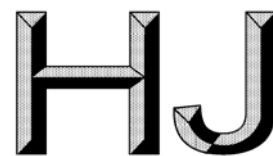


附件 6



中华人民共和国国家环境保护标准

HJ□□□-201□

水质（粪）大肠菌群的测定 纸片快速法

Water quality- Determination of coliform bacteria - Paper strip method

（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 规范性引用文件.....	1
3 术语与定义.....	1
4 方法原理.....	1
5 试剂和材料.....	1
6 仪器和设备.....	2
7 样品.....	2
8 分析步骤.....	2
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.....	4
12 废物处理.....	5
附录 A（规范性附录）（粪）大肠菌群测定纸片质量鉴定	6
附录 B（资料性附录）结果判定参考图片	7
附录 C（资料性附录）最可能数（MPN）表.....	8

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。

本标准规定了地表水和废水中（粪）大肠菌群测定的纸片快速法。

本标准首次发布。

本标准附录 A 为规范性附录，附录 B 和附录 C 为资料性附录。

本标准由环境保护部科技标准司组织制订。

本标准主要起草单位：常州市环境监测中心和环境保护部环境标准研究所。

本标准验证单位：上海市环境监测中心、江苏省环境监测中心、浙江省环境监测中心、苏州市环境监测中心站、南京市环境监测中心站和泰州市环境监测中心站。

本标准环保部 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 纸片快速法

1 适用范围

本标准规定了总大肠菌群、粪大肠菌群的快速测定方法。

本标准适用于地表水、生活污水、医疗机构及禽畜养殖业等其他行业排放的废水中（粪）大肠菌群的快速筛查。

本方法的检出限为 20 MPN/L。

2 规范性引用文件

本标准内容引用了下列文件或其中的条款。凡是不注明日期的引用文件，其有效版本适用于本标准。
HJ/T91 地表水和污水监测技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1 总大肠菌群 (total coliforms)

在 37℃ 培养，24h 内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。

3.2 粪大肠菌群 (fecal coliforms)

44.5℃ 培养，24h 内能发酵乳糖产酸产气的总大肠菌群，属粪性来源，称为粪大肠菌群。

4 方法原理

将一定量的乳糖、指示剂（溴甲酚紫和 2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑即 TTC）以及营养成分等吸附于一定面积的无菌滤纸上，当细菌生长繁殖时，产酸使 pH 值降低，溴甲酚紫指示剂由紫色变黄色，同时，产气过程相应的脱氢酶在适宜的 pH 范围内，催化底物脱氢还原 TTC 形成红色的不溶性三苯甲腓（TTF），即可在产酸后的黄色背景下显示出红色斑点（或红晕）。通过上述指示剂的颜色变化就可对是否产酸产气作出判断，从而确定是否有（粪）大肠菌群存在，再通过查 MPN 表就可得出相应（粪）大肠菌群的浓度值。

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 市售水质总大肠菌群、粪大肠菌群测试纸片：10ml 水样量纸片、1ml 水样量纸片
按附录 A 的方法进行质量鉴定，达到要求后方可使用。
- 5.2 无菌水
用新制备的去离子水或蒸馏水，按无菌操作要求，121℃ 高压蒸汽灭菌 20min，备用。
- 5.3 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，溶于适量蒸馏水（或去离子水）中，稀释至 100ml，现配。
- 5.4 乙二胺四乙酸二钠（EDTA- Na_2 ）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 EDTA- Na_2 15g，溶于适量蒸馏水（或去离子水）中，稀释至 100ml，此溶液保质期为 30d。

6 仪器和设备

- 6.1 恒温培养箱： $37^\circ\text{C}\pm 1^\circ\text{C}$ 。
- 6.2 恒温培养箱： $44.5^\circ\text{C}\pm 0.5^\circ\text{C}$ 。
- 6.3 高压蒸汽灭菌器： 121°C 、101.3kpa。
- 6.4 冰箱： $0\text{--}4^\circ\text{C}$ 。
- 6.5 移液管： $1\pm 0.01\text{ml}$ 、 $10\pm 0.1\text{ml}$ 。
- 6.6 试管： $\phi 15\text{mm}\times 150\text{mm}$ 。
- 6.7 采样瓶：500ml。

注 1：移液管、试管、采样瓶等玻璃器皿试验前应按无菌操作要求包扎，121℃ 高压蒸汽灭菌 20min，烘干，备用。

7 样品

用灭菌器具，按照 HJ/T 91 的规定及无菌操作的要求，采集水样 400ml 放入已灭菌的采样瓶中。如果是经加氯处理的废水，需在采样瓶灭菌前加入硫代硫酸钠溶液（5.3）0.4ml；如果是重金属离子含量较高的废水，则在采样瓶灭菌前加入乙二胺四乙酸二钠（EDTA- Na_2 ）溶液（5.4）1.2ml，以消除干扰。酸性样品，需调节样品的 pH 值至 7.0-8.0。

采样后 2h 内检测，否则，需 10°C 以下冷藏并 6h 内送检，实验室接样后，应将样品放入 $0\text{--}4^\circ\text{C}$ 冰箱并 2h 内测定。

注 2：10mg 硫代硫酸钠可保证去除水样中 1.5mg 余氯，硫代硫酸钠用量可根据水样实际余氯量调整。

8 分析步骤

8.1 接种量

每个样品按三个不同的接种量接种，每个接种量分别接种 5 张纸片，共接种 15 张纸片。

根据水样的污染程度确定接种量，应尽可能使 5 个接种量最大的纸片为阳性、5 个接种量最小的纸片为阴性。

清洁水样的参考接种量分别为 10ml、1ml、0.1ml，受污染水样参考接种量根据污染程度可接种 1ml、

0.1ml、0.01ml 或 0.1ml、0.01ml、0.001ml 等，见下表 1。

表 1 水样接种量参考表

水样类型	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）		▲	▲	▲				
禽畜养殖业等排放废水						▲	▲	▲

接种量小于 1ml 时，水样应制成稀释样品后使用。接种量为 0.1ml、0.01ml 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 1ml 水样，注入盛有 9ml 无菌水的试管中，混匀，制成 1:10 稀释样品。其他稀释度的稀释样品同法制作。

8.2 接种、培养

水样充分混匀，按无菌操作制作稀释水样及接种水样。

清洁水样，接种水样总量为 55.5ml，10ml 水样量纸片 5 张，每张接种水样 10ml，1ml 水样量纸片 10 张，其中 5 张各接种水样 1ml，另 5 张各接种 1:10 的稀释水样 1ml。受污染水样，接种 3 个不同稀释度的 1ml 稀释水样各 5 张。

接种水样应均匀涂布于纸片上，纸片充分浸润、吸收水样，用手轻轻压平，做好标记。

测总大肠菌群时，在 37±1℃ 的条件下培养 18-24h 后观察结果；测粪大肠菌群时，在 44.5±0.5℃ 的条件下培养 18-24h 后观察结果。

注 3：1、检测粪大肠菌群时，纸片接种后应立即放置于 44.5±0.5℃ 的恒温培养箱中培养，在常温下放置过久将影响检测结果的准确性。

2、纸片加入水样后，短时间内变黄或褪色，表明水样存在酸性物质或氧化剂干扰，需按“7 样品”一节方法去除相应干扰。

8.3 结果判读

- (1) 纸片上出现红斑或红晕且周围变黄，为阳性。
- (2) 纸片全片变黄，无红斑或红晕，为阳性。
- (3) 纸片部分变黄，无红斑或红晕，为阴性。
- (4) 纸片的紫色背景上出现红斑或红晕，而周围不变黄，为阴性。
- (5) 纸片无变化，为阴性。

结果判读参照图片见附录 B。

9 结果计算与表示

9.1 结果计算

根据不同接种量的阳性纸片数量，查 MPN 表（附录 C），经下面的公式换算报告 1L 水中（粪）大肠菌群数：

$$10 \times \text{MPN 指数} \times \frac{10 \text{ (ml)}}{\text{最大接种量 (ml)}}$$

9.2 结果表示

测定结果保留二位有效数字，大于 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

微生物检测数据为偏态分布，按其统计分析要求，其检测所得 MPN 值全部经对数（以 10 为底）转换后进行以下分析。

10.1 精密度

6 家实验室分别对有证标准样品（15600 MPN/L）、低浓度（ 4.0×10^2 MPN/L）、中浓度（ 1.0×10^4 MPN/L）、高浓度（ 8.0×10^4 MPN/L）实际样品的总大肠菌群进行了测定，实验室内的相对标准偏差范围分别为：4.5%~7.5%、3.5%~12.4%、4.5%~6.9%、2.8%~5.8%；实验室间的相对标准偏差分别为 3.3%、12.6%、4.6%、1.6%；重复性限为 0.61、0.67、0.67、0.64；再现性限为 1.09、0.81、0.66、0.69。

6 家实验室分别对有证标准样品（12100 MPN/L）、低浓度（ 1.0×10^2 MPN/L）、中浓度（ 4.0×10^3 MPN/L）、高浓度（ 5.0×10^4 MPN/L）实际样品的粪大肠菌群进行了测定，实验室内的相对标准偏差范围分别为：4.5%~11.3%、11.4%~31.3%、2.8%~21.5%、3.9%~13.2%；实验室间的相对标准偏差分别为 5.2%、14.8%、11.9%、8.2%。重复性限为 0.93、0.83、0.85、0.77；再现性限为 1.28、1.44、1.35、0.89。

10.2 准确度

6 家实验室对总大肠菌群有证标准样品（15600 MPN/L）进行测定，实验室内相对误差的范围是-5.5%~-12.8%，相对误差的最终值为-8.8%±6.0%。

6 家实验室对粪大肠菌群有证标准样品（12100 MPN/L）进行测定，实验室内相对误差的范围是-3.8%~-16.0%，相对误差的最终值为-10.3%±9.2%。

11 质量保证和质量控制

11.1 应使用质量鉴定合格的纸片。

11.2 每批样品应用无菌水做全程序空白测定，培养后的纸片上不得有任何微生物生长，否则，该次样品测定结果无效，应查明原因后重新测定。

11.3 每批样品应使用有证标准菌株进行阳性、阴性对照试验。总大肠菌群测定的阳性菌株为大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*)，阴性菌株为金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)；粪大肠菌群测定的阳性菌株为大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*)，阴性菌株为产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*)。

上述标准菌株均制成浓度为 300~3000 个/ml 的菌悬液，分别取相应水量的菌悬液接种纸片，按“8.2 接种、培养”一节的要求培养，大肠埃希氏菌应呈现阳性反应；金黄色葡萄球菌、产气肠杆菌应呈现阴性反应，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用 121℃ 高压蒸汽灭菌 20min 后，器皿方可清洗，废弃物作为普通垃圾处置。

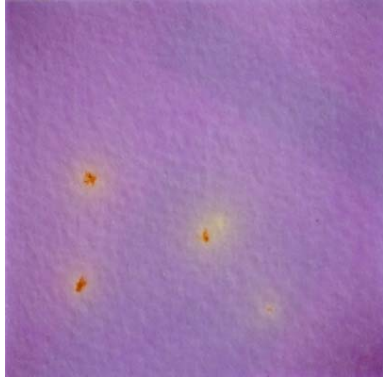
附录 A

（规范性附录）

（粪）大肠菌群测定纸片质量鉴定

- A.1 外层铝箔包装袋应密封完好，内包装聚丙烯塑膜袋无破损。
- A.2 纸片外观应整洁无毛边，无损坏，呈均匀淡青色，加去离子水或蒸馏水后呈紫色，无论加水与否，应无杂色斑点，无明显变形，表面平整。
- A.3 纸片加入相应水样，充分浸润、吸收后，将内包装聚丙烯塑膜袋倒置，袋口应无水滴悬挂。
- A.4 纸片以去离子水或蒸馏水充分润湿后，其 pH 值应在 7.0~7.4 范围内。
- A.5 纸片和内包装聚丙烯塑膜袋应无菌，加入相应水量的无菌水， $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 24h 后，纸片应无微生物生长，其紫色保持不变，且无红斑出现。
- A.6 按 11.3 中的方法进行总大肠菌群和粪大肠菌群阴性、阳性标准菌株检验，其特性应符合要求。

附录 B
(资料性附录)
结果判定参考图片



阳 性



阴 性



阳 性



阴 性



阴 性

附录 C

(资料性附录)

最可能数 (MPN) 表

(水样接种量为 5 份 10ml, 5 份 1ml, 5 份 0.1ml)

各接种量阳性份数			MPN/100ml	各接种量阳性份数			MPN/100ml	各接种量阳性份数			MPN/100ml
10ml	1ml	0.1ml		10ml	1ml	0.1ml		10ml	1ml	0.1ml	
0	0	0	<2	2	0	0	5	4	0	0	13
0	0	1	2	2	0	1	7	4	0	1	17
0	0	2	4	2	0	2	9	4	0	2	21
0	0	3	5	2	0	3	12	4	0	3	25
0	0	4	7	2	0	4	14	4	0	4	30
0	0	5	9	2	0	5	16	4	0	5	36
0	1	0	2	2	1	0	7	4	1	0	17
0	1	1	4	2	1	1	9	4	1	1	21
0	1	2	6	2	1	2	12	4	1	2	26
0	1	3	7	2	1	3	14	4	1	3	31
0	1	4	9	2	1	4	17	4	1	4	36
0	1	5	11	2	1	5	19	4	1	5	42
0	2	0	4	2	2	0	9	4	2	0	22
0	2	1	6	2	2	1	12	4	2	1	26
0	2	2	7	2	2	2	14	4	2	2	32
0	2	3	9	2	2	3	17	4	2	3	38
0	2	4	11	2	2	4	19	4	2	4	44
0	2	5	13	2	2	5	22	4	2	5	50
0	3	0	6	2	3	0	12	4	3	0	27
0	3	1	7	2	3	1	14	4	3	1	33
0	3	2	9	2	3	2	17	4	3	2	39
0	3	3	11	2	3	3	20	4	3	3	45
0	3	4	13	2	3	4	22	4	3	4	52
0	3	5	15	2	3	5	25	4	3	5	59
0	4	0	8	2	4	0	15	4	4	0	34
0	4	1	9	2	4	1	17	4	4	1	40
0	4	2	11	2	4	2	20	4	4	2	47
0	4	3	13	2	4	3	23	4	4	3	54
0	4	4	15	2	4	4	25	4	4	4	62
0	4	5	17	2	4	5	28	4	4	5	69

各接种量阳性份数			MPN/100ml	各接种量阳性份数			MPN/100ml	各接种量阳性份数			MPN/100ml
10ml	1ml	0.1ml		10ml	1ml	0.1ml		10ml	1ml	0.1ml	
0	5	0	9	2	5	0	17	4	5	0	41
0	5	1	11	2	5	1	20	4	5	1	48
0	5	2	13	2	5	2	23	4	5	2	56
0	5	3	15	2	5	3	26	4	5	3	64
0	5	4	17	2	5	4	29	4	5	4	72
0	5	5	19	2	5	5	32	4	5	5	81
1	0	0	2	3	0	0	8	5	0	0	23
1	0	1	4	3	0	1	11	5	0	1	31
1	0	2	6	3	0	2	13	5	0	2	43
1	0	3	8	3	0	3	16	5	0	3	58
1	0	4	10	3	0	4	20	5	0	4	76
1	0	5	12	3	0	5	23	5	0	5	95
1	1	0	4	3	1	0	11	5	1	0	33
1	1	1	6	3	1	1	14	5	1	1	46
1	1	2	8	3	1	2	17	5	1	2	63
1	1	3	10	3	1	3	20	5	1	3	84
1	1	4	12	3	1	4	23	5	1	4	110
1	1	5	14	3	1	5	27	5	1	5	130
1	2	0	6	3	2	0	14	5	2	0	49
1	2	1	8	3	2	1	17	5	2	1	70
1	2	2	10	3	2	2	20	5	2	2	94
1	2	3	12	3	2	3	24	5	2	3	120
1	2	4	15	3	2	4	27	5	2	4	150
1	2	5	17	3	2	5	31	5	2	5	180
1	3	0	8	3	3	0	17	5	3	0	79
1	3	1	10	3	3	1	21	5	3	1	110
1	3	2	12	3	3	2	24	5	3	2	140
1	3	3	15	3	3	3	28	5	3	3	180
1	3	4	17	3	3	4	32	5	3	4	210
1	3	5	19	3	3	5	36	5	3	5	250
1	4	0	11	3	4	0	21	5	4	0	130
1	4	1	13	3	4	1	24	5	4	1	170
1	4	2	15	3	4	2	28	5	4	2	220
1	4	3	17	3	4	3	32	5	4	3	280

各接种量阳性份数			MPN/100ml	各接种量阳性份数			MPN/100ml	各接种量阳性份数			MPN/100ml
10ml	1ml	0.1ml		10ml	1ml	0.1ml		10ml	1ml	0.1ml	
1	4	4	19	3	4	4	36	5	4	4	350
1	4	5	22	3	4	5	40	5	4	5	430
1	5	0	13	3	5	0	25	5	5	0	240
1	5	1	15	3	5	1	29	5	5	1	350
1	5	2	17	3	5	2	32	5	5	2	540
1	5	3	19	3	5	3	37	5	5	3	920
1	5	4	22	3	5	4	41	5	5	4	1600
1	5	5	24	3	5	5	45	5	5	5	≥2400