

附件 3

《水质 粪大肠菌群的测定 多管发酵法
(征求意见稿)》

编制说明

《水质 粪大肠菌群的测定 多管发酵法》标准编制组

二〇一七年九月

项目名称：水质 粪大肠菌群的测定 多管发酵法

项目统一编号：986

承担单位：辽宁省环境监测实验中心

编制组主要成员：卢雁、丁振军、王朝霞、张峥、吕晓洁、付友生、
李杨、张爽、问青春、赵丽娟、付毓、杨冬雷

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	标准修订的必要性分析.....	3
2.1	粪大肠菌群的环境危害.....	3
2.2	相关环保标准和环保工作的需要.....	3
2.3	现行环境监测分析方法标准的实施情况和存在的问题.....	4
3	国内外相关分析方法研究.....	4
3.1	主要国家、地区及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.....	6
4	标准制修订的基本原则和技术路线.....	7
4.1	标准制修订的基本原则.....	7
4.2	标准制修订的技术路线.....	7
5	方法研究报告.....	8
5.1	方法研究的目标.....	9
5.2	方法原理.....	9
5.3	试剂和材料.....	9
5.4	仪器和设备.....	10
5.5	样品.....	10
5.6	分析步骤.....	12
5.7	结果计算.....	15
5.8	质量保证和质量控制.....	19
6	方法验证.....	20
6.1	方法验证方案.....	20
6.2	方法验证过程.....	21
7	与开题报告的差异说明.....	21
8	参考文献.....	21
	附一 方法验证报告.....	23

《水质 粪大肠菌群的测定 多管发酵法》编制说明

1 项目背景

1.1 任务来源

根据国家环境保护部（原国家环保总局）《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 粪大肠菌群的测定 多管发酵法与滤膜法》的标准制修订任务，项目编号 986。

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）接到修订《水质 粪大肠菌群的测定 多管发酵法与滤膜法》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，迅速开展相关的调查工作，收集国内外关于多管发酵法和滤膜法测定水中粪性大肠杆菌的分析方法，及相关的标准方法，在广泛阅读、认真研究相关资料的基础上，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、ISO 相关方法及实际工作中遇到的问题和总结的经验，制定了实施方案。同时，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；本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）多管发酵法和滤膜法分成两个标准；
- （3）增加原始数据及报告的具体内容及要求；
- （4）进一步细化操作过程及过程中的质量控制要求。

1.2.4 落实专家意见，深入开展方法验证工作

- （1）2015 年 4 月，结合专家开题论证意见，分别选取地表水、地下水、工业废水和生活污水四种类型水进行进一步的实验室内方法研究，并对结果数据进行汇总和分析整理，编写完成了《水质 粪大肠菌群的测定 多管发酵法》的标准草案及验证方

案。

- (2) 2015年7月13日-17日，组织6家有资质的实验室进行实验室间方法验证，并于验证结束后收回全部的验证报告。
- (3) 在此基础上进行了数据的汇总和分析整理工作，同时完善了《水质 粪大肠菌群的测定 多管发酵法》标准征求意见稿及编制说明。

1.2.5 召开专家研讨会，征求专家意见

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”，补充12管法及15管法的检出限和适用范围；分析步骤中分别表述12管法及15管法的操作步骤；修改完善术语和定义；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，补充说明现行方法HJ/T 347-2007（试行）使用情况及存在问题；补充条件实验及验证实验中样品、仪器等详细信息；补充精密度和准确度的验证结论；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。

1.2.6 落实专家意见，完善标准征求意见稿及编制说明

结合专家论证意见，补充条件实验，并进一步修改完善《水质 粪大肠菌群的测定 多管发酵法》的标准征求意见稿及编制说明。

1.2.7 召开技术审查会，征求专家意见

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、废水等水体中粪大肠菌群多管发酵法测定的需要。

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，修改粪大肠菌群定义及方法原理；完善9.2.2接种用水量参考；“11.1 精密度”中置信区间部分增加几何均值；增加阳性和阴性标准菌株定性质控内容。
- (2) 在编制说明中，增加实验室内95%置信区间的内容。
- (3) 根据专家意见将标准中部分文本进行修改。

1.2.8 落实审查委员会审查意见，进一步完善标准征求意见稿及编制说明

结合审查委员会审查意见，对文本和编制说明的相关部分进一步修改，修改后可公开征求意见。

2 标准修订的必要性分析

2.1 粪大肠菌群的环境危害

粪大肠菌群又称耐热大肠菌群，并非细菌学分类名称，而是卫生用语，它们指的不是某一种或某一属细菌，而是一类细菌，是指 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，主要包括埃希氏菌属和耐热的克雷伯菌属细菌，是生长于人和温血动物肠道中的一组肠道细菌，除一般正常细菌外，同时也会有一些肠道致病菌存在（如沙门氏菌、志贺氏菌等），随粪便排出体外，约占粪便干重的 1/3 以上，故称为粪大肠菌群。它主要来自粪便，在自然界中易死亡，若检出可说明检测对象近期受到了粪便污染，水体中存在着肠道致病菌污染的可能性，潜伏着中毒和流行病的威胁，对人体健康具有潜在的危险性。

水质中粪大肠菌群超标危害主要引起腹泻、肠胃感染等。水质粪大肠菌群结果的高低，既表明水体受到粪便污染的程度，也反映了水质对人体健康危害性的大小。

2.2 相关环保标准和环保工作的需要

我国 9 个标准中规定了浓度限值和排放限值。《地表水环境质量标准》（GB 3838-2002）明确规定了粪大肠菌群的 I~V 类标准限值，其限值浓度分别为 200 个/L、2000 个/L、10000 个/L、20000 个/L 和 40000 个/L。此外，《生活饮用水卫生标准》（GB 5749-2006）、《海水水质标准》（GB 3097-1997）和《农田灌溉水质标准》（GB 5084-2005）等都对粪大肠菌群限值做了明确规定。《医疗机构水污染物排放标准》（GB 18466-2005）、《畜禽养殖业污染物排放标准》（GB 18596-2001）、《城镇污水处理厂污染物排放标准》（GB 18918-2002）和《污水综合排放标准》（GB 8978-1996）等排放标准都规定了粪大肠菌群的排放限值。相关标准对粪大肠菌群的限值及分类见表 1。

表 1 相关标准对粪大肠菌群的限值及分类

序号	标准号	标准名称	水质分类	标准值	单位
1	GB 3838-2002	地表水环境质量标准	I 类	≤200	个/L
			II 类	≤2000	
			III 类	≤10000	
			IV 类	≤20000	
			V 类	≤40000	
2	GB 5749-2006	生活饮用水卫生	/	不得检出	/
3	CJ/T 206-2005	城市供水水质标	/	不得检出	个/100ml
4	GB 3097-1997	海水水质标准	/	≤2000	个/L
			供人生食的贝类增殖水质	≤140	
5	GB 5084-2005	农田灌溉水质标准	水作	≤4000	个/100 ml
			旱作	≤4000	
			蔬菜：加工、烹调及去皮蔬菜	≤2000	

序号	标准号	标准名称	水质分类	标准值	单位
			生食类蔬菜、瓜类和草本水果	≤1000	
6	GB 18466-2005	医疗机构水污染物排放标准	传染病、结核病医疗机构水污染物	100	MPN/L
			综合医疗机构和其他医疗机构水污	500	
7	GB 18596-2001	畜禽养殖业污染	集约化畜禽养殖业水污染物最高允	10000	个/L
8	GB 18918-2002	城镇污水处理厂污染物排放标准	一级 A 标准	10 ³	个/L
			一级 B 标准	10 ⁴	
			二级标准	10 ⁴	
			三级标准	—	
9	GB 8978-1996	污水综合排放标准	医院、兽医院及医疗机构含病原体	500	个/L
			医院、兽医院及医疗机构含病原体	1000	
			医院、兽医院及医疗机构含病原体	5000	

2.3 现行环境监测分析方法标准的实施情况和存在的问题

现行的标准《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）中的多管发酵法是一个经典的方法，国内外广泛使用且沿用多年，但该标准是试行标准，没有进行验证实验，不满足 HJ 168-2010 的要求，且该标准不够细化，迫切需要对现有方法标准进行样品采集、样品保存和储藏、实验室质量控制、废物处理、实验步骤细化等方面进行增加和修订，以满足现有环境保护工作的需求。

鉴于本标准是对现行标准《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）的修订，所以标准编制组广泛征求了各省、自治区、直辖市环境监测中心（站）的意见，主要存在如下问题：

- （1）试行标准中缺少对应的采样方法和样品保存措施；
- （2）缺少质量保证和质量控制措施；
- （3）缺少废物处置内容。

标准编制组对以上意见予以了采纳，在修订标准中增加了采样方法、样品保存方法、质量保证和质量控制措施、废物处理等内容，并对实验步骤进行了细化。

2.4 修订的主要内容

按照 HJ 168-2010 的要求增加了规范性引用文件、术语和定义、精密度和准确度等相关内容。为了增加可操作性，在操作中增加了干扰和消除、样品的采集和保存的、质量控制与质量保证和废物处理等相关内容。

3 国内外相关分析方法研究

3.1 主要国家、地区及国际组织相关分析方法研究

目前国内外对粪大肠菌群名称定义不同，称其为耐热大肠菌群是指其不全是粪性来源，

而是强调其对温度的耐受性方面特点；称其为粪大肠菌群是指其主要来自于温血动物的粪便，长期在温暖的肠道中生活，能够适应较高的培养温度。目前，国外几个主要的标准中对耐热大肠菌群与粪大肠菌群的比较见表 2。

表 2 耐热大肠菌群与粪大肠菌群的比较

项目	依据	定义
耐热大肠菌群	NMKL、ISO	在 44.5℃ 培养，24 h 内能产酸产气的细菌。
粪大肠菌群	NMKL	在胰蛋白胨肉汤中于 44.5℃，24 h 内产生吲哚的耐热大肠菌群。
	AOAC	于 LST 中 36℃ 培养 48 h 内产气，并于 EC 内培养 44℃ 24 h 产气的一群细菌。

在检测方法上，根据侧重点的不同有称为 MPN 检测程序和多管发酵法等，MPN 检定程序主要强调检测结果的统计是利用数理统计中最大可能数（Most Probable Number）的方式进行计算；多管发酵法是强调培养是通过多个培养管进行的，培养管的数量也有每个浓度 3 管和每个浓度 5 管的不同。培养温度、培养基和培养时间也有不同，培养温度的不同主要体现在耐受温度选用的高低略有不同，有 42.0℃、44.0℃、44.5℃、45.0℃等；培养基的不同主要是根据培养方式的不同选用相应的培养基。

多管发酵法是根据粪大肠菌群能发酵乳糖、产酸产气等有关特性，通过多管发酵以 MPN 来表示试验结果。对多管发酵法除了上述检测方法名称、粪大肠菌群的名称、培养温度、培养基和培养时间的不同外，基本操作相似，都是利用试管发酵法及 MPN 统计结果，测定水中的粪大肠菌群。国外主要检测方法对比情况见表 3。

表 3 国外主要检测方法对比情况

	ISO	EPA	APHA
标准名称	ISO 9308-1:2014 Water quality -Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria- Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora	Coliforms—Total, Fecal and E. Coli (method 8001、8001A)	STANDARD METHODS 9221 E. FECAL COLIFORM PROCEDURE (20th Edition)
适用范围	饮用水、消毒池出水和水处理厂出水等低细菌含量的水样中的大肠杆菌和大肠菌群	饮用水、废水	饮用水、河流污染、原水、废水处理系统、洗浴用水、海水和一般的水质监测
样品保存温度	5±3℃	0-10℃	——
样品保存时间	特殊情况下最长 24 h，但应在结果报告中写明	饮用水不多于 30 h；废水不多于 6 h	——
培养基	大肠菌群显色培养基（CCA）	月桂基胰蛋白胨肉汤培养管	月桂基胰蛋白胨肉汤、EC 培养

		(哈希)、EC 培养基	基
使用管数	——	10 管法	饮用水 5 管、10 管法，非饮用水 15 管法
培养温度	36±2℃	35±0.5℃；44.5±0.2℃	35±0.5℃；44.5±0.2℃
培养时间	21±3h	24±2 h 24±2 h	24±2 h 24±2 h
结果判读	1.β-D-半乳糖苷酶反应阳性(粉红色)判定为疑似大肠菌群阳性，再用氧化酶阴性反应(不出现深蓝色)验证为大肠菌群 2.β-D-半乳糖苷酶和β-D-葡萄糖醛酸酶反应阳性(粉红色和深蓝色)，证实为大肠杆菌	初发酵产酸产气，复发酵产气为粪大肠菌群阳性	初发酵产酸产气，复发酵产气为粪大肠菌群阳性

3.2 国内相关分析方法研究

目前国内的粪大肠菌群检测方法有多管发酵法、滤膜法、酶法、LTSE 法和纸片法。多管发酵法是根据粪大肠菌群能发酵乳糖产酸产气的特征，检测样品中粪大肠菌群的方法；滤膜法是利用微孔滤膜过滤一定量样品，将样品中含有的细菌截留在滤膜上，然后将滤膜贴在选择性培养基上，经培养后直接计数滤膜上生长的典型粪大肠菌群菌落；酶法采用大肠菌群细菌能产生β-半乳糖苷酶分解 ONPG 使培养液呈黄色，以及大肠埃希氏菌产生β-葡萄糖醛酸酶分解 MUG 使培养液在波长 366 nm 紫外光下产生荧光的原理，来判断样品中是否含有大肠菌群及大肠埃希氏菌；LTSE 法是用专门的 LTSE 肉汤快速检验粪大肠菌群的方法；纸片法是将一定量的乳糖、指示剂及营养成分等吸附于一定面积的无菌滤纸上用来代替多管发酵的发酵管从而简化实验操作的方法。国内主要多管发酵法对比情况见表 4。

表 4 国内主要多管发酵法对比情况

标准来源	GB (国标)	SL (水利)	HJ (环境)	水和废水监测分析方法 第四版
标准名称	GB/T 5750.12-2006 《生活饮用水标准检验方法 微生物指标》	SL 355-2006 《水质 粪大肠菌群的测定——多管发酵法》	HJ/T 347-2007 《水质 粪大肠菌群的测定 多管发酵法和滤膜法(试行)》	——
适用范围	生活饮用水及其水源水	地表水、地下水、生活饮用水等，特别是浑浊度高的样品	地表水、地下水及废水	地表水、地下水及废水
样品保存温度	——	4℃	——	10℃以下
样品保存时间	——	4 h	——	6 h
培养基	乳糖蛋白胨培养基、EC 培养基、伊红美蓝	乳糖蛋白胨培养基、EC 培养基、伊红美蓝	乳糖蛋白胨培养基、EC 培养基	乳糖蛋白胨培养基、EC 培养基

	琼脂	琼脂		
使用管数	5 管法, 15 管法	12 管法, 15 管法	12 管法, 15 管法	12 管法, 15 管法
培养温度	36±1℃, 44.5℃	37℃, 44.5℃	37±0.5℃, 44.5±0.5℃	37±0.5℃, 44.5±0.5℃
培养时间	24±2 h, 18~24 h	24±2 h, 24±2 h	24±2 h, 24±2 h	24±2 h, 24±2 h
结果判读	初发酵产酸产气, 复发酵产气为耐热大肠菌群阳性	初发酵产酸产气, 复发酵产气为粪大肠菌群阳性	初发酵产酸产气, 复发酵产气为粪大肠菌群阳性	初发酵产酸产气, 复发酵产气为粪大肠菌群阳性

3.3 与本方法标准的关系

本方法标准与《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）和《水和废水监测分析方法第四版》（增补版）中内容一致，使用 12 管法和 15 管法，分别在乳糖蛋白胨培养基和 EC 培养基培养上以 37±0.5℃ 和 44.5±0.5℃ 的培养温度培养 24±2 h 进行初发酵和复发酵进而计数。

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

多管发酵法方法检出限：12 管法为 3 MPN/L；15 管法为 20 MPN/L。适用于地表水、地下水和废水中粪大肠菌群的测定，满足相关环保标准的要求，且该方法技术要求相对较低，分析成本亦较低，便于进行普及和推广。

本标准依据《国家环境保护标准制修订工作管理办法》和《环境监测分析方法标准制修订技术导则》（HJ 168-2010）等文件的要求，对现行的标准《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）进行修订，确保方法标准的科学性、先进性、可行性和可操作性。同时具有普遍适用性，易于推广使用。满足大多数基层实验室的需要，满足水质中粪大肠菌群的检测要求。

根据现行标准的局限性，做了如下修订：增加样品采集、样品保存和储藏、实验室质量控制、废物处置等方面的内容，对实验步骤进行细化修订。

4.2 标准制修订的技术路线

粪大肠菌群是我国环境质量和污染物排放标准的重要监测指标，目前，各级环境监测部门都配置了相应的仪器设备，具备粪大肠菌群检测能力。

多管发酵法是检测粪大肠菌群的经典方法，国内外一直沿用多年，该方法技术要求相对较低，分析成本亦较低，便于普及和推广。本标准制修订的技术路线见图 1。

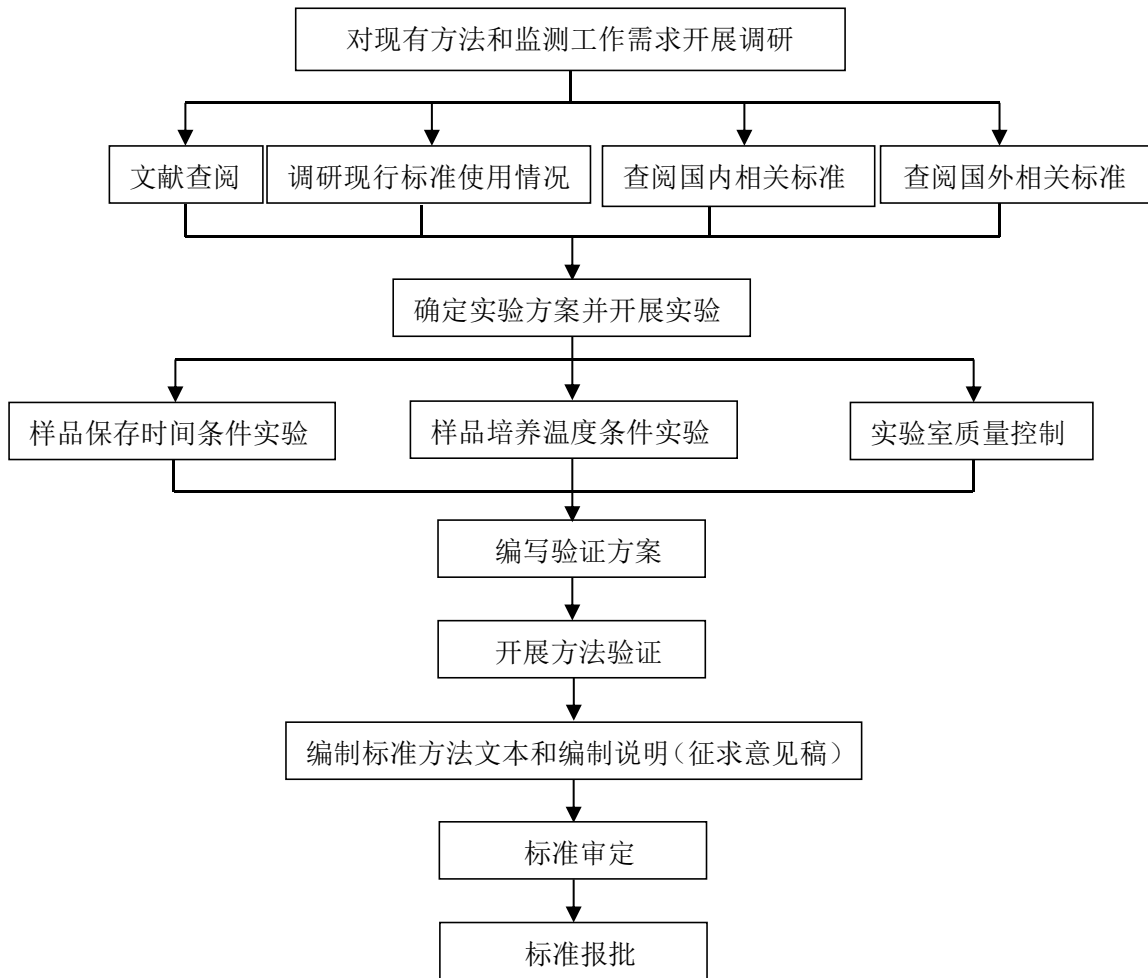


图 1 标准制修订的技术路线

5 方法研究报告

该方法是对《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）中的多管发酵法的修订，与原方法相比增删条款及增删原因见表 5。

表 5 本标准与原标准内容区别

章节号	增删条款	增删内容原因
1	增加了方法的检出限说明，明确了 12 管法和 15 管法的检出限	HJ 168-2010 要求
2	增加了规范性引用文件，明确了引用的准确来源	HJ 168-2010 要求
3	增加了粪大肠菌群和最大可能数的定义	HJ 168-2010 要求
5	增加了干扰和消除，对消除样品中的检测干扰因素进行了具体规定	增加可操作性
6	增加了实验用水、无菌水、硫代硫酸钠和乙二胺四乙酸二钠的相关要求	增加可操作性
7	增加了对检测所需的仪器和设备的规范要求。	增加可操作性
8	增加了对样品采集方法和样品保存条件的规范要求	增加可操作性
9	增加了样品的取用及稀释方法、样品接种量相关内容、培养介质的改变	增加可操作性
10	增加了结果表示的内容，对结果表示的方法和形式进行了规范	增加可操作性

章节号	增删条款	增删内容原因
11	增加了增加了精密度和准确度的相关内容	HJ 168-2010 要求
12	增加了质量保证和质量控制的相关内容	增加可操作性
13	增加了废物处理的内容的相关内容	增加可操作性

5.1 方法研究的目标

本标准适用于地表水、地下水和废水中粪大肠菌群的测定。本研究旨在建立一个通用性的粪大肠菌群测定的国家标准方法。本方法的检出限：12 管法为 3 MPN/L；15 管法为 20 MPN/L。

5.2 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是否有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。

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分析纯化学试剂。

5.3.1 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。

5.3.2 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），配成三倍浓缩的乳糖蛋白胨培养液，制法同上。

5.3.3 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 ₂ HPO ₄ ）	4 g
磷酸二氢钾（KH ₂ PO 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。

5.3.4 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。

5.3.5 硫代硫酸钠溶液： $\rho(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 0.10 \text{ g/ml}$ ，称取硫代硫酸钠 10 g，溶于适量蒸馏水或去离子水中，定容至 100 ml，现配。

5.3.6 乙二胺四乙酸二钠溶液： $\rho(\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = 0.15 \text{ g/ml}$ ，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，此溶液保质期为 30 d。

5.4 仪器和设备

5.4.1 采样瓶：500 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℃、101.3 kpa。

5.4.3 隔水式恒温培养箱：温度偏差 $\pm 0.5^\circ\text{C}$ 。

5.4.4 pH计：至少准确到 0.1 pH 单位。

5.4.5 接种环：直径 3 mm。

注 1：移液管、试管、采样瓶等玻璃器皿及采样器具试验前要按无菌操作要求包扎，121℃ 高压蒸汽灭菌 20 min 备用。

5.5 样品

5.5.1 采样瓶

通常采用以耐用玻璃制成，500 ml 带螺旋帽或磨口塞的广口玻璃瓶。将洗涤干净的采样瓶盖好瓶塞，用牛皮纸等防潮纸将瓶塞、瓶顶和瓶颈处包裹好，用高压蒸汽灭菌器 121℃ 经 20 min 灭菌。

5.5.2 去氯及重金属

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，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，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）。

5.5.3 样品的采集

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。

在危险地点或恶劣气候条件下采样时，必须有防护措施，保证采样安全，并作好记录，以便对检验结果正确解释。

采样完毕，应将采样瓶编号，做好采样记录。将采样日期、采样地点、采水深度、采样方法、样品编号、采样人及水温、气温情况等登记在记录卡上。

5.5.4 样品的保存

水样采集之后，要迅速进行检验，如果不能立即检验就应该使用 1~4℃冷藏箱来存放水样，但不应超过 6 小时。实验室在收到这些水样后，即应放入冰箱中，如果由于当地条件的限制，水样运送到实验室所花的时间超过 6 小时，就应该考虑利用在采集点现场的实验设备，从事现场检验。

样品保存温度引用 EPA Method 1103.1 及 Method 1603。对样品在冷藏条件下保存时间与测定结果的关系进行实验。在同一时间采集一大桶地表水样品，混匀后分装于一系列样品瓶内，采集后的样品放置在冰箱中，4℃保存，每小时取一瓶样品，进行粪大肠菌群测定分析。结果见表 6、图 2。

表 6 样品冷藏条件保存实验

时间	0 小时	1 小时	2 小时	3 小时	4 小时	5 小时	6 小时	7 小时	8 小时
MPN 结果	1300	1700	1300	1700	1700	1700	1700	2200	2200
时间	9 小时	10 小时	11 小时	12 小时	13 小时	14 小时	15 小时	16 小时	17 小时
MPN 结果	2300	2300	2300	3300	3300	3300	3300	4600	4900
时间	18 小时	19 小时	20 小时	21 小时	22 小时	23 小时	24 小时	25 小时	26 小时
MPN 结果	4600	7000	7900	7900	11000	11000	13000	13000	13000

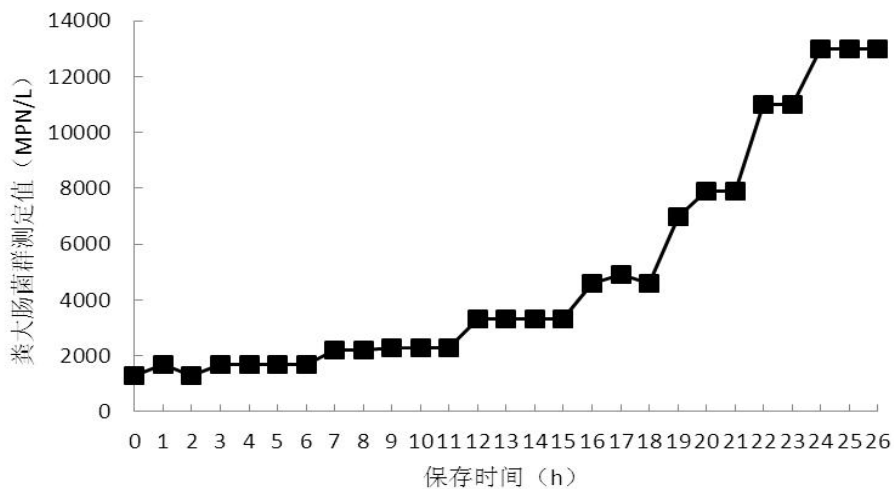


图 2 样品冷藏条件保存实验

由表 5 和图 2 中可以看出，在冷藏条件下 6 小时内水中粪大肠菌群无明显变化，6 小

时后粪大肠菌群数量开始逐渐上升，故样品采集后应尽快检测，否则，样品需在 1~4℃ 下保存，并在 6 h 内检测完毕。

5.6 分析步骤

5.6.1 材料的灭菌

移液管和采样瓶等玻璃器皿及采样器具试验前要按无菌操作要求包扎，121℃ 高压蒸汽灭菌 20 min 备用。

5.6.2 培养温度的选择

由于培养箱的温度会有偏差，对粪大肠菌群的培养结果会造成一定的影响，我们对培养箱进行校准后，分别在 43.5±0.5℃、44.5±0.5℃、45.5±0.5℃ 条件下，对一组 5 个不同来源的样品进行原样、10⁻¹、10⁻²、10⁻³ 浓度的接种，每个浓度接种 5 个试管，每根试管接种 1 ml，24 h 培养，比对其结果见表 7、图 3。

表 7 培养温度比对结果

培养温度		43.5±0.5℃	44.5±0.5℃	45.5±0.5℃
1	阳性数	5, 3, 0, 0	5, 4, 1, 0	4, 2, 0, 0
	MPN 结果	79	170	22
2	阳性数	5, 4, 0, 0	5, 5, 3, 0	4, 3, 0, 0
	MPN 结果	130	790	27
3	阳性数	5, 2, 0, 0	5, 3, 1, 0	4, 1, 0, 0
	MPN 结果	49	110	17
4	阳性数	5, 4, 1, 0	5, 5, 1, 0	5, 2, 1, 0
	MPN 结果	170	330	70
5	阳性数	5, 0, 0, 0	5, 1, 0, 0	3, 1, 0, 0
	MPN 结果	23	33	11

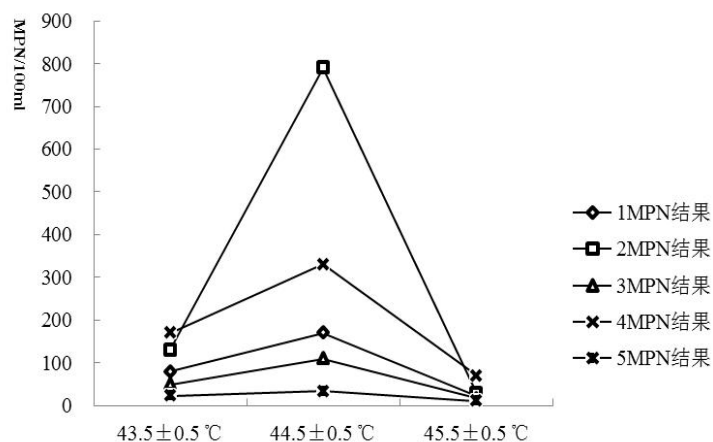


图 3 培养温度比对结果

对结果进行比对可以看出，温度差异对 MPN 结果的影响非常明显，因此，要严格控制

培养温度，在试验前一定要对培养箱进行温度校正，在要求的 $44.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 进行培养，使每次测得的结果间具有一定的可比性。

5.6.3 样品接种量

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 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 8。

表 8 样品接种量参考表

样品种类	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						▲	▲	▲

5.6.4 初发酵试验和复发酵试验

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 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 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。

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 $44.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 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。

5.6.5 实验室内方法研究

2015 年 4 月结合专家论证意见，进一步进行方法研究，分别选取地表水、地下水、工业废水、生活污水四个有代表性的点位进行了 15 管法实验室内方法研究，地表水采自辽宁省环保科学园内景观湖，地下水采自沈阳市郊某饭店饮用水井，工业废水采自沈阳雪花啤酒厂，生活污水采自沈阳市满堂污水处理厂未处理污水。在此基础上进行了数据的汇总和分析整理工作，情况如表 9~12：

表 9 地表水测试数据

平行号	地表水	备注
-----	-----	----

		结果	结果对数值	
测定结果 (MPN/L)	1	7.0×10^2	2.85	
	2	5.0×10^2	2.70	
	3	2.0×10^2	2.30	
	4	8.0×10^2	2.90	
	5	5.0×10^2	2.70	
	6	9.0×10^2	2.95	
平均值 \bar{x}^*		/	2.73	
标准偏差 S^*		/	0.24	
相对标准偏差 RSD (%) *		/	8.65	

注：带星号栏目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。

表 10 地下水测试数据

平行号	地下水		备注	
	结果	结果对数值		
测定结果 (MPN/L)	1	20	1.30	
	2	20	1.30	
	3	20	1.30	
	4	40	1.60	
	5	20	1.30	
	6	20	1.30	
平均值 \bar{x}^*		/	1.35	
标准偏差 S^*		/	1.23	
相对标准偏差 RSD (%) *		/	9.10	

注：带星号栏目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。

表 11 工业废水测试数据

平行号	工业废水		备注	
	结果	结果对数值		
测定结果 (MPN/L)	1	1.1×10^3	3.04	
	2	8.0×10^2	3.04	
	3	1.1×10^3	3.04	
	4	8.0×10^2	2.90	
	5	1.1×10^3	3.04	
	6	8.0×10^2	2.90	
平均值 \bar{x}^*		/	3.00	
标准偏差 S^*		/	0.07	
相对标准偏差 RSD (%) *		/	2.38	

注：带星号栏目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。

表 12 生活污水测试数据

平行号	生活污水		备注
	结果	结果对数值	
测定结果 (MPN/L)	1	7.0×10^3	3.85
	2	1.7×10^3	3.23
	3	2.4×10^3	3.38
	4	2.7×10^3	3.43
	5	4.5×10^3	3.65
	6	2.3×10^3	3.36
平均值 \bar{x}^*		/	3.48
标准偏差 S^*		/	0.22
相对标准偏差 RSD (%) *		/	6.44

注：带星号栏目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：对四种含不同浓度粪大肠菌群的样品进行了统一测定：标准偏差为：0.07~1.23；相对标准偏差为：2.38%~9.10%。

5.7 结果计算

5.7.1 结果表达

根据不同接种量的阳性发酵管数量，查表 13 或表 14，报告每升样品中的粪大肠菌群数。接种 12 份样品时，查表 13 可得 1 L 样品中的粪大肠菌群数；接种 15 份样品时，查表 14 得到 MPN 值，再经公式（1）换算成每升粪大肠菌群 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。

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

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

其中， \bar{x} 为样本均值， 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。

表 13 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 样品中粪大肠菌群数	1 L 样品中粪大肠菌群数	1 L 样品中粪大肠菌群数
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 1: 接种 2 份 100 ml 样品, 10 份 10 ml 样品, 总量 300 ml

表 14 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
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

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	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
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

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	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
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

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	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 2 份 100 ml 样品, 10 份 10 ml 样品, 总量 300 ml

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。

注 3: 表 12 和表 13 中多管发酵法 MPN 值的计算公式如下:

$$\sum_{i=1}^k \frac{m_i v_i}{e^{v_i \lambda} - 1} = \sum_{i=1}^k r_i v_i \quad (3)$$

式中: m_j ——发酵管试验中显阳性反应的管数; r_j ——发酵管试验中显阴性反应的管数; v_j ——发酵管中所加样品的体积; λ ——MPN 值。

5.7.2 方法检出限

查表 12 得 12 管法的检出限为 3 MPN/L; 查表 13 得 15 管法的检出限为 20 MPN/L。

检出限的决定因素为发酵管数和发酵管中所加样品的体积。

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和阴性菌株检验, 以确保其符合要求。

5.8.2 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。

5.8.3 空白试验

每次试验都要用无菌水进行实验室空白测定，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。

5.8.4 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接种于试管中，然后进行初发酵和复发酵，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。

6 方法验证

6.1 方法验证方案

6.1.1 验证单位基本情况

共选择 6 家实验室对地下水、地表水、生活污水三个具有代表性的不同浓度梯度的样品以及标准样品进行了实验室间验证，参与方法验证的单位、验证人员的基本情况如表 15：

表 15 参与方法验证的单位及验证人员的基本情况

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
辽阳市环境监测站	张旭	女	28	工程师	环境工程	6 年
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
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
丹东市环境监测中心站	曹亚乔	女	38	工程师	环境科学	12 年
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
辽宁北方环境检测技术有限公司	张琪	男	35	中级	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）的规定和标准的适用范围，选择标准样品和三种有代表性的不同浓度梯度的样品：地下水、湖水、生活污水进行验证，组织 6 家有资质的实验室进行本次的方法验证。实验样品由标准编制组统一进行采集，分配给各验证实验室，各验证实验室在统一的时间进行粪大肠菌群的测定，每个样品平行测定 6 次。最后对各验证实验室的数据进行汇总和分析整理，得出结论。验证工作主要内容是方法精密度和准确度的验证。

精密度的验证：标准编制组将有证标准样品以及 3 种不同浓度的实际样品分配到各验证实验室，各验证实验室在统一的时间（低温冷藏 6 h 内）进行粪大肠菌群多管发酵法的检测，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。

准确度的验证：标准编制组将有证标准样品分配到各验证实验室，各验证实验室进行粪大肠菌群多管发酵法的检测，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、试剂等应符合方法的要求。

(2) 方法验证过程中,地下水采自沈阳市郊某饭店饮用水井,地表水采自辽宁省环保科学园内景观湖,生活污水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6 h内检测完毕的要求,故丹东市环境监测中心站的验证人员在辽宁省环境监测实验中心实验室进行验证,大连市环境监测中心的验证人员在沈阳市环境监测中心站实验室进行验证,其他验证单位均在各自实验室进行方法验证。

(4) 标准样品精密度验证结论:

实验室内相对标准偏差为:5.11%~17.25%;

实验室间相对标准偏差为:5.41%;95%置信区间为:2413 MPN/L~5751 MPN/L;均值为:3725 MPN/L。

低、中、高三个浓度实际样品精密度验证结论:

实验室内相对标准偏差为:2.27%~3.78%,2.02%~11.05%,1.08%~5.44%;

实验室间相对标准偏差为:3.38%,10.63%,1.59%;

95%置信区间为:47 MPN/L~62 MPN/L;5.2×10⁴ MPN/L~3.1×10⁵ MPN/L;2.2×10⁷ MPN/L~3.6×10⁷ MPN/L。

均值为:54 MPN/L,2.7×10⁴ MPN/L,2.8×10⁷ MPN/L。

准确度验证结论(标准样品):相对误差为-6.18%~8.43%;相对误差最终值:-1.69%±10.64%。

(5) 《方法验证报告》见附一。

7 与开题报告的差异说明

开题报告中粪大肠菌群多管发酵法与滤膜法为一个方法,按专家论证意见将粪大肠菌群多管发酵法与滤膜法拆分为两个方法。本标准为多管发酵法。

8 参考文献

- [1] ISO 9308-2:1990 (E),Water quality -- Detection and enumeration of coliform organisms,thermotolerant coliform organisms and presumptive Escherichia coli -- Part 2: Multiple tube (most probable number) method.
- [2] Coliforms—Total, Fecal and E. Coli (method8001、8001A) .
- [3] STANDARD METHODS 9221 E. FECAL COLIFORM PROCEDURE (20th Edition) .
- [4] 地表水环境质量标准,GB3838-2002.

- [5] 生活饮用水卫生标准,GB5749-2006.
- [6] 海水水质标准,GB3097-1997.
- [7] 农田灌溉水质标准, GB5084-2005.
- [8] 医疗机构水污染物排放标准, GB18466-2005.
- [9] 生活垃圾填埋场污染控制标准, GB16889-2008.
- [10] 畜禽养殖业污染物排放标准, GB18596-2001.
- [11] 生物工程类制药工业水污染物排放标准, GB21907-2008.
- [12] 城镇污水处理厂污染物排放标准, GB18918-2002.
- [13] 污水综合排放标准, GB 8978-1996.
- [14] 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.
- [15] 生活饮用水标准检验方法 微生物指标, GB/T 5750.12-2006.
- [16] 水质 粪大肠菌群的测定——多管发酵法,SL 355-2006.
- [17] 粪大肠菌群多管发酵法, GB5750—85. 7.
- [18] 粪大肠菌群发酵法,HY.003.9-91.
- [19] 环境监测 分析方法标准制修订技术导则,HJ 168-2010.
- [20] 水和废水监测分析方法(第四版),中国环境科学出版社,2002年.
- [21] 冯青英,刘娟,杨大卫.粪大肠菌群多管发酵测定法的改进研究[J].中国环境监测,2009,25(6):43-45.
- [22] 高凡,蒋懿.应用滤膜法检测粪大肠菌群方法[J].水资源研究,2009,30(3):35-36.
- [23] 高瑞坤,汤琳,付强.水中粪大肠菌群快速检测方法—固定底物酶底物法与多管发酵法的比较.中国环境监测,2008,24(4) 39-41.
- [24] 周正杰.纸片法与乳糖发酵法检测大肠菌群的比较.中国临床医药研究杂志,2004(129):83-84.
- [25] 郑高峰.化学、物理等共存因素对粪大肠菌群测定的影响.海峡科学,2009,(6):152-153.
- [26] 张少峰,刘国强,魏春雷.粪大肠菌群检测方法及其研究进展.海洋通报,2008,27(3):102-106.
- [27] 张正兴,付勇,杜玉明.滤膜法测定水中粪大肠菌群.实用医药杂志,2005,22(8):733.

附一

方法验证报告

方法名称： 水质 粪大肠菌群的测定 多管发酵法

项目主编单位： 辽宁省环境监测实验中心

项目负责人及职称： 王朝霞 助理工程师

通讯地址：沈阳市东陵区双园路 30 甲-3 号 电话：62780480

报告编写人及职称： 王朝霞 助理工程师

报告日期： 2015 年 7 月 31 日

1 原始测试数据

1.1 验证单位基本情况

附表 1 参与方法验证的单位及验证人员的基本情况

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
辽阳市环境监测站	张旭	女	28	工程师	环境工程	6 年
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
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
丹东市环境监测中心站	曹亚乔	女	38	工程师	环境科学	12 年
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
辽宁北方环境检测技术有限公司	张琪	男	35	中级	化学	8 年

附表 2 使用仪器情况登记表

验证单位	仪器名称	规格型号	仪器编号	性能状况
大连市环境 监测中心	自动电热压力蒸汽灭菌器	BXM-30R	2013-B5465	±0.4℃
	立式压力蒸汽灭菌器	YXQ-LS-75S II	1175S-517	±0.4℃
	电热恒温培养箱	DHP9160	01090701	±0.2℃
	电热恒温培养箱	DHP9160	01090702	±0.3℃
丹东市环境 监测中心站	生物灭菌锅	SQ510	J0710010	±0.1℃
	电热培养箱	DHP-9082302A-43	1101130301	±0.1℃
	电热培养箱	DHP-9082302A-43	1301130806	±0.1℃
锦州市环境 监测中心站	立式压力蒸汽灭菌器	LDZX-30FB	08M596	±0.4℃
	生化培养箱	LRH-250A	A0312359	±0.2℃
辽阳市环境监测站	立式压力蒸汽灭菌器	YXQ-LS-50S II	2012-B4837	±0.5℃
	数显生化培养箱	250B	29-48	±0.5℃
	生化培养箱	BSP-150	140035	±0.5℃
沈阳市疾病预防 控制中心	立式压力蒸汽灭菌器	YXQ-LS-75S II	1275S-380	±0.1℃
	隔水式培养箱	BG-80	14018	±0.1℃
	隔水式培养箱	BG-80	14020	±0.1℃
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	±0.1℃
	生化培养箱	LRH-250A	THA10101039	±0.1℃
	生化培养箱	SPH-080	1209570	±0.1℃

附表 3 使用试剂及培养基登记表

验证单位	名称	生产厂家	级别状况
大连市环境监测中心	乳糖蛋白胨培养基	北京陆桥技术股份有限公司	BR 生物试剂
	EC 肉汤	北京陆桥技术股份有限公司	BR 生物试剂
丹东市环境监测中心站	乳糖蛋白胨培养基	北京奥博星生物技术有限公司	BR 生物试剂
	EC 肉汤	北京奥博星生物技术有限公司	BR 生物试剂
锦州市环境监测中心站	乳糖蛋白胨培养基	北京奥博星生物技术有限公司	BR 生物试剂
	EC 肉汤	北京奥博星生物技术有限公司	BR 生物试剂
辽阳市环境监测站	乳糖蛋白胨培养基	北京奥博星生物技术有限公司	BR 生物试剂
	EC 肉汤	北京奥博星生物技术有限公司	BR 生物试剂
沈阳市疾病预防控制中心	乳糖蛋白胨培养基	北京奥博星生物技术有限公司	BR 生物试剂
	EC 肉汤	北京奥博星生物技术有限公司	BR 生物试剂
辽宁北方环境检测技术有限公司	乳糖蛋白胨培养基	北京奥博星生物技术有限公司	BR 生物试剂
	EC 肉汤	北京奥博星生物技术有限公司	BR 生物试剂

1.2 方法精密度测试数据

附表 4 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 13-17 日

平行号		试 样			
		低浓度 (地下水)	中浓度 (地表水)	高浓度 (生活污水)	标准样品
测定结果 (MPN/L)	1	51	4.9×10^4	2.4×10^7	790
	2	51	3.3×10^4	3.5×10^7	2400
	3	51	1.3×10^5	2.4×10^7	5400
	4	51	4.9×10^4	3.5×10^7	1300
	5	43	7.9×10^4	2.4×10^7	3500
	6	43	2.2×10^4	2.4×10^7	2200
平均值 \bar{x}_i		1.68	4.71	7.43	3.34
标准偏差 S_i		0.04	0.27	0.08	0.30
相对标准偏差 RSD (%)		2.27	5.73	1.08	8.98
95%置信区间 (MPN/L)		44~53	$2.6 \times 10^4 \sim 9.9 \times 10^4$	$2.2 \times 10^7 \sim 3.3 \times 10^7$	$1.1 \times 10^3 \sim 4.4 \times 10^3$
注： \bar{x}_i 、 S_i 、RSD (%) 由原始数据以 10 为底，对数转化后计算所得。					

附表 5 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 13-17 日

平行号		试 样			
		低浓度 (地下水)	中浓度 (地表水)	高浓度 (生活污水)	标准样品
测定结果 (MPN/L)	1	60	7.9×10^4	3.5×10^7	5400
	2	51	7.9×10^4	9.2×10^7	2200
	3	60	3.3×10^4	3.5×10^7	2400
	4	69	2.3×10^4	2.4×10^7	5400
	5	69	1.3×10^5	3.5×10^7	3500
	6	69	1.3×10^5	3.5×10^7	2400
平均值 \bar{x}_i		1.80	4.82	7.59	3.52
标准偏差 S_i		0.05	0.31	0.20	0.18
相对标准偏差 RSD (%)		2.94	6.43	2.64	5.11
95%置信区间 (MPN/L)		55~71	$3.1 \times 10^4 \sim 1.4 \times 10^5$	$2.4 \times 10^7 \sim 6.2 \times 10^7$	$2.1 \times 10^3 \sim 5.1 \times 10^3$
注： \bar{x}_i 、 S_i 、RSD (%) 由原始数据以 10 为底，对数转化后计算所得。					

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 13-17 日

平行号		试 样			
		低浓度 (地下水)	中浓度 (地表水)	高浓度 (生活污水)	标准样品
测定结果 (MPN/L)	1	51	4.9×10^3	1.3×10^7	5400
	2	60	1.3×10^4	4.8×10^6	5400
	3	60	4.9×10^3	1.7×10^7	2400
	4	51	2.3×10^3	2.4×10^7	1400
	5	60	7.9×10^3	2.4×10^7	3500
	6	69	2.3×10^3	5.4×10^7	2400
平均值 \bar{x}_i		1.76	3.69	7.25	3.49
标准偏差 S_i		0.05	0.30	0.35	0.23

相对标准偏差 RSD (%)	2.84	8.13	4.83	6.59
95%置信区间 (MPN/L)	52~66	$2.4 \times 10^3 \sim 9.9 \times 10^3$	$7.7 \times 10^6 \sim 4.2 \times 10^7$	$1.8 \times 10^3 \sim 5.3 \times 10^3$
注: \bar{x}_i 、 S_i 、RSD (%) 由原始数据以 10 为底, 对数转化后计算所得。				

附表 7 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 13-17 日

平行号		试 样			
		低浓度 (地下水)	中浓度 (地表水)	高浓度 (生活污水)	标准样品
测定结果 (MPN/L)	1	51	4.6×10^3	1.1×10^7	5400
	2	51	2.2×10^3	4.7×10^6	3500
	3	43	3.5×10^4	3.5×10^7	5400
	4	43	1.7×10^4	5.4×10^7	5400
	5	51	4.9×10^3	3.5×10^7	170
	6	60	7.9×10^3	3.5×10^7	3500
平均值 \bar{x}_i		1.69	3.89	7.35	3.42
标准偏差 S_i		0.05	0.43	0.40	0.59
相对标准偏差 RSD (%)		3.23	11.05	5.44	17.25
95%置信区间 (MPN/L)		43~56	$2.8 \times 10^3 \sim 2.2 \times 10^4$	$8.4 \times 10^6 \sim 5.9 \times 10^7$	$6.3 \times 10^2 \sim 1.1 \times 10^4$
注: \bar{x}_i 、 S_i 、RSD (%) 由原始数据以 10 为底, 对数转化后计算所得。					

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 13-17 日

平行号		试 样			
		低浓度 (地下水)	中浓度 (地表水)	高浓度 (生活污水)	标准样品
测定结果 (MPN/L)	1	36	3.5×10^4	3.5×10^7	1300
	2	51	2.4×10^4	2.8×10^7	2400
	3	51	3.5×10^4	1.3×10^7	1100
	4	51	2.4×10^4	2.4×10^7	2400

	5	51	2.4×10^4	3.5×10^7	5400
	6	43	3.5×10^4	3.5×10^7	3500
平均值 \bar{x}_i		1.67	4.46	7.43	3.37
标准偏差 S_i		0.06	0.09	0.17	0.26
相对标准偏差 RSD (%)		3.78	2.02	2.29	7.71
95%置信区间 (MPN/L)		40~54	$2.3 \times 10^4 \sim 3.6 \times 10^4$	$1.8 \times 10^7 \sim 4.0 \times 10^7$	$1.2 \times 10^3 \sim 4.3 \times 10^3$
注: \bar{x}_i 、 S_i 、RSD (%) 由原始数据以 10 为底, 对数转化后计算所得。					

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 13-17 日

平行号	试 样				
	低浓度 (地下水)	中浓度 (地表水)	高浓度 (生活污水)	标准样品	
测定结果 (MPN/L)	1	69	2.2×10^4	1.3×10^7	9200
	2	69	2.4×10^4	3.5×10^7	5400
	3	51	5.4×10^4	1.7×10^7	5400
	4	60	5.4×10^4	3.5×10^7	16000
	5	60	5.4×10^4	1.7×10^7	3500
	6	60	5.4×10^4	1.8×10^7	9200
平均值 \bar{x}_i	1.79	4.61	7.32	3.86	
标准偏差 S_i	0.05	0.19	0.18	0.23	
相对标准偏差 RSD (%)	2.73	4.12	2.46	5.96	
95%置信区间 (MPN/L)	54~69	$2.6 \times 10^4 \sim 6.5 \times 10^4$	$1.3 \times 10^7 \sim 3.2 \times 10^7$	$4.1 \times 10^3 \sim 1.3 \times 10^4$	
注: \bar{x}_i 、 S_i 、RSD (%) 由原始数据以 10 为底, 对数转化后计算所得。					

1.3 方法准确度测试数据

附表 10 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 13-17 日

平行号		标准样品	
		浓度值	对数值
测定结果 (MPN/L)	1	790	2.90
	2	2400	3.38
	3	5400	3.73
	4	1300	3.11
	5	3500	3.54
	6	2200	3.34
平均值 \bar{x}_i		—	3.34
标准样品浓度 (MPN/L)		3670	3.56
相对误差 RE _i (%)		—	-6.18

附表 11 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 13-17 日

平行号		标准样品	
		浓度值	对数值
测定结果 (MPN/L)	1	5400	3.73
	2	2200	3.34
	3	2400	3.38
	4	5400	3.73
	5	3500	3.54
	6	2400	3.38
平均值 \bar{x}_i		—	3.52
标准样品浓度 (MPN/L)		3670	3.56
相对误差 RE _i (%)		—	-1.12

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 13-17 日

平行号		标准样品	
		浓度值	对数值
测定结果 (MPN/L)	1	5400	3.73
	2	5400	3.34
	3	2400	3.38
	4	1400	3.73
	5	3500	3.54
	6	2400	3.38
平均值 \bar{x}_i		—	3.49
标准样品浓度 (MPN/L)		3670	3.56
相对误差 RE _i (%)		—	-1.97

附表 13 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 13-17 日

平行号		标准样品	
		浓度值	对数值
测定结果 (MPN/L)	1	5400	3.73
	2	3500	3.54
	3	5400	3.73
	4	5400	3.73
	5	170	2.23
	6	3500	3.54
平均值 \bar{x}_i		—	3.42
标准样品浓度 (MPN/L)		3670	3.56
相对误差 RE _i (%)		—	-3.93

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 13-17 日

平行号		标准样品	
		浓度值	对数值
测定结果 (MPN/L)	1	1300	3.11
	2	2400	3.38
	3	1100	3.04
	4	2400	3.38
	5	5400	3.73
	6	3500	3.54
平均值 \bar{x}_i		—	3.37
标准样品浓度 (MPN/L)		3670	3.56
相对误差 RE _i (%)		—	-5.34

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 13-17 日

平行号		标准样品	
		浓度值	对数值
测定结果 (MPN/L)	1	9200	3.96
	2	5400	3.73
	3	5400	3.73
	4	16000	4.20
	5	3500	3.54
	6	9200	3.96
平均值 \bar{x}_i		—	3.86
标准样品浓度 (MPN/L)		3670	3.56
相对误差 RE _i (%)		—	8.43

2 方法验证数据汇总

2.1 方法精密度数据汇总

附表 16 精密度测试数据汇总表

实验室号	低浓度（地下水）			中浓度（地表水）			高浓度（生活污水）			标准样品		
	\bar{x}_i	S_i	RSD _i	\bar{x}_i	S_i	RSD _i	\bar{x}_i	S_i	RSD _i	\bar{x}_i	S_i	RSD _i
1	1.68	0.04	2.27	4.71	0.27	5.73	7.43	0.08	1.08	3.34	0.30	8.98
2	1.80	0.05	2.94	4.82	0.31	6.43	7.59	0.20	2.64	3.52	0.18	5.11
3	1.76	0.05	2.84	3.69	0.30	8.13	7.25	0.35	4.83	3.49	0.23	6.59
4	1.69	0.05	3.23	3.89	0.43	11.05	7.35	0.40	5.44	3.42	0.59	17.25
5	1.67	0.06	3.78	4.46	0.09	2.02	7.43	0.17	2.29	3.37	0.26	7.71
6	1.79	0.05	2.73	4.61	0.19	4.12	7.32	0.18	2.46	3.86	0.23	5.96
$\bar{\bar{X}}$	1.73			4.36			7.40			3.50		
S'	0.06			0.46			0.12			0.19		
RSD(%)	3.38			10.63			1.59			5.41		
95%置信区间 (MPN/L)	47~62			5.2×10 ⁴ ~3.1×10 ⁵			2.2×10 ⁷ ~3.6×10 ⁷			2413~5751		

注：表中数据是用原始数据以 10 为底，对数转化后计算所得。

结论：6 个实验室对三个不同浓度粪大肠菌群样品和含粪大肠菌群浓度为 3670MPN/L 的标准样品进行了统一测定：

实验室内相对标准偏差为：2.27%~3.78%，2.02%~11.05%，1.08%~5.44%；5.11%~17.25%；

实验室间相对标准偏差为：3.38%，10.63%，1.59%，5.41%；

95%置信区间分别为：47 MPN/L~62 MPN/L，5.2×10⁴ MPN/L~3.1×10⁵ MPN/L；2.2×10⁷ MPN/L~3.6×10⁷ MPN/L，2413 MPN/L~5751 MPN/L。

2.2 方法准确度数据汇总

附表 17 标准样品测试数据汇总表

实验室号	\bar{x}_i	RE _i
1	3.34	-6.18
2	3.52	-1.12
3	3.49	-1.97
4	3.42	-3.93
5	3.37	-5.34
6	3.86	8.43
\bar{RE}	-1.69	
S_{RE}	5.32	

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 个实验室对含粪大肠菌群浓度为 3670 MPN/L 的标准样品进行了统一测定：相对误差范围为-6.18%~8.43%；相对误差最终值为-1.69%±10.64%。