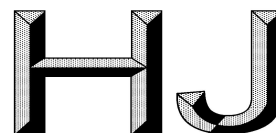


附件 4



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 滤膜法

Water quality-Determination of fecal coliform-

Membrane filtration

(征求意见稿)

201□-□□-□□发布

201□-□□-□□实施

环 境 保 护 部 发布

目 次

前 言.....	ii
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.....	2
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

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，规范水中细菌总数的测定方法，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滤膜法。

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）滤膜法部分的修订，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、科技标准司组织制订。

本标准主要起草单位：辽宁省环境监测实验中心。

本标准验证单位：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、铁岭市环境保护监测站、沈阳市疾病预防控制中心。

本标准环境保护部201□年□□月□□日批准。

本标准自201□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 滤膜法

1 适用范围

本标准规定了测定水中粪大肠菌群的滤膜法。

本标准适用于地表水、地下水和废水中粪大肠菌群的快速测定。本标准不适用于浑浊度较高的水体。

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革兰氏阴性无芽孢杆菌。

2.2

菌落形成单位 Colony-Forming Units, CFU

单位体积中的细菌群落总数。

3 方法原理

水样通过孔径为 0.45 μm 的滤膜过滤，细菌被截留在滤膜上，然后将滤膜置于含有乳糖的培养基上，在特定的温度（44.5℃）培养 24 h，在此培养温度，不利于来自自然环境的大肠菌群生长，而粪大肠菌群能生长并发酵乳糖产酸产气，在滤膜上呈蓝色或蓝绿色，其它非粪大肠菌落呈灰色、淡黄色或无色。通过颜色判断是否产酸产气，从而确定是否有粪大肠菌群存在，并通过呈蓝色或蓝绿色菌落计数，来测定水样中粪大肠菌群浓度。

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 MFC 培养基

成分：

胰胨	10 g
蛋白胨	5 g

酵母浸膏	3 g
氯化钠	5 g
乳糖	12.5g
胆盐三号	1.5 g
1%苯胺蓝水溶液	10 ml
1%玫瑰色酸溶液（溶于 8.0 g/L 氢氧化钠液中）	10 ml

制法：将上述培养基中的成分（除苯胺蓝和玫瑰色酸外），溶解于 1000 ml 蒸馏水或去离子水中，调节 pH 值到 7.4，分装于小烧瓶内，每瓶 100 ml，于 115℃ 高压蒸汽灭菌 20 min，储存于冷暗处备用。临用前，按上述配方比例，用灭菌吸管分别加入已煮沸灭菌的 1% 苯胺蓝溶液 1 ml 及 1% 玫瑰色酸溶液（溶于 8.0 g/L 氢氧化钠液中）1 ml，混合均匀。加热溶解前，加入 1.2%~1.5% 琼脂可制成固体培养基。如培养物中杂菌不多，则培养基中不加玫瑰色酸亦可。

MFC 培养基可选用市售成品培养基。

5.2 无菌滤膜：孔径 0.45 μm，按无菌操作要求包扎，经 121℃ 高压蒸汽灭菌 20 min，晾干备用；或将滤膜放入烧杯中，加入蒸馏水或去离子水，煮沸灭菌 3 次，15 min/次，前 2 次煮沸后需更换水洗涤 2~3 次。

5.3 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。

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

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

5.6 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。

5.7 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。

6 仪器和设备

6.1 采样瓶：1 L 或 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 ±0.5℃。

6.4 过滤装置：配有砂芯滤器和真空泵，抽滤压力勿超过 -50 kPa。

6.5 pH 计：准确到 0.1 pH 单位。

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℃ 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。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（5.6），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（5.7），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℃ 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℃ 冰箱并 2 h 内测定。

8 分析步骤

8.1 样品过滤

根据水样的种类判断水样过滤体积，最小过滤体积为 10 ml，如过滤体积小于 10 ml 时应逐级稀释。理想的水样过滤体积是滤膜上生长的粪大肠菌群菌落数为 20~60 个。当最小过滤体积为 10 ml 时，滤膜上菌落密度仍过大，则应对水样进行稀释。参考过滤体积见表 1。

表 1 水样过滤体积参考表

水样种类	过滤体积 (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						▲	▲	▲

用灭菌镊子以无菌操作夹取滤膜贴在已灭菌的过滤装置上，固定好过滤装置，将水样充分混匀后抽滤，以无菌水冲洗器壁 2~3 次。水样过滤完成后，再抽气约 5 s，关上开关。

8.2 培养

用灭菌镊子夹取滤膜移放在MFC培养基上，滤膜截留细菌面向上，滤膜应与培养基完全贴紧，两者间不得留有气泡，然后将培养皿倒置，放入恒温培养箱内， $44.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 培养 24 ± 2 h。

8.3 结果判读

MFC培养基上呈蓝色或蓝绿色的菌落为粪大肠菌群菌落，予以计数。

MFC培养基上呈灰色、淡黄色或无色的菌落非粪大肠菌群菌落，不予计数。

9 结果计算与表示

9.1 结果计算

计数滤膜上生长的粪大肠菌群菌落总数，按公式（1）计算1 L水样中的粪大肠菌群数：

$$C = \frac{C_1 \times 1000}{Q} \times f \quad (1)$$

式中：C——水样中粪大肠菌群浓度，CFU/L；

C_1 ——滤膜上生长的粪大肠菌群菌落总数，个；

1000——将过滤体积的单位由ml转换为L；

Q——水样过滤体积，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CFU/L。平均值以几何平均计算。若要报出“未检出”时，过滤体积至少应为100 ml。

10 精密度和准确度

10.1 精密度

6个实验室对低浓度(约 5.0×10^2 CFU/L)、中浓度(约 3.0×10^5 CFU/L)和高浓度(约 5.0×10^6 CFU/L)三个不同浓度粪大肠菌群的实际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5.3%~12%、0.81%~2.1%、0.51%~4.2%和7.7%~9.8%; 实验室间相对标准偏差分别为6.8%, 3.9%, 4.0%和3.62%; 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 (CFU/L)		中浓度 (CFU/L)		高浓度 (CFU/L)		标准样品 (CFU/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
2.0×10^2	$1.4 \times 10^2 \sim 2.9 \times 10^2$	1.6×10^5	$9.8 \times 10^4 \sim 2.6 \times 10^5$	1.6×10^7	$8.2 \times 10^6 \sim 3.0 \times 10^7$	6.1×10^2	$3.8 \times 10^2 \sim 9.9 \times 10^2$

10.2 准确度

6个实验室对含粪大肠菌群浓度为3670 MPN/L (370~7710 MPN/L) 的标准样品进行了测定, 相对误差范围为-19%~-32%; 相对误差最终值为: $-23\% \pm 10\%$ 。

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, 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。

11.3 空白试验

每次试验都要用无菌水做实验室空白测定, 培养后的滤膜上不得有任何菌落生长。否则, 该次样品测定结果无效, 应查明原因后重新测定。

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*)。将标准菌株配成适宜浓度, 按“8.1 样品过滤”要求使滤膜上生长的菌落数为 20~60 个, 然后按“8.2 培养”要求培养, 阳性菌株应生长为蓝色或蓝绿色菌落, 阴性菌株应生长为灰色、淡黄色、无色或无菌落生长。否则, 该次样品测定结果无效, 应查明原因后重新测定。

12 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。