℃和 38℃六个温度开展细菌总数标准样品（浓度 95 MPN/ml，可接受范围为 22-168 MPN/ml）48 h 培养计数，不同培养温度结果比对见表 12 和图 4。

表 12 不同培养温度结果比对

CFU/ml

平行组别	1#	2#	3#	4#	5#	6#	
30℃	计数结果	74,69	82,73	78,86	101,69	75,92	80,77
	平均值	71.5	77.5	82	85	83.5	78.5
	结果对数	1.85	1.89	1.91	1.93	1.92	1.89
34℃	计数结果	70,78	58,72	160,118	75,79	68,74	81,72
	平均值	74	65	139	77	71	76.5
	结果对数	1.87	1.81	2.14	1.89	1.85	1.88
35℃	计数结果	74,94	76,89	105,96	84,88	81,81	71,86
	平均值	84	82.5	100.5	86	81	78.5
	结果对数	1.92	1.92	2.00	1.93	1.91	1.89
36℃	计数结果	85,74	76,87	72,70	78,72	70,75	86,86
	平均值	79.5	81.5	71	75	72.5	86
	结果对数	1.90	1.91	1.85	1.88	1.86	1.93
37℃	计数结果	75,83	76,81	84,81	94,83	77,65	67,69
	平均值	79	78.5	82.5	88.5	71	68
	结果对数	1.90	1.89	1.92	1.95	1.85	1.83
38℃	计数结果	59,93	46,82	80,83	91,82	66,97	80,102
	平均值	76	64	81.5	86.5	81.5	91
	结果对数	1.88	1.81	1.91	1.94	1.91	1.96

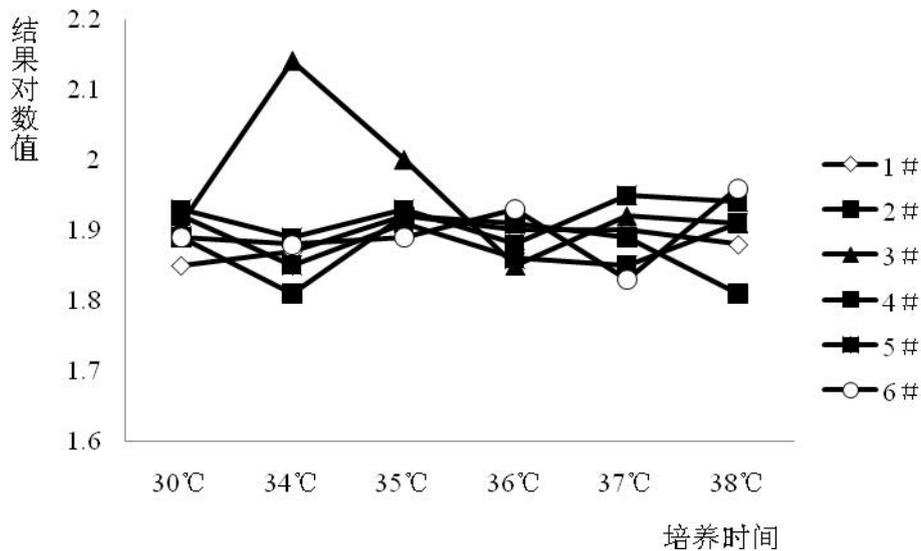


图 4 不同培养温度结果比对

由表 12 和图 4 可以看出，六个培养温度的计数结果较为一致，除第 3 组 34℃ 条件下结果偏差较大外，其余结果均在 1.8~2.0 之间。同时，对以上数据进行了单因素方差分析，结果见表 13。

表 13 六个培养温度对细菌总数计数的方差分析结果

	平方和	df	均方	F	P(显著性)
组间	.006	5	.001		
组内	.109	30	.004	.350	.878
总数	.115	35			

由上表可见,六个不同培养温度条件下细菌总数的结果在统计学意义上没有显著性差异(P=0.878)。由于各地培养箱精密度的不同,为保证绝大多数培养箱能够满足实验要求,本标准采用 ISO 规定的 36±2℃。

(4) 培养时间条件实验

对于平皿计数法测定细菌总数的最佳培养时间,标准编制组选择辽阳市污水处理厂(1#和2#)和辽宁环保科学园湖水(3#和4#)两类水样开展条件实验,水样培养时间对结果的影响见表14和图5。

表 14 水样培养时间对结果的影响 CFU/ml

培养时间		24 小时	40 小时	44 小时	48 小时	72 小时
1#	计数结果	3800, 4100	4300, 4200	4300, 4400	4200, 4500	4400, 4700
	平均值	3950	4250	4350	4350	4550
	结果对数	3.597	3.628	3.638	3.638	3.658
2#	计数结果	2800, 3500	3100, 3600	3200, 3600	3200, 3600	3400, 3800
	平均值	3150	3350	3400	3400	3600
	结果对数	3.498	3.525	3.531	3.531	3.556
3#	计数结果	440, 760	960, 1640	980, 1620	960, 1580	1000, 1550
	平均值	600	1300	1300	1270	1275
	结果对数	2.778	3.114	3.114	3.104	3.106
4#	计数结果	980, 1090	3020, 3610	3100, 3670	2960, 3820	3260, 4010
	平均值	1035	3315	3385	3390	3635
	结果对数	3.015	3.520	3.530	3.530	3.561

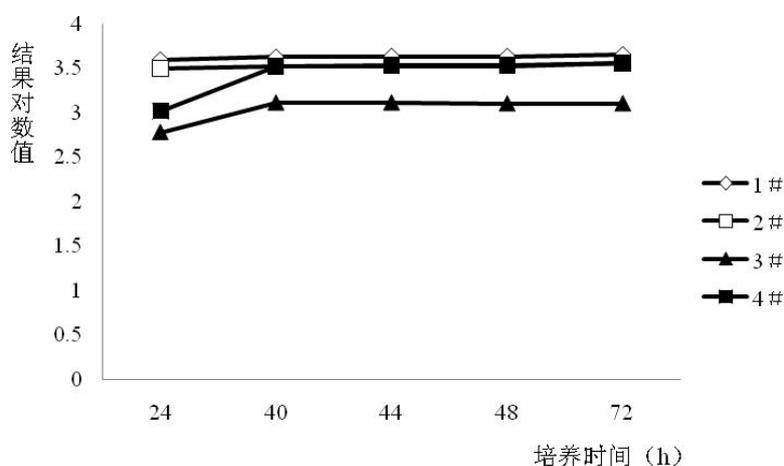


图 5 水样培养时间对结果的影响

对结果进行比对可以看出，对污水而言，经 24 小时培养后，细菌总数已处于稳定生长期；对地表水而言，培养 24 小时后，细菌尚处于快速生长期，培养 40 小时后，细菌总数基本稳定。由于 48 小时的细菌大小和形态更加便于计数，本标准采纳 GB/T 5750.12-2006、GB/T8538-2008、GB/T 18204.9-2000 和 GB4789.2-2010 中对培养时间的规定，确定培养时间为 48±2 小时。

(5) 空白对照

用无菌水做实验室空白测定，培养后平皿上不得有菌落生长，否则，该次样品测定结果无效，应查明原因后重新测定。

(6) 精密度

对于平皿计数法测定细菌总数的精密度试验，由方法验证来进行，试验由 6 家实验室对 3 种不同浓度水样进行 6 组样品的平行试验，其结果见表 15。

表 15 各验证实验室实际样品的精密度验证结果

实验室号	地下水			地表水			生活污水			标准样品		
	\bar{x}_i	S_i	RSD%	\bar{x}_i	S_i	RSD%	\bar{x}_i	S_i	RSD%	\bar{x}_i	S_i	RSD%
1	49.5	0.04	2.35	2982.5	0.02	0.59	134083	0.02	0.29	1.89	0.03	1.66
2	42.5	0.06	3.45	2227.5	0.05	1.61	172083	0.03	0.51	1.88	0.04	2.10
3	36	0.05	3.30	1325	0.06	1.81	100333	0.04	0.72	1.77	0.05	2.94
4	260	0.10	4.33	3227	0.04	1.04	170500	0.02	0.44	1.73	0.04	2.51
5	47	0.10	6.15	3608	0.04	0.99	152583	0.07	1.28	1.76	0.10	5.62
6	42	0.06	3.91	2308	0.04	1.18	88000	0.05	0.98	1.81	0.05	3.03
\bar{X}	1.77			3.39			5.12			1.81		
S'	0.32			0.16			0.12			0.07		
RSD%	18.41			4.68			2.42			3.65		
95% 置信区间	31~50			$1.7 \times 10^3 \sim 3.6 \times 10^3$			$9.8 \times 10^4 \sim 1.8 \times 10^5$			55~76		
注：表内的结果计算都是以相应样品结果的常用对数值计算得来。												

结论：6 个实验室对三种含不同浓度细菌总数的样品及有证标准样品（浓度为 95MPN/ml，可接受范围为 22~168MPN/ml）进行了统一测定：

实验室内相对标准偏差范围分别为：2.35%~6.15%、0.59%~1.81%、0.29%~1.28%、1.66%~5.62%；

实验室间相对标准偏差分别为：18.41%，4.68%，2.42%，3.65%；

95%置信区间范围分别为 31 CFU/ml~50 CFU/ml， 1.7×10^3 CFU/ml~ 3.6×10^3 CFU/ml， 9.8×10^4 CFU/ml~ 1.8×10^5 CFU/ml，55 CFU/ml~76 CFU/ml；均值分别为 39 CFU/ml， 2.5×10^3 CFU/ml， 1.3×10^5 CFU/ml，65 CFU/ml。

(7) 准确度

对于平皿计数法测定细菌总数的准确度试验，通过使用 95MPN/ml 标准菌株来进行。标准菌株编号：052014。通过 40 次试验获得的 95%可接受值范围为 22~168。验证结果见表 16。

表 16 各验证单位标准样品的准确度验证结果

实验室号	\bar{x}_i	RE _i %
1	1.89	-4.60
2	1.87	-5.19
3	1.77	-10.59
4	1.73	-12.53
5	1.76	-11.01
6	1.81	-8.40
$\overline{RE}\%$		-8.72
$S_{RE}\%$		3.25%
注：表内的结果计算都是以相应样品结果的常用对数值计算得来。		

结论：6 个实验室对含细菌总数为 95 MPN/ml 的标准样品进行了统一测定；
 相对误差范围为-12.53%~-4.60%；
 相对误差最终值为-8.72%±6.50%。

5.7 结果计算

5.7.1 结果判读

平皿上有较大片状菌落生长时，则不能使用。

片状菌落不到平皿的一半，而其余一半菌落分布又很均匀时，将此分布均匀的菌落计数，并乘以 2 代表全皿菌落总数。

外观（形态或颜色）相似，距离相近却不相触的菌落，只要它们之间的距离不小于最小菌落的直径，予以计数。紧密接触而外观相异的菌落，予以计数。

5.7.2 结果计算

结果的计算与表达有两种方式，第一种方式，采用菌落的总数或平均数乘以稀释倍数而得来的。第二种方式，计数结果大平均的结果计算方法与表示。

（1）第一种是 EPA、APHA 和国内标准广泛采用的最终结果计算与表达方式

本标准方法结果的计算采用以每个平皿菌落的总数或平均数(例如同一种稀释度两个重复平皿的平均数)乘以稀释倍数而得来的。各种不同情况的计算方法如下：

i 选择平均菌落数在 30~300 之间者进行计数，当只有一个稀释度的平均菌落数符合此范围时，以该平均菌落数乘以其稀释倍数为细菌总数测定值（见表 17 例 1）。

ii 若有两个稀释度平均菌落数均在 30~300 之间，计数则按二者之比（二者分别乘以其稀释倍数后，较大值与较小值之比）来决定。若其比值小于 2，以两者的平均数为细菌总数测定值；若大于 2 则以稀释度较小的菌落总数为细菌总数测定值；若等于 2 亦以稀释度较小的菌落总数为细菌总数测定值（见表 17 例 2、例 3、例 4）。

iii 若所有稀释度的平均菌落数均大于 300，则以稀释度最大的平均菌落数乘以稀释倍数

为细菌总数测定值（见表 17 例 5）。

iv 若所有稀释度的平均菌落数均小于 30，则以稀释度最小的平均菌落数乘以稀释倍数为细菌总数测定值（见表 17 例 6）。

v 若所有稀释度的平均菌落数均不在 30~300 之间，则以最接近 300 或 30 的平均菌落数乘以稀释倍数为细菌总数测定值（见表 17 例 7）。

表 17 稀释度选择及菌落总数测定值

例次	不同稀释度的平均菌落数			两个稀释度	菌落总数
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	菌落数之比	(CFU/ml)
1	1365	164	20	—	16400
2	2760	295	46	1.6	37750
3	2890	271	60	2.2	27100
4	150	30	8	2	1500
5	无法计数	1650	513	—	513000
6	27	11	5	—	270
7	无法计数	305	12	—	30500

(2) 第二种是 ISO 标准中采用的结果计算与表达方式

ISO 标准计算细菌总数是采用总计数结果大平均的方式计算来得。因假定菌落是由水样中的单个细菌经培养后生成的，细菌总数一般描述为单位体积水样中的菌落单位 CFU (colony-forming units)，其计算公式如下：

$$C_s = \frac{Z}{V_{tot}}$$

式中：

C_s ——单位水样中的菌落单位，CFU/ml；

Z ——表示计数该水样各稀释倍数培养皿中的菌落总数，CFU；

V_{tot} ——表示计数的培养皿中的该水样接种体积总和，ml。

注：最终结果是对全部合格平皿的菌落单位进行加权平均计算得来的。

(3) 两种计算结果的相对偏差

取市售细菌总数标准菌株（标准菌株编号：052014。通过 40 次试验获得的 95%可接受值范围为 22~168。）进行结果计数方法的比对实验。

对实验结果进行本标准采用的菌落单位计数方式和 ISO 标准方法的计数方式分别计数并对比如下：见表 18。

表 18 两种计算结果的对比及相对偏差

		1 [#]		1 [#] 平行		2 [#]		2 [#] 平行	
稀释倍数及菌落单位 (CFU)	10 ³	89	72	82	68	66	87	65	72
	10 ⁴	3	5	11	7	6	4	5	9
ISO 标准菌落单位 (CFU)		8.05×10 ⁴		7.64×10 ⁴		7.65×10 ⁴		6.86×10 ⁴	
本标准菌落单位 (CFU)		8.05×10 ⁴		7.50×10 ⁴		7.65×10 ⁴		6.85×10 ⁴	
ISO 标准菌落单位对数值 (lgCFU)		4.906		4.883		4.884		4.836	
本标准菌落单位对数值 (lgCFU)		4.906		4.875		4.884		4.836	
两种结果的相对偏差 (%)		0		0.08		0		0.00	
标样给定结果范围 (CFU)		6.72×10 ⁴ ~8.49×10 ⁴				6.51×10 ⁴ ~8.21×10 ⁴			

结果可以看出，两种计数方法的统计结果均在标样的给定值范围内，两种计数方法统计的结果对数相对偏差为 0.08%，配对 T 检验结果显示二者对细菌总数计数结果无显著性差异 (P=0.391)。两种计数方法对细菌总数标准样品配对 T 检验结果见表 19。因此，本标准采用国内标准中广泛采用的细菌总数计数方法。

表19 两种计数方法对细菌总数标准样品配对T检验结果

	差异性比较					t	df	P 值
	均值	标准偏差	标准误差	95%置信区间				
				下限	上限			
ISO- 本标准	.00200	.00400	.00200	-.00436	.00836	1.000	3	.391

5.7.3 结果表示

菌落总数的表示：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 CFU/ml。平均值以几何平均计算。若所有稀释度的平皿上均无菌落生长，则以“未检出”表示。

5.8 质量保证和质量控制

5.8.1 培养基检验

更换不同批次培养基时要进行阳性菌株检验，以确保其符合要求。

5.8.2 培养基保存

配置好的培养基不易保存过久，不能进行多次融化操作，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。当培养基颜色变化或脱水明显时应废弃不用。

5.8.3 空白试验

每次试验都要按 5.6.2 (5) 中空白对照进行实验室空白测定, 检查稀释水、冲洗用水、玻璃器皿和其他器具的无菌性。

5.9 废物处理

使用后的器皿及废弃物须经 121℃ 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。

6 方法验证

6.1 方法验证方案

6.1.1 验证单位基本情况

具有实验室资质的 6 家单位参加了方法验证, 分别为辽阳市环境监测站、大连市环境监测中心、沈阳市疾病预防控制中心、丹东市环境监测中心站、锦州市环境监测中心站和辽宁北方环境检测技术有限公司, 各单位参加方法验证人员基本情况登记表见表 20。

表 20 各单位参加方法验证人员基本情况登记表

编号	验证单位	姓名	性别	年龄	职务或职称	所学专业	从事相关分析工作年限
1	辽阳市环境监测站	张旭	女	28	工程师	环境工程	6 年
2	大连市环境监测中心	王中卫	男	35	高级工程师	环境科学	5 年
3	沈阳市疾病预防控制中心	张俏	女	25	助理工程师	食品工程	3 年
4	丹东市环境监测中心站	曹亚乔	女	38	工程师	环境科学	12 年
5	锦州市环境监测中心站	罗航	男	27	助理工程师	建筑环境	4 年
6	辽宁北方环境检测技术有限公司	张琪	男	35	工程师	化学	8 年

6.1.2 方法验证方案说明

根据《环境监测 分析方法标准制修订技术导则》(HJ 168-2010) 的规定, 组织 6 家有资质的实验室进行验证。验证工作主要内容是方法检出限、精密度和准确度的验证试验。

精密度的验证: 标准编制组将地下水 (约 56 CFU/ml)、地表水 (约 5.25×10^3 CFU/ml) 和生活污水 (约 7.24×10^5 CFU/ml) 三个不同浓度细菌总数的样品分配至各验证实验室, 各验证实验室在统一的时间 (低温冷藏 6 h 内) 进行细菌总数的检测, 每个样品平行测定 6 次, 分别计算样品的平均值、标准偏差、相对标准偏差及 95% 置信区间。

95%置信区间的计算参照《数据的统计处理 and 解释 正态分布均值和方差的估计与检验》(GB/T 4889-2008), 在总体方差未知情况下, 95%双侧置信区间公式为:

$$\bar{x} \pm [s/\sqrt{n}] t_{1-\alpha/2}(v)$$

其中, \bar{x} 为样本平均值, s 为标准差, n 为样本量, $t_{1-\alpha/2}(v)$ 为自由度为 v 的 t 分布的 $1-\alpha/2$ 分位数。

准确度的验证: 标准编制组将有证标准样品 (浓度为 95 MPN/ml, 可接受范围为 22~168 MPN/ml) 分配到各验证实验室, 各验证实验室进行细菌总数的测定, 每个样品平行测定 6 次, 分别计算标准物质的平均值、标准偏差、相对误差。

6.2 方法验证过程

(1) 首先, 通过筛选确定有资质和相关能力的方法验证单位, 准备验证样品等, 确定验证时间。在方法验证前, 要通过各种交流形式让参加验证的操作人员都熟悉方法原理、操作步骤及流程。验证过程中使用的仪器、设备、试剂等应符合方法相关要求。

(2) 方法验证过程中, 地下水样品采自沈阳市郊农户家饮用水井, 地表水样品采自浑河鸟岛断面水, 废水样品采自沈阳市满堂污水处理厂未处理污水。

(3) 因个别验证单位路途遥远, 无法满足在 6h 内测毕的要求, 故大连市环境监测中心在辽宁省环境监测实验中心实验室验证, 丹东市环境监测中心站在沈阳市环境监测中心站实验室验证, 其他验证单位均在各自实验室进行方法验证。

(4) 精密度: 6 个实验室分别对低浓度 (约 50 CFU/ml)、中浓度 (约 3.2×10^3 CFU/ml) 和高浓度 (约 1.5×10^5 CFU/ml) 三个不同浓度细菌总数的样品及有证标准样品 (浓度为 95 MPN/ml, 可接受范围为 22~168 MPN/ml) 进行了测定, 实验室内相对标准偏差范围分别为 2.4%~6.2%、0.59%~1.8%、0.29%~1.3% 和 1.7%~5.6%; 实验室间相对标准偏差分别为 18%、4.7%、2.4% 和 3.7%; 95% 置信区间为 31 CFU/ml~50 CFU/ml, 1.7×10^3 CFU/ml~ 3.6×10^3 CFU/ml, 9.8×10^4 CFU/ml~ 1.8×10^5 CFU/ml, 55 CFU/ml~76 CFU/ml; 均值为 39, 2.5×10^3 CFU/ml, 1.3×10^5 CFU/ml, 65 CFU/ml。

准确度: 6 家实验室对有证标准样品 (浓度为 95 MPN/ml, 可接受范围为 22~168 MPN/ml) 进行了统一测定, 相对误差为 -12.53%~-4.60%; 相对误差最终值: $-8.72\% \pm 6.50\%$ 。

(5) 《方法验证报告》见附一。

7 与开题报告的差异说明

根据开题论证会上专家的论证意见要求将标准名称由《水质 细菌总数的测定 培养法》更改为《水质 细菌总数的测定 平皿计数法》。

8 参考文献

- [1] ISO 6222: 1999(E) Water quality—Enumeration of culturable micro-organisms — Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium.
- [2] ISO 8199: 2005 Water quality .General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture.
- [3] EPA –HQ-OW-2013-0300 Standard Method 9215 B 20th Edition: Heterotrophic Plate Count - Pour Plate Method.
- [4] Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater 9222D (22ND EDITION)
- [5] ISO 29201 : 2012 Water quality—the variability of test results and the uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods.
- [6] ISO 8784—1: 2005 Pulp, paper and board--Microbiological examination--Part 1: Total count of bacteria, yeast and mould based on disintegration.
- [7] ASTM D5465-93(reapproved 2012) Standard Practice for Determining Microbial Colony Counts from Waters Analyzed by Plating Methods.
- [8] CJ 94—2005 饮用水水质标准 菌落总数.
- [9] GB/T 8538-2008 饮用天然矿泉水检验方法 菌落总数.
- [10] GB/T 5750.12-2006 生活饮用水标准检验方法 微生物指标.
- [11] GB/T 7918.2-1987 化妆品微生物标准检验方法 细菌总数测定.
- [12] GB 19298—2014 食品安全国家标准 包装饮用水.
- [13] SN/T 0168—2015 进出口食品中菌落总数计数方法.
- [14] CJ/T 3018.14-1993 生活垃圾渗沥水细菌总数的检测 平板菌落计数法.
- [15] GB/T 13093—2006 饲料中细菌总数的测定方法.
- [16] GB/T 18204.3-2013 公共场所卫生检验方法 第3部分: 空气微生物.
- [17] GB/T 18204.4-2013 公共场所卫生检验方法 第4部分: 公共用品用具微生物.
- [18] GB/T 18204.9-2000 游泳池水微生物检验方法 细菌总数测定.
- [19] GB/T 18204.11—2000 公共场所浴盆、脸(脚)盆微生物检验方法 细菌总数测定.
- [20] GB/T 12661—2008 纸和纸板 菌落总数的测定.
- [21] GB 4789.2-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定.
- [22] 《中华人民共和国药典》(2010版) 二部附录 XI 细菌、霉菌及酵母菌计数.
- [23] GB/T 1.1-2009 标准化工作导则 第1部分 标准的结构和编写规则.
- [24] 曾超鹏.应用两种营养琼脂培养基检验矿泉水中菌落总数结果的比较.广西轻工业,1996,

3:57~58.

[25] 黄智钟, 严纪文, 黄吉成等. 几种不同来源培养基检测食品中菌落总数、霉菌总数的实验效果观察. 广西轻工业, 1999, 25(4): 17~18.

[26] 边藏丽, 王恺兵. 培养基与培养时间对检测水体中细菌总数的影响. 湖北省卫生职工医学院学报, 2000, 1: 6~7.

[27] 吴俊鹏. 检样培养时间对细菌总数结果的影响. 安徽预防医学杂志, 2003, 9(1): 48.

[28] 杜宗绪. 3种平板计数琼脂培养基的质量比较. 山西农业科学, 2014, 42(8): 835~837.

附一

方法验证报告

方法名称：水质 细菌总数的测定 平皿计数法

项目主编单位：辽宁省环境监测实验中心

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

项目负责人及职称：张 崢 教授级高级工程师

通讯地址：辽宁省沈阳市东陵区双园路 30 甲-3 号

电话：024-62780476

报告编写人及职称：张 崢 教授级高级工程师

报告日期：2015 年 8 月 14 日

1 原始测试数据

1.1 实验室基本情况

附表 1 参加方法验证人员基本情况登记表

姓名	性别	年龄	职务或职称	所学专业	从事相关分析工作年限	验证单位
张旭	女	28	工程师	环境工程	6 年	辽阳市环境监测站
王中卫	男	35	高级工程师	环境科学	5 年	大连市环境监测中心
张俏	女	25	助理工程师	食品工程	3 年	沈阳市疾病预防控制中心
曹亚乔	女	38	工程师	环境科学	12 年	丹东市环境监测中心站
罗航	男	27	助理工程师	建筑环境	4 年	锦州市环境监测中心站
张琪	男	35	工程师	化学	8 年	辽宁北方环境检测技术有限公司

附表 2 使用仪器情况登记表

仪器名称	规格型号	仪器出厂编号	性能状况	备注
生化培养箱	250B	29-48	良好	辽阳市环境监测站
立式压力蒸汽灭菌器	YXQ-LS-50S II	2012-B4837	良好	
电热恒温培养箱(上海佳胜)	DHP9160	01090701	合格	大连市环境监测中心
自动电热压力蒸汽灭菌器(上海博迅)	BXM-30R	2013-B5465	合格	
生化培养箱	BG-80	14018	合格	沈阳市疾病预防控制中心
高压灭菌锅	YXQ-LS-75S11	1275S-380	合格	
生化培养箱	DHP-9082302A-43	1101130301	合格	丹东市环境监测中心站
高压灭菌锅	YXQ-LS-75S11	1275S-380	合格	
生化培养箱	LRH-250A	A0312359	合格	锦州市环境监测中心站
立式压力蒸汽灭菌器	LDZX-30FB	08M596	合格	
生化培养箱	LRH-250A	SPH-080	良好	辽宁北方环境检测技术有限公司
立式压力蒸汽灭菌器	LDZX-50KBS	10W915	良好	

附表 3 使用试剂及培养基登记表

名称	生产厂家、规格	纯化处理方法	备注
营养琼脂	北京奥博星生物技术有限责任公司 250g; BR: 生物试剂	无	辽阳市环境监测站
营养琼脂	北京路桥技术有限责任公司 250g; BR: 生物试剂	无	大连市环境监测中心
营养琼脂	北京奥博星生物技术有限责任公司 500g	无	沈阳市疾病预防控制中心
营养琼脂	北京奥博星生物技术有限责任公司 500g BR: 生物试剂	无	丹东市环境监测中心 站
营养琼脂	北京奥博星生物技术有限责任公司 250g; BR: 生物试剂	无	锦州市环境监测中心 站
营养琼脂	北京奥博星生物技术有限责任公司 250g; BR: 生物试剂	无	辽宁北方环境检测技术 有限公司

1.2 方法精密度测试数据

标准编制组分别将地下水、浑河鸟岛断面水、满堂污水处理厂污水和有证标准样品（95MPN/ml，可接受范围为 22~168 MPN/ml）分发至各单位，统一时间进行精密度验证，结果见附表 4~附表 9。

附表 4 精密度测试数据

验证单位：辽阳市环境监测站

测试日期：2015 年 7 月 9 日

平行号		试 样			
		浓度（含量）1	浓度（含量）2	浓度（含量）3	标准样品
测定结果	1	1.74	3.45	5.10	1.83
	2	1.65	3.51	5.13	1.89
	3	1.73	3.48	5.12	1.91
	4	1.72	3.46	5.13	1.89
	5	1.69	3.47	5.14	1.88
	6	1.65	3.47	5.14	1.92
平均值 \bar{x}_i		1.70	3.47	5.13	1.89
标准偏差 S_i		0.04	0.02	0.02	0.03
相对标准偏差 RSD%		2.35	0.59	0.29	1.66
95%置信区间		1.65~1.74	3.45~3.49	5.11~5.15	1.86~1.92

附表 5 精密度测试数据

验证单位：大连市环境监测中心

测试日期：2015年7月9日

平行号		试 样			
		浓度（含量）1	浓度（含量）2	浓度（含量）3	标准样品
测定结果	1	1.60	3.30	5.20	1.84
	2	1.61	3.36	5.25	1.85
	3	1.55	3.35	5.24	1.86
	4	1.63	3.26	5.21	1.87
	5	1.64	3.39	5.25	1.88
	6	1.72	3.40	5.27	1.95
平均值 \bar{x}_i		1.63	3.34	5.24	1.88
标准偏差 S_i		0.06	0.05	0.03	0.04
相对标准偏差 RSD%		3.45	1.61	0.51	2.10
95%置信区间		1.57~1.69	3.29~3.39	5.21~5.27	1.84~1.92

附表 6 精密度测试数据

验证单位：沈阳市疾病预防控制中心

测试日期：2015年7月9日

平行号		试 样			
		浓度（含量）1	浓度（含量）2	浓度（含量）3	标准样品
测定结果	1	1.56	3.17	4.94	1.74
	2	1.59	3.10	5.02	1.70
	3	1.48	3.04	4.98	1.85
	4	1.57	3.11	5.02	1.75
	5	1.60	3.20	5.04	1.77
	6	1.49	3.11	5.00	1.80
平均值 \bar{x}_i		1.55	3.12	5.00	1.77
标准偏差 S_i		0.05	0.06	0.04	0.05
相对标准偏差 RSD%		3.30	1.81	0.72	2.94
95%置信区间		1.50~1.60	3.06~3.18	4.96~5.04	1.72~1.82

附表 7 精密度测试数据

验证单位：丹东市环境监测中心站

测试日期：2015 年 7 月 9 日

平行号		试 样			
		浓度 (含量) 1	浓度 (含量) 2	浓度 (含量) 3	标准样品
测定结果	1	2.51	3.49	5.21	1.71
	2	2.38	3.56	5.20	1.71
	3	2.41	3.46	5.22	1.78
	4	2.45	3.49	5.25	1.73
	5	2.23	3.51	5.25	1.78
	6	2.51	3.54	5.25	1.67
平均值 \bar{x}_i		2.42	3.51	5.23	1.73
标准偏差 S_i		0.10	0.04	0.02	0.04
相对标准偏差 RSD%		4.33	1.04	0.44	2.51
95%置信区间		2.32~2.52	3.47~3.55	5.21~5.25	1.69~1.77

附表 8 精密度测试数据

验证单位：锦州市环境监测中心站

测试日期：2015 年 7 月 9 日

平行号		试 样			
		浓度 (含量) 1	浓度 (含量) 2	浓度 (含量) 3	标准样品
测定结果	1	1.78	3.51	5.29	1.63
	2	1.54	3.55	5.19	1.80
	3	1.64	3.58	5.17	1.78
	4	1.66	3.60	5.19	1.65
	5	1.79	3.52	5.09	1.82
	6	1.58	3.57	5.14	1.88
平均值 \bar{x}_i		1.67	3.56	5.18	1.76
标准偏差 S_i		0.10	0.04	0.07	0.10
相对标准偏差 RSD%		6.15	0.99	1.28	5.62

95%置信区间	1.57~1.77	3.52~3.60	5.11~5.25	1.66~1.86
---------	-----------	-----------	-----------	-----------

附表 9 精密度测试数据

验证单位：辽宁北方环境检测技术有限公司

测试日期：2015 年 7 月 9 日

平行号		试 样			
		浓度（含量）1	浓度（含量）2	浓度（含量）3	标准样品
测定结果	1	1.70	3.42	4.94	1.78
	2	1.64	3.34	4.93	1.82
	3	1.56	3.39	4.91	1.86
	4	1.56	3.37	5.04	1.75
	5	1.56	3.31	4.92	1.77
	6	1.67	3.34	4.92	1.89
平均值 \bar{x}_i		1.62	3.36	4.94	1.81
标准偏差 S_i		0.06	0.04	0.05	0.05
相对标准偏差 RSD%		3.91	1.18	0.98	3.03
95%置信区间		1.56~1.68	3.32~3.40	4.89~4.99	1.76~1.86

1.3 方法准确度测试数据

标准编制组将浓度为 95 MPN/ml（可接受范围为 22~168 MPN/ml）的标准样品分发至各验证实验室，统一时间开展准确度验证试验，结果见附表 10~附表 15。

附表 10 标准样品测试数据

验证单位：辽阳市环境监测站

测试日期：2015 年 7 月 8 日

平行号		标准样品		备注
		浓度值	对数值	
测定结果 (CFU/ml)	1	68	1.83	
	2	78	1.89	
	3	81.5	1.91	
	4	77	1.89	
	5	75.5	1.88	
	6	84	1.92	
平均值 \bar{x}_i			1.89	

标准样品浓度 (CFU/ml)		95	1.98	
相对误差 REi			-4.60%	
注：测定结果为平行双样结果的平均值； i 为实验室编号。				

附表 11 标准样品测试数据

验证单位：大连市环境监测中心

测试日期：2015 年 7 月 8 日

平行号		标准样品		备注
		测定结果	对数值	
测定结果 (CFU/ml)	1	69	1.84	
	2	71	1.85	
	3	72.5	1.86	
	4	74	1.87	
	5	76.5	1.88	
	6	89.5	1.95	
平均值 \bar{x}_i			1.88	
标准样品浓度 (CFU/ml)		95	1.98	
相对误差 REi			-5.19%	
注：测定结果为平行双样结果的平均值； i 为实验室编号。				

附表 12 标准样品测试数据

验证单位：沈阳市疾病预防控制中心

测试日期：2015 年 7 月 8 日

平行号		标准样品		备注
		测定结果	对数值	
测定结果 (CFU/ml)	1	55.5	1.74	
	2	50	1.70	
	3	70	1.85	
	4	56.5	1.75	
	5	59.5	1.77	
	6	63	1.80	
平均值 \bar{x}_i			1.77	
标准样品浓度 (CFU/ml)		95	1.98	
相对误差 REi			-10.59%	
注：测定结果为平行双样结果的平均值； i 为实验室编号。				

附表 13 标准样品测试数据

验证单位：丹东市环境监测中心站

测试日期：2015年7月8日

平行号		标准样品		备注
		测定结果	对数值	
测定结果 (CFU/ml)	1	51	1.71	
	2	51.5	1.71	
	3	60.5	1.78	
	4	53.5	1.73	
	5	60	1.78	
	6	47	1.67	
平均值 \bar{x}_i			1.73	
标准样品浓度 (CFU/ml)		95	1.98	
相对误差 REi			-12.53%	
注：测定结果为平行双样结果的平均值； i 为实验室编号。				

附表 14 标准样品测试数据

验证单位：锦州市环境监测中心站

测试日期：2015年7月8日

平行号		标准样品		备注
		测定结果	对数值	
测定结果 (CFU/ml)	1	42.5	1.63	
	2	62.5	1.80	
	3	60.5	1.78	
	4	44.5	1.65	
	5	65.5	1.82	
	6	76	1.88	
平均值 \bar{x}_i			1.76	
标准样品浓度 (CFU/ml)		95	1.98	
相对误差 REi			-11.01%	
注：测定结果为平行双样结果的平均值； i 为实验室编号。				

附表 15 标准样品测试数据

验证单位：辽宁北方环境检测技术有限公司

测试日期：2015年7月8日

平行号		标准样品		备注
		测定结果	对数值	
测定结果 (CFU/ml)	1	60	1.78	
	2	66.5	1.82	
	3	72	1.86	
	4	56	1.75	
	5	59.5	1.77	
	6	77.5	1.89	
平均值 \bar{x}_i			1.81	
标准样品浓度 (CFU/ml)		95	1.98	
相对误差 REi			-8.40%	
注：测定结果为平行双样结果的平均值；i 为实验室编号。				

1.4 其他需要说明的问题

- (1) 检出限：考虑到实验室间差异，检出限选取 6 家实验室测定的结果中的最大值。
- (2) 以本方法确定的 4 倍检出限为测定下限。
- (3) 本课题组在进行方法验证报告数据统计时，原始数据取对数后，四舍五入法保留两位有效数字进行计算。
- (4) 方法精密度和准确度统计结果能满足方法特性指标要求。

2 方法验证数据汇总

2.1 方法精密度数据汇总

附表 16 各验证实验室实际样品的精密度验证结果

实验室号	地下水			地表水			生活污水			标准样品		
	\bar{x}_i	S_i	RSD%	\bar{x}_i	S_i	RSD%	\bar{x}_i	S_i	RSD%	\bar{x}_i	S_i	RSD%
1	49.5	0.04	2.35	2982.5	0.02	0.59	134083	0.02	0.29	1.89	0.03	1.66
2	42.5	0.06	3.45	2227.5	0.05	1.61	172083	0.03	0.51	1.88	0.04	2.10
3	36	0.05	3.30	1325	0.06	1.81	100333	0.04	0.72	1.77	0.05	2.94
4	260	0.10	4.33	3227	0.04	1.04	170500	0.02	0.44	1.73	0.04	2.51
5	47	0.10	6.15	3608	0.04	0.99	152583	0.07	1.28	1.76	0.10	5.62
6	42	0.06	3.91	2308	0.04	1.18	88000	0.05	0.98	1.81	0.05	3.03
$\bar{\bar{X}}$	1.77			3.39			5.12			1.81		
S^i	0.32			0.16			0.12			0.07		
RSD%	18.41			4.68			2.42			3.65		
95% 置信	31~50			$1.7 \times 10^3 \sim 3.6 \times 10^3$			$9.8 \times 10^4 \sim 1.8 \times 10^5$			55~76		

区间				
注：表内的结果计算都是以相应样品结果的常用对数值计算得来。				

结论：6 个实验室对三种含不同浓度细菌总数的样品及有证标准样品（浓度为 95MPN/ml，可接受范围为 22~168MPN/ml）进行了统一测定：

实验室内相对标准偏差范围分别为 2.4%~6.2%、0.59%~1.8%、0.29%~1.3%和 1.7%~5.6%；实验室间相对标准偏差分别为 18%、4.7%、2.4%和 3.7%；

95%置信区间分别为 31 CFU/ml~50 CFU/ml、 1.7×10^3 CFU/ml~ 3.6×10^3 CFU/ml、 9.8×10^4 CFU/ml~ 1.8×10^5 CFU/ml 和 55 CFU/ml~76 CFU/ml，均值分别为 39 CFU/ml、 2.5×10^3 CFU/ml、 1.3×10^5 CFU/ml 和 65 CFU/ml。

2.2 方法准确度数据汇总

附表 17 各验证单位标准样品的准确度验证结果

实验室号	\bar{x}_i	RE _i %
1	1.89	-4.60
2	1.87	-5.19
3	1.77	-10.59
4	1.73	-12.53
5	1.76	-11.01
6	1.81	-8.40
$\overline{RE\%}$		-8.72
S _{RE}		3.25%
注：表内的结果计算都是以相应样品结果的常用对数值计算得来。		

结论：6 个实验室对含细菌总数为 95 CFU/ml 的标准样品进行了统一测定：

相对误差为-13%~-4.6%；

相对误差最终值：-8.7%±6.5%。

3 方法验证结论

(1) 本课题组在进行方法验证报告数据统计时，原始数据取对数后，四舍五入法保留两位有效数字进行计算。

(2) 方法精密度和准确度统计结果能满足方法特性指标要求。

(3) 精密度：6 个实验室分别对低浓度（约 50 CFU/ml）、中浓度（约 3.2×10^3 CFU/ml）和高浓度（约 1.5×10^5 CFU/ml）三个不同浓度细菌总数的样品及有证标准样品（浓度为 95

MPN/ml, 可接受范围为 22~168 MPN/ml) 进行了测定, 实验室内相对标准偏差范围分别为 2.4%~6.2%、0.59%~1.8%、0.29%~1.3%和 1.7%~5.6%; 实验室间相对标准偏差分别为 18%、4.7%、2.4%和 3.7%; 95%置信区间分别为 31 CFU/ml~50 CFU/ml、 1.7×10^3 CFU/ml~ 3.6×10^3 CFU/ml、 9.8×10^4 CFU/ml~ 1.8×10^5 CFU/ml 和 55 CFU/ml~76 CFU/ml; 均值分别为 39 CFU/ml、 2.5×10^3 CFU/ml、 1.3×10^5 CFU/ml 和 65 CFU/ml。

(4) 准确度: 6 个实验室对有证标准样品 (浓度为 95 MPN/ml, 可接受范围为 22~168 MPN/ml) 进行测定, 实验室内相对误差范围为 -13%~-4.6%; 相对误差的最终值为 $-8.7\% \pm 6.5\%$ 。