

附件 5

《水质 粪大肠菌群的测定 滤膜法  
(征求意见稿)》  
编制说明

《水质 粪大肠菌群的测定 滤膜法》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 滤膜法

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：丁振军、吕晓洁、仇伟光、姜永伟、卢雁、张爽、  
李杨、问青春、王朝霞、王秋丽、朱广钦、付毓

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.....	2
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问题.....	4
3	国内外相关分析方法研究.....	5
3.1	主要国家、地区及国际组织相关分析方法研究.....	5
3.2	国内相关分析方法研究.....	6
3.3	与本方法标准的关系.....	7
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.....	8
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.....	16
5.8	质量保证与质量控制.....	17
6	方法验证.....	17
6.1	方法验证方案.....	18
6.2	方法验证过程.....	18
7	与开题报告的差异说明.....	19
8	参考文献.....	20
	附一 方法验证报告.....	21

# 《水质 粪大肠菌群的测定 滤膜法》 编制说明

## 1 项目背景

### 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 粪大肠菌群的测定 多管发酵法与滤膜法》标准制修订任务，项目编号 986。

### 3.1 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，迅速开展相关的调研工作，收集国内外关于水中粪大肠菌群测定的分析方法，包括 EPA、ISO 及《水和废水标准检验方法》（第 22 版）等标准中关于粪大肠菌群的检定方法，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，认为该标准主编单位提供的材料齐全、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：

a 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；

b 多管发酵法和滤膜法分成两个标准；

c 增加原始数据及报告的具体内容及要求；

d 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、生活污水和工

业废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《水质 粪大肠菌群的测定 滤膜法》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，并编写验证报告。

(3) 2015年9月，在方法研究和方法验证的基础上进行了数据的分析整理工作，同时完成《水质 粪大肠菌群的测定 滤膜法》标准征求意见稿及编制说明。

#### 1.2.5 召开专家研讨会

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”；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

2015年12月-2016年3月，结合专家论证意见，并进一步修改完善《水质 粪大肠菌群的测定 滤膜法》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：

一、标准主编单位提供的材料齐全、内容完整、格式规范；

二、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，增加稀释度的选择参考；“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；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。

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，形成标准方法文本和编制说明征求意见稿

2017年2月-3月，结合审查委员会审查意见，增加了实验室内95%置信区间的内容，并对文本和编制说明的文本部分进行进一步修改后送标准所和标准处。2017年4月，收到标准

所和标准处修改建议，修改后形成征求意见稿。

## 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，而是卫生学用语，它们指的不是某一种或某一属细菌，而是一类细菌，是指在 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，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，若检出则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和肠胃感染等。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。具体情况见表 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	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 卫生标准	—	不得检 出	—

序号	标准号	标准名称	分类	标准值	单位
3	CJ/T 206-2005	城市供水水质标准	—	不得检出	个/100 ml
4	GB 3097-1997	海水水质标准	—	≤2000	个/L
			供人生食的贝类养殖水质	≤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	
			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排放限值（日均值）	100	MPN/L
			综合医疗机构和其他医疗机构水污染物排放均值（日均值）	500	
7	GB 18596-2001	畜禽养殖业水污染物排放标准	集约化畜禽养殖业水污染物最高允许日均排放	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 <sup>3</sup>	个/L
			一级 B 标准	10 <sup>4</sup>	
			二级标准	10 <sup>4</sup>	
			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污水一级标准	500	个/L
			医院、兽医院及医疗机构含病原体污水二级标准	1000	
			医院、兽医院及医疗机构含病原体污水三级标准	5000	

### 2.3 现行环境监测分析方法标准的实施情况和存在问题

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）中的滤膜法是常用的方法，国内广泛使用且沿用多年，但该标准是试行标准，未进行验证实验，无法满足 HJ 168-2010 要求，且该标准不够细化，迫切需要对现有标准中样品采集、样品保存和储藏、实验室质量控制、废物处置、实验步骤细化等方面进行增修，以满足现有环境保护工作的需求。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,在对各省、自治区、直辖市环境监测中心(站)进行了意见征集后,对提出的意见予以了采纳,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。

### 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

目前国外粪大肠菌群滤膜法标准主要以美国环保署(EPA)、国际标准化组织(ISO)和美国公共卫生协会(APHA)为主,各方法在适用范围、方法原理和结果判断等方面各有不同,其中ISO和EPA所用滤膜法为利用粪大肠菌群代谢产生的酶与培养基中的底物反应显色的原理,而APHA的《Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater》9222D (22<sup>ND</sup> EDITION)与国内现行滤膜法标准一致,在44.5℃下分解乳糖产酸变色从而鉴定阳性菌株。欧洲标准(EN)、英国标准协会(BSI)和德国标准化学会(DIN)直接引用ISO标准,因直接引用ISO标准,内容一致,故汇总表中未列出相关内容。国外粪大肠菌群滤膜法汇总表见表2。

表2 国外粪大肠菌群滤膜法汇总表

	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	Method 1103.1: Escherichia coli (E. coli) in Water by Membrane Filtration Using membrane-Thermot olerant Escherichia coli Agar (mTEC)	Method 1603: Escherichia coli (E. coli) in Water by Membrane Filtration Using Modified membrane-Thermotoler ant Escherichia coli Agar(Modified mTEC)	Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater 9222D (22 <sup>ND</sup> 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	淡水、河流入海口 和海水	淡水、河流入海口和海 水	水和废水
样品保存温度	5±3℃	1~4℃	1~4℃	——
样品保	特殊情况下最长24 h,但应在结果报告 中写明	最长6h	最长6h	——

存时间				
过滤体积	最小 10 ml, 使结果在 20-80 之间	使结果在 20-80 之间	使结果在 20-80 之间	使结果在 20-60 之间
培养基	大肠菌群显色培养基 (CCA)	mTEC	Modified mTEC	MFC
培养温度	36±2℃	35±0.5℃, 44.5±0.2℃	35±0.5℃, 44.5±0.2℃	44.5±0.2℃
培养时间	21±3h	2 h, 22~24 h	2 h, 22~24 h	24 h±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	大肠杆菌为黄色、黄绿色和黄棕色, 其他为粉色或紫色	红色或洋红色为大肠杆菌阳性菌株	各种深浅的蓝色

### 3.2 国内相关分析方法研究

国内粪大肠菌群滤膜法所采用的都是利用微孔滤膜过滤一定量水样, 将水样中含有的细菌截留在滤膜上, 然后将滤膜贴在 MFC 培养基上 44.5℃ 下培养 24 h 产生蓝色或蓝绿色菌落来判断阳性菌株。拟修订标准 (HJ/T 347-2007) 与国内相关标准比较, 在适用范围培养基、培养温度、培养时间和结果判读上基本一致, 但在保存时间和保存温度条件上都未做出规定。国内粪大肠菌群滤膜法汇总表见表 3。

表 3 国内粪大肠菌群滤膜法汇总表

	国家标准	行业标准	水和废水监测分析方法第四版(增补版)
标准名称	GB/T 5750.12-2006	HJ/T 347-2007	水中粪大肠菌群的

	《生活饮用水标准 检验方法 微生物指 标》	《水质 粪大肠菌群的测 定 多管发酵法和滤膜法 (试行)》	测定滤膜法
代替标准	GB/T 5750-1985	——	——
适用范围	生活饮用水及低浊 度水源水	一般地表水、地下水及废 水	地表水、地下水及废 水
样品保存温度	——	——	——
样品保存时间	——	——	——
过滤体积	——	——	使结果在 20-60 之 间
培养基	MFC、EC 培养基	MFC 培养基	MFC 培养基
培养温度	44.5℃	44.5±0.5℃	44.5±0.5℃
培养时间	24±2 h	24±2 h	24±2 h
结果判读	蓝色菌落为耐热大 肠菌群阳性菌株	蓝色或蓝绿色为粪大肠 阳性菌株	蓝色或蓝绿色为粪 大肠阳性菌株

### 3.3 与本方法标准的关系

本方法标准与美国 APHA 《水和废水标准检测方法》(第 22 版) 9222D、《生活饮用水标准检验方法 微生物指标》(GB/T 5750.12-2006)、《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,均使用孔径 0.45 μm 滤膜阻留粪大肠菌群菌体,然后在 MFC 培养基上 44.5℃ 培养出阳性菌落,进而计数。

本标准与 HJ/T 347-2007 相比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、最小过滤体积、质量控制与质量保证和废物处理等相关内容。

## 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 方法检出限问题

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 3 CFU/ml,2017 年 1 月 12 日在北京召开的技术审查会上,专家提出微生物检测方法与其他方法相比结果偏差大,设置检出限参考意义不大,并且微生物的检测方法不同于理化指标,目前国内外尚无微生物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、地表水等标准中均无粪大肠菌群滤膜法的方法检出限。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

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,以国内外方法标准及文献为基础而编制。

- (1) 方法的测定范围满足相关环保标准和环保工作的要求;
- (2) 方法准确可靠,满足各项方法特性指标的要求;
- (3) 方法具有普遍适用性,易于推广使用。

#### 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。滤膜法有检测时间短、减少洗涤工作量等优点,而成本在目前快速测定方法当中最低,因此在环境监测领域有广泛的应用前景。本标准制定的技术路线见图1。

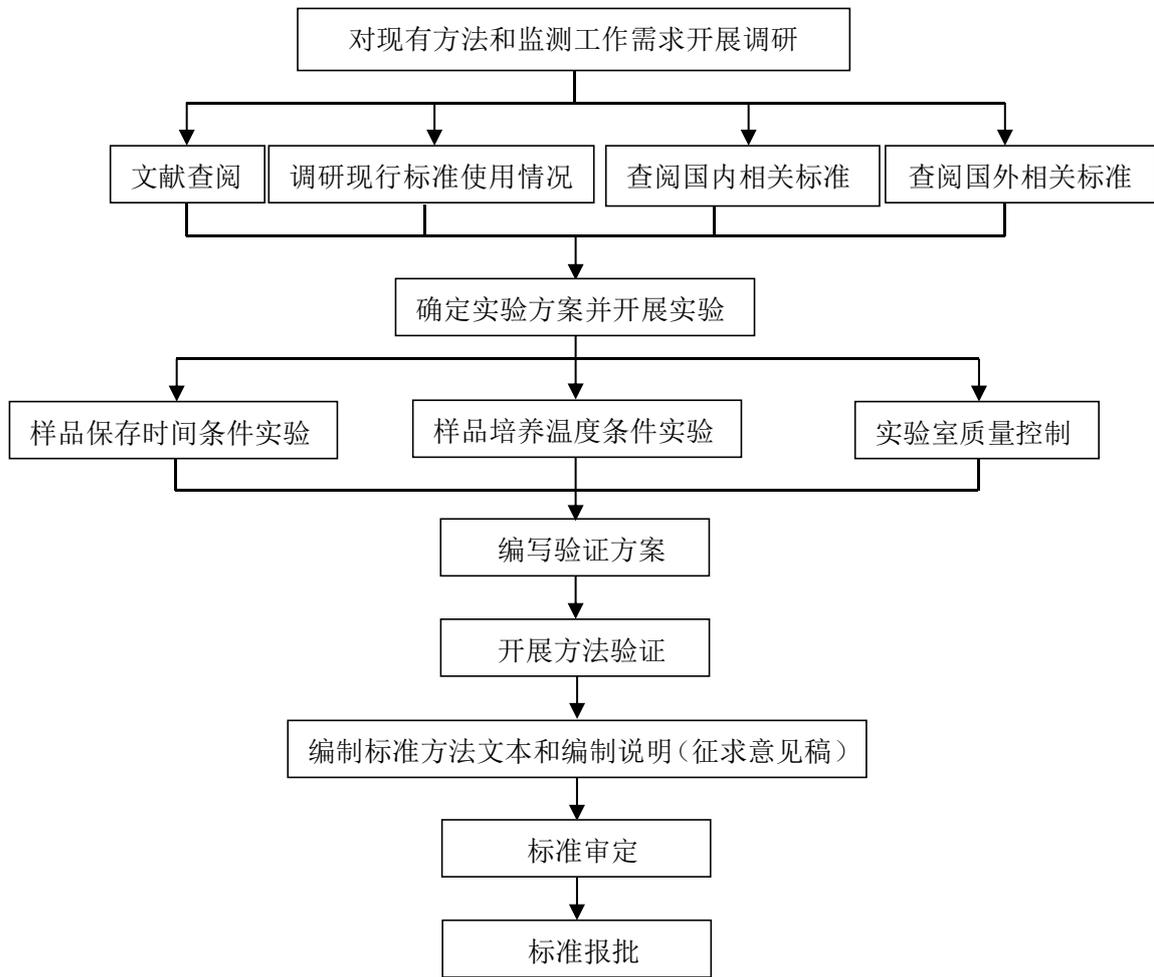


图1 标准制修订的技术路线

#### 5 方法研究报告

本方法是对《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)中滤膜法的修订,与原方法相比增删条款及增删原因见表4。

表 4 本标准与原标准内容区别

章节号	增删或修订内容	增删或修订原因
2	增加了规范性引用文件	HJ 168-2010 要求
3	增加了术语和定义	HJ 168-2010 要求
5	增加了干扰和消除	增加可操作性
6	增加了实验用水、无菌滤膜、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
8	增加了样品采集和保存的相关要求	增加可操作性
9	增加了最小过滤体积相关内容	增加可操作性
10	计算公式中增加了稀释度	增加可操作性
11	增加了精密度和准确度相关内容	HJ 168-2010 要求
12	增加了质量控制与质量保证相关内容	增加数据准确性
13	增加了废物处理相关内容	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。本标准旨在建立一个针对一般性水质的通用性的粪大肠菌群测定的标准方法。

### 5.2 方法原理

滤膜法是采用滤膜过滤器过滤水样，使水样通过孔径为 0.45 μm 的滤膜过滤，细菌被阻留在膜上，将滤膜贴在 MFC 培养基上，44.5℃培养 24 h 后，计数典型菌落，计算出 1L 水中含有粪大肠菌群数。

### 5.3 试剂和材料

本标准所用试剂除另有注明外，均应为符合国家标准的分析纯化学试剂。

#### 5.3.1 MFC 培养基

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                      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。

### 5.3.2 无菌滤膜

0.45 μm 滤膜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，20 min/次，前 2 次煮沸后需更换水洗涤 2~3 次。

5.3.3 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。

5.3.4 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 10g，溶于适量蒸馏水或去离子水中，定容至 100 ml。

5.3.5 乙二胺四乙酸二钠（EDTA- $\text{Na}_2$ ）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- $\text{Na}_2$  15g，溶于适量蒸馏水或去离子水中，定容至 100 ml。

## 5.4 仪器和设备

5.4.1 采样瓶：1 L 或 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 过滤装置：配有砂芯滤器和真空泵，抽滤压力勿超过 -50 kPa。

5.4.5 pH 计：准确到 0.1 pH 单位。

5.4.6 一般实验室常用仪器和设备。

## 5.5 样品

### 5.5.1 采样瓶

通常采用以耐用玻璃制成，1L 或 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

采集加氯处理的水样时，余氯的存在会影响待测水样所指示的真正细菌含量，因此必须进行去氯处理。清洁的采样瓶在灭菌前，就应先加入足够的  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ （按每 125 ml 加入 0.1 ml 的 0.1 g/ml  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ），然后盖好盖子，照前述的方法用干热或湿热灭菌。

采集含有高浓度重金属的废水水样时，在采样瓶内先放置螯合剂可以减少金属的毒性。事先在采样瓶中加入 0.3 ml 的 0.15 g/ml EDTA 溶液，然后高压蒸汽灭菌。

### 5.5.3 样品的采集

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。

采集一定深度的水样时，可使用单层采水器或深层采水器。采样时，将已灭菌的采样瓶放入采水器架内，当采水器下沉到预定深度时，扯动挂绳，打开瓶塞，待水灌满后，迅速提出水面，弃去上层水样，盖好瓶盖，并同步测定水深。

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。

采样时不需用水样冲洗采样瓶。采样后在瓶内要留足够的空间，一般采样量为采样瓶容量的 80% 左右，以便在实验室检验时，能充分振摇混合样品，获得具有代表性的样品。

同一采样点与理化监测项目同时采样时，应先采集细菌学检验样品。

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水样，混匀后分装于一系列样品瓶内，采集后的水样放置在冰箱中，4℃ 保存，每小时取一瓶水样，进行粪大肠菌群测定。

由于水样中粪大肠菌群实际结果的变化与保存时间直接相关而与测定方法无关，故为说明样品的最佳保存时间，在此选用经典的多管发酵法进行实验，结果见表 5。

表 5 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	$1.3 \times 10^3$	$1.7 \times 10^3$	$1.3 \times 10^3$	$1.7 \times 10^3$	$1.7 \times 10^3$	$1.7 \times 10^3$	$1.7 \times 10^3$	$2.2 \times 10^3$	$2.2 \times 10^3$
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	$2.3 \times 10^3$	$2.3 \times 10^3$	$2.3 \times 10^3$	$3.3 \times 10^3$	$3.3 \times 10^3$	$3.3 \times 10^3$	$3.3 \times 10^3$	$4.6 \times 10^3$	$4.9 \times 10^3$
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	$4.6 \times 10^3$	$7.0 \times 10^3$	$7.9 \times 10^3$	$7.9 \times 10^3$	$1.1 \times 10^4$	$1.1 \times 10^4$	$1.3 \times 10^4$	$1.3 \times 10^4$	$1.3 \times 10^4$

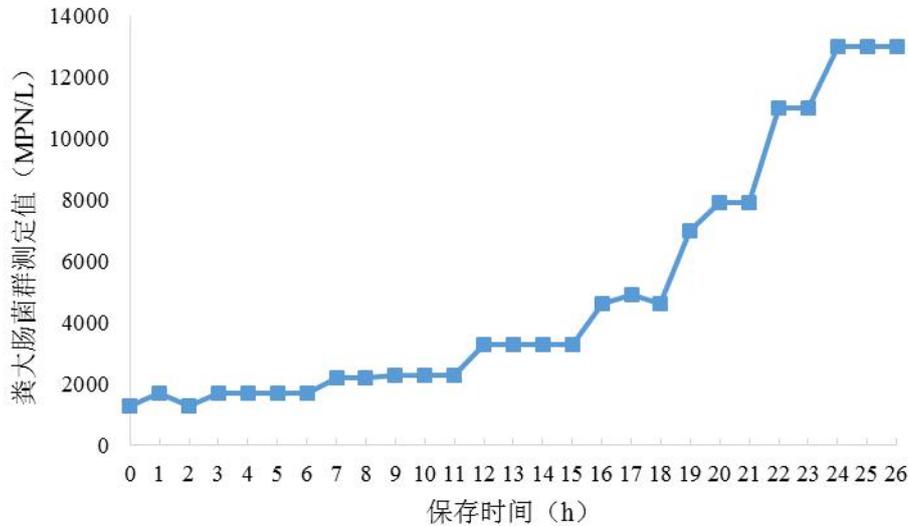


图2 样品冷藏条件保存实验

由表和图中可以看出，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，故在实际采样中，在冷藏条件下样品需在6小时内完成测定。

## 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 培养基的有效性检查

每一批次的培养基要用标准菌株验证其有效性。

阴性检查：将阴性标准菌株按照标准操作方法接种至灭菌后的乳糖蛋白胨培养基中，置于培养箱，37℃培养24 h±2 h。无产酸产气现象即证明阴性检查合格。

阳性检查：将阳性标准菌株按照标准操作方法接种至灭菌后的乳糖蛋白胨培养基中，置于培养箱，37℃培养24 h±2 h；将产酸产气的菌液用接种环接种至灭菌后的EC培养液中，置于培养箱，44.5℃培养24 h±2 h，有气泡产生的即为阳性。根据查表结果与标准菌株的结果进行对照，即可判定阳性检查结果是否合格。

### 5.6.3 水样过滤体积

水样量的选择根据实际水样中的粪大肠菌群的密度而定。如水样中粪大肠菌群的密度未知，则应过滤几个十倍体积差的水样，以得出最佳水样过滤体积。如水样污染较严重，可进行稀释后再抽滤，最小过滤体积为10 ml。由于粪大肠菌群在MFC培养基上生长的较大，所以理想的抽滤体积是一片滤膜上生长20~60个粪大肠菌群菌落。

### 5.6.4 实验室内方法研究

根据本标准的适用范围，分别选取地表水、地下水、生活污水和工业废水四种类型的水

进行了实验室内方法研究。地下水样品采自沈阳市郊农户家饮用水井，地表水样品采自辽宁省环保科学园园区湖水，生活污水样品采自沈阳市满堂污水处理厂未处理污水，工业废水样品采自沈阳市雪花啤酒厂。在此基础上进行了数据的汇总和分析整理工作，情况如下。

表 6 地表水测试数据

平行号		地表水	
		结果	结果对数值
测定结果	1	120	2.08
	2	60	1.78
	3	40	1.60
	4	40	1.60
	5	60	1.78
	6	60	1.78
平均值 $\bar{x}$		——	1.77
标准偏差 $S$		——	0.17
相对标准偏差 RSD ( % )		——	9.86
注： $\bar{x}$ 、 $S$ 、RSD ( % ) 为原始数据以 10 为底，对数计算所得 (下同)。			

表 7 地下水测试数据

平行号		地下水	
		结果	结果对数值
测定结果	1	480	2.68
	2	620	2.79
	3	390	2.59
	4	290	2.46
	5	490	2.69
	6	540	2.73
平均值 $\bar{x}$		——	2.66
标准偏差 $S$		——	0.12
相对标准偏差 RSD ( % )		——	4.38

表 8 生活污水测试数据

平行号		生活污水	
		结果	结果对数值
测定结果	1	1467	3.17
	2	2089	3.32
	3	1911	3.28
	4	2422	3.38
	5	2533	3.40

	6	1600	3.20
平均值 $\bar{x}$		—	3.29
标准偏差 $S$		—	0.10
相对标准偏差 RSD ( % )		—	2.89

表 9 工业废水测试数据

平行号		工业废水	
		结果	结果对数值
测定结果	1	3889	3.59
	2	1600	3.20
	3	2200	3.34
	4	1378	3.14
	5	3378	3.53
	6	1578	3.20
平均值 $\bar{x}$		—	3.33
标准偏差 $S$		—	0.19
相对标准偏差 RSD ( % )		—	5.64

实验室内方法研究的 95 %置信区间汇总情况如下。

表 10 实验室内方法研究的 95 %置信区间

地下水 (CFU/L)		地表水 (CFU/L)		生活污水 (CFU/L)		工业废水 (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
$4.6 \times 10^2$	$3.4 \times 10^2 \sim 6.0 \times 10^2$	59	39~90	$2.0 \times 10^3$	$1.6 \times 10^3 \sim 2.5 \times 10^3$	$2.2 \times 10^3$	$1.4 \times 10^3 \sim 3.4 \times 10^3$

在四种类型水样的测定中,选取了北京奥博星及北京陆桥两种使用最为广泛的培养基做对比,将两种培养基测定结果整理如下。

表 11 两种培养基测定结果比较

序号	水样类型	培养基	
		奥博星	陆桥
1	地表水	120	60
2		40	40
3		60	60
4	地下水	480	620
5		390	290
6		490	540
7	生活污水	1467	2089

8	工业废水	1911	2422
9		2533	1600
10		3889	3378
11		2200	1600
12		1378	1578

对两种培养基检测的粪大肠菌群结果进行配对 t 检验，为了使两组数据呈正态分布，对数据进行对数处理后进行配对 t 检验，结果如下。

表 12 两种培养基配对 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			
奥博星-陆桥	.03001	.13843	.03996	-.05795	.11796	.751	11	.469

由表可见，使用北京奥博星和北京陆桥两种培养基测定粪大肠菌群的结果在统计学意义上没有显著性差异（P=0.469）。

#### 5.6.5 与多管发酵法的比较

使用 IDEXX 公司提供的粪大肠菌群质控标样，对滤膜法和多管发酵法进行方法质控，检测的结果见表。由表可见，滤膜法和多管发酵法的检测结果均在质量控制可置信度区间内。同时由图可见，滤膜法测定的结果要略低于多管发酵法测定的结果。

表 13 多管发酵法与滤膜法的可置信度检验

序号	检测结果		QC 值	置信范围
	多管发酵法	滤膜法		
1	2400	1500	3670MPN/L	370~7710MPN/L
2	490	720		
3	490	700		
4	1300	900		
5	2200	380		
6	3500	580		
7	2400	560		
8	5400	680		
9	1300	360		
10	2400	720		
11	5400	1060		
12	3500	840		
13	2400	600		
14	5400	1340		

15	2400	580
16	5400	1040
17	2400	560
18	3500	900
19	5400	1120
20	1400	340
21	5400	340
22	2400	640
23	3500	1200
24	2400	780
25	1300	500
26	5400	1500
27	1100	440
28	9200	1040
29	3500	420
30	5400	620
31	5400	600
32	9200	820

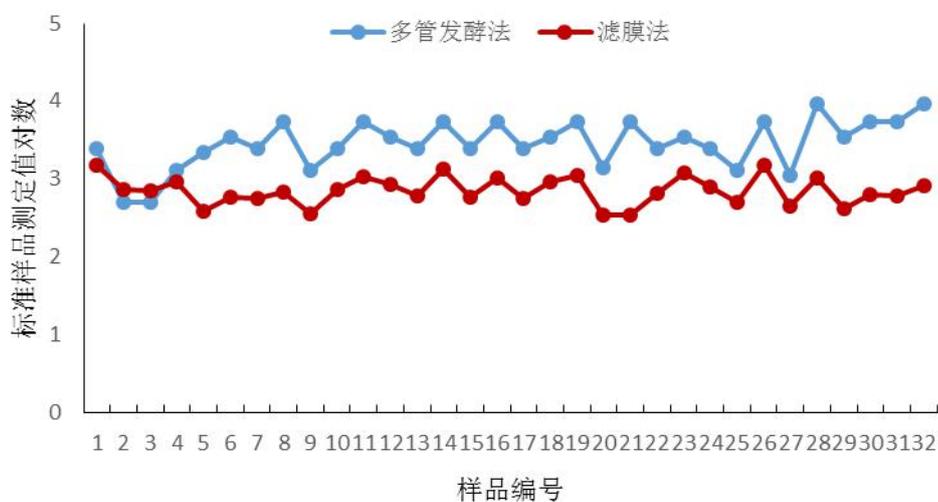


图3 多管发酵法与滤膜法测定结果比较

## 5.7 结果计算

粪大肠菌群菌落在MFC培养基上呈蓝色或蓝绿色，其他非粪大肠菌群菌落呈灰色至奶油色。正常情况下，由于温度和玫瑰酸盐的选择作用，在MFC培养基上很少见到非粪大肠菌群菌落。必要时可将可疑菌落接种于EC培养液中， $44.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ ，如产气则证实为粪大肠菌群。

### 5.7.1 结果计算

计数呈蓝色或蓝绿色的菌落，计算出每升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。

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。

### 5.7.2 结果表示

测定结果保留二位有效数字，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。

## 5.8 质量保证与质量控制

### 5.8.1 培养基检验

更换不同批次培养基时要用标准菌株做阳性和阴性检验，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，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

每次试验都要用无菌水进行实验室空白测定，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。

### 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。

## 6 方法验证

### 6.1 方法验证方案

#### 6.1.1 验证单位基本情况

共有 6 家单位参加了方法验证工作，验证单位及参与验证人员相关信息见表。

表 14 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
铁岭市环境保护监测站	高铭泽	女	29	工程师	环境工程	8 年
铁岭市环境保护监测站	胡桂鹏	男	28	助理工程师	生物工程	2 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

#### 6.1.2 方法验证方案

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精密度和准确度的验证试验。

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（约  $5.0 \times 10^2$  CFU/L、 $3.0 \times 10^5$  CFU/L、 $5.0 \times 10^6$  CFU/L）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 6h 内）进行粪大肠菌群滤膜法的检测，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滤膜法的检测，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，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，地下水样品采自沈阳市郊农户家饮用水井，地表水样品采自辽宁省环保科学园园区湖水，生活污水样品采自沈阳市满堂污水处理厂未处理污水，工业废水样品采自沈阳市雪花啤酒厂。

(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辽宁北方环境检测技术有限公司实验室验证，其他验证单位均在各自实验室进行方法验证。

(4) 精密度验证结论 (低、中、高三个浓度及标准样品):

实验室内相对标准偏差为: 5.30 %~11.71 %, 0.81 %~2.10 %, 0.51 %~4.23 %, 7.66 %~9.81 %;

实验室间相对标准偏差为: 6.80 %, 3.91 %, 3.96 %, 3.62 %;

实验室内 95 %置信区间和实验室间 95 %置信区间分别见表 16 和表 17。

表 15 实验室内 95 %置信区间

城市	地下水 (CFU/L)		地表水 (CFU/L)		废水 (CFU/L)		标样 (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
辽阳	$1.9 \times 10^2$	$1.1 \times 10^2 \sim 3.4 \times 10^2$	$1.1 \times 10^5$	$8.7 \times 10^4 \sim 1.3 \times 10^5$	$1.4 \times 10^7$	$1.3 \times 10^7 \sim 1.5 \times 10^7$	$4.3 \times 10^2$	$2.8 \times 10^2 \sim 6.7 \times 10^2$
丹东	$1.4 \times 10^2$	$0.76 \times 10^2 \sim 2.6 \times 10^2$	$9.8 \times 10^4$	$8.0 \times 10^4 \sim 1.2 \times 10^5$	$4.8 \times 10^6$	$2.5 \times 10^6 \sim 9.7 \times 10^6$	$2.6 \times 10^2$	$2.1 \times 10^2 \sim 3.4 \times 10^2$
大连	$2.6 \times 10^2$	$1.9 \times 10^2 \sim 3.5 \times 10^2$	$2.3 \times 10^5$	$2.1 \times 10^5 \sim 2.6 \times 10^5$	$1.6 \times 10^7$	$1.1 \times 10^7 \sim 2.4 \times 10^7$	$7.6 \times 10^2$	$4.6 \times 10^2 \sim 1.3 \times 10^3$
锦州	$1.4 \times 10^2$	$0.94 \times 10^2 \sim 2.1 \times 10^2$	$2.5 \times 10^5$	$2.3 \times 10^5 \sim 2.8 \times 10^5$	$3.8 \times 10^7$	$2.7 \times 10^7 \sim 5.3 \times 10^7$	$7.5 \times 10^2$	$4.9 \times 10^2 \sim 1.1 \times 10^3$
铁岭	$2.9 \times 10^2$	$1.4 \times 10^2 \sim 5.6 \times 10^2$	$2.4 \times 10^5$	$1.8 \times 10^5 \sim 3.1 \times 10^5$	$1.4 \times 10^7$	$9.3 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^7$	$7.0 \times 10^2$	$4.3 \times 10^2 \sim 1.1 \times 10^3$
沈阳	$1.2 \times 10^2$	$0.75 \times 10^2 \sim 1.9 \times 10^2$	$1.1 \times 10^5$	$9.4 \times 10^4 \sim 1.2 \times 10^5$	$1.7 \times 10^7$	$1.0 \times 10^7 \sim 2.8 \times 10^7$	$7.2 \times 10^2$	$4.1 \times 10^2 \sim 1.3 \times 10^3$

表 16 实验室间 95 %置信区间

地下水 (CFU/L)		地表水 (CFU/L)		废水 (CFU/L)		标样 (CFU/L)	
均值	95 %置信区间						
$2.0 \times 10^2$	$1.4 \times 10^2 \sim 2.9 \times 10^2$	$1.6 \times 10^5$	$9.8 \times 10^4 \sim 2.6 \times 10^5$	$1.6 \times 10^7$	$8.2 \times 10^6 \sim 3.0 \times 10^7$	$6.1 \times 10^2$	$3.8 \times 10^2 \sim 9.9 \times 10^2$

准确度验证结论 (标准样品):

相对误差为-19.13 %~-32.04 %;

相对误差最终值: -22.76 %±10.46 %。

(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,本标准为滤膜法。

## 8 参考文献

- [1] 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.
- [2] Method 1103.1: Escherichia coli (E. coli) in Water by Membrane Filtration Using membrane-Thermotolerant Escherichia coli Agar (mTEC).
- [3] Method 1603: Escherichia coli (E. coli) in Water by Membrane Filtration Using Modified membrane-Thermotolerant Escherichia coli Agar(Modified mTEC).
- [4] Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater 9222D(22<sup>ND</sup> EDITION)
- [5] 地表水环境质量标准,GB3838-2002.
- [6] 生活饮用水卫生标准,GB5749-2006.
- [7] 海水水质标准,GB3097-1997.
- [8] 农田灌溉水质标准, GB5084-2005.
- [9] 医疗机构水污染物排放标准, GB18466-2005.
- [10] 生活垃圾填埋场污染控制标准, GB16889-2008.
- [11] 畜禽养殖业污染物排放标准, GB18596-2001.
- [12] 生物工程类制药工业水污染物排放标准, GB21907-2008.
- [13] 城镇污水处理厂污染物排放标准, GB18918-2002.
- [14] 污水综合排放标准, GB 8978-1996.
- [15] 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.
- [16] 生活饮用水标准检验方法 微生物指标, GB/T 5750.12-2006.
- [17] 环境监测 分析方法标准制修订技术导则,HJ 168-2010.
- [18] 水和废水监测分析方法(第四版)(增补版),中国环境科学出版社,2002年.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 张少峰,刘国强,魏春雷.粪大肠菌群检测方法的研究进展.海洋通报,2008,27(3):102-106.
- [23] 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 滤膜法

项目主编单位：辽宁省环境监测实验中心

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

项目负责人职称：助理工程师

通讯地址：沈阳市东陵区双园路 30 甲-3 号 电话：024-62780471

报告编写人及职称：丁振军 助理工程师

报告日期：2015 年 8 月 28 日

## 1 原始测试数据

### 1.1 实验室基本情况

附表 1-1 参加验证的人员情况登记表

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
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
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
辽阳市环境监测站	张旭	女	28	工程师	环境工程	6 年
铁岭市环境保护监测站	高铭泽	女	29	工程师	环境工程	8 年
铁岭市环境保护监测站	胡桂鹏	男	28	助理工程师	生物工程	2 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

附表 1-2 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	温度偏差
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	±0.5℃
	电热培养箱	DHP-9082302A-42	1101130301	±0.08℃
	电热培养箱	DHP-9082302A-42	1301130806	±0.08℃
锦州市环境监测中心站	立式压力蒸汽灭菌器	LDZX-30FB	08M596	±0.34℃
	生化培养箱	LRH-250A	A0312359	±0.34℃
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℃

铁岭市环境保护监测站	立式高压蒸汽灭菌器	YXQ-LS	2013-B3110	±0.2℃
	电热恒温培养箱	DH6000	476	±0.2℃
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℃

附表 1-3 使用试剂及溶剂登记表

验证单位	名称	生产厂家、规格	级别
大连市环境监测中心	MFC 培养基	北京奥博星, 北京陆桥, 250g	BR
丹东市环境监测中心站	MFC 培养基	北京奥博星, 250g	BR
锦州市环境监测中心站	MFC 培养基	北京奥博星, 250g	BR
辽阳市环境监测站	MFC 培养基	北京奥博星, 北京陆桥, 250g	BR
铁岭市环境保护监测站	MFC 培养基	北京奥博星, 250g	BR
沈阳市疾病预防控制中心	MFC 培养基	北京奥博星, 北京陆桥, 250g	BR

## 1.2 方法精密度测试数据

附表 1-4 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				备注
	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	1	$1.0 \times 10^2$	$1.2 \times 10^5$	$2.1 \times 10^7$	$1.3 \times 10^3$
	2	$1.0 \times 10^2$	$1.1 \times 10^5$	$3.5 \times 10^7$	$8.4 \times 10^2$
	3	$3.0 \times 10^2$	$1.3 \times 10^5$	$4.9 \times 10^7$	$7.2 \times 10^2$
	4	$4.0 \times 10^2$	$1.3 \times 10^5$	$3.9 \times 10^7$	$2.8 \times 10^2$
	5	$2.0 \times 10^2$	$8.0 \times 10^4$	$5.4 \times 10^7$	$1.1 \times 10^3$

	6	$2.0 \times 10^2$	$8.9 \times 10^4$	$3.8 \times 10^7$	$6.0 \times 10^2$	
平均值 $\bar{x}_i$		2.28	5.03	7.58	2.86	
标准偏差 $S_i$		0.25	0.08	0.14	0.24	
相对标准偏差 RSD %		10.75	1.67	1.90	8.27	

注： $\bar{x}$ 、 $S$ 为原始数据以10为底，对数转化后计算所得（下同）。

附表 1-5 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				备注
		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	1	$2.0 \times 10^2$	$2.0 \times 10^5$	$1.0 \times 10^7$	$3.8 \times 10^2$	
	2	$1.0 \times 10^2$	$2.7 \times 10^5$	$3.2 \times 10^7$	$2.2 \times 10^2$	
	3	$1.0 \times 10^2$	$2.7 \times 10^5$	$1.8 \times 10^7$	$5.6 \times 10^2$	
	4	$1.0 \times 10^2$	$3.2 \times 10^5$	$1.6 \times 10^7$	$3.6 \times 10^2$	
	5	$1.0 \times 10^2$	$2.6 \times 10^5$	$1.3 \times 10^7$	$6.8 \times 10^2$	
	6	$4.0 \times 10^2$	$1.6 \times 10^5$	$1.4 \times 10^7$	$5.8 \times 10^2$	
平均值 $\bar{x}_i$		2.15	5.38	7.20	2.64	
标准偏差 $S_i$		0.25	0.11	0.17	0.18	
相对标准偏差 RSD %		11.71	2.10	2.38	6.85	

附表 1-6 精密度测试数据

验证单位：大连市环境监测中心站

测试日期：2015年7月9日

平行号	试 样	备注
-----	-----	----

		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	1	$3.0 \times 10^2$	$2.3 \times 10^5$	$1.5 \times 10^7$	$3.0 \times 10^2$	
	2	$2.0 \times 10^2$	$2.9 \times 10^5$	$1.3 \times 10^7$	$2.4 \times 10^2$	
	3	$2.0 \times 10^2$	$2.8 \times 10^5$	$2.3 \times 10^7$	$1.8 \times 10^2$	
	4	$3.0 \times 10^2$	$2.4 \times 10^5$	$1.1 \times 10^7$	$3.4 \times 10^2$	
	5	$2.0 \times 10^2$	$2.5 \times 10^5$	$1.6 \times 10^7$	$2.6 \times 10^2$	
	6	$4.0 \times 10^2$	$2.5 \times 10^5$	$8.0 \times 10^7$	$3.0 \times 10^2$	
平均值 $\bar{x}_i$		2.41	5.41	7.13	2.42	
标准偏差 $S_i$		0.13	0.04	0.16	0.10	
相对标准偏差 RSD %		5.30	0.81	2.18	4.03	

附表 1-7 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				备注
		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	1	$2.0 \times 10^2$	$1.9 \times 10^5$	$1.5 \times 10^7$	$6.4 \times 10^2$	
	2	$2.0 \times 10^2$	$2.4 \times 10^5$	$1.7 \times 10^7$	$4.4 \times 10^2$	
	3	$1.0 \times 10^2$	$2.3 \times 10^5$	$3.0 \times 10^7$	$5.0 \times 10^2$	
	4	$1.0 \times 10^2$	$2.3 \times 10^5$	$2.7 \times 10^7$	$1.2 \times 10^3$	
	5	$2.0 \times 10^2$	$2.7 \times 10^5$	$8.0 \times 10^6$	$7.8 \times 10^2$	
	6	$1.0 \times 10^2$	$2.3 \times 10^5$	$1.4 \times 10^7$	$1.5 \times 10^3$	
平均值 $\bar{x}_i$		2.15	5.36	7.23	2.88	
标准偏差 $S_i$		0.16	0.05	0.21	0.21	
相对标准偏差		7.67	0.84	2.89	7.30	

RSD %					
-------	--	--	--	--	--

附表 1-8 精密度测试数据

验证单位：铁岭市环境保护监测站

测试日期：2015 年 7 月 9 日

平行号		试 样				备注
		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	1	$3.0 \times 10^2$	$8.7 \times 10^4$	$5.0 \times 10^6$	$1.3 \times 10^3$	
	2	$6.0 \times 10^2$	$9.4 \times 10^4$	$5.0 \times 10^6$	$6.2 \times 10^2$	
	3	$3.0 \times 10^2$	$8.1 \times 10^4$	$2.0 \times 10^6$	$4.2 \times 10^2$	
	4	$5.0 \times 10^2$	$1.4 \times 10^5$	$3.0 \times 10^6$	$6.0 \times 10^2$	
	5	$2.0 \times 10^2$	$8.7 \times 10^4$	$1.3 \times 10^7$	$8.2 \times 10^2$	
	6	$1.0 \times 10^2$	$1.1 \times 10^5$	$7.0 \times 10^6$	$1.0 \times 10^3$	
平均值 $\bar{x}_i$		2.46	4.99	6.69	2.87	
标准偏差 $S_i$		0.281	0.08	0.28	0.18	
相对标准偏差 RSD %		11.46	1.64	4.23	6.19	

附表 1-9 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				备注
		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	1	$1.0 \times 10^2$	$1.3 \times 10^5$	$1.2 \times 10^7$	$5.6 \times 10^2$	
	2	$1.0 \times 10^2$	$1.0 \times 10^5$	$1.4 \times 10^7$	$5.8 \times 10^2$	
	3	$1.0 \times 10^2$	$9.3 \times 10^4$	$1.4 \times 10^7$	$1.1 \times 10^3$	
	4	$1.0 \times 10^2$	$9.5 \times 10^4$	$1.3 \times 10^7$	$3.4 \times 10^2$	

	5	$3.0 \times 10^2$	$1.1 \times 10^5$	$1.5 \times 10^7$	$9.0 \times 10^2$	
	6	$1.0 \times 10^2$	$1.1 \times 10^5$	$1.5 \times 10^7$	$1.0 \times 10^3$	
平均值 $\bar{x}_i$		2.08	5.03	7.14	2.84	
标准偏差 $S_i$		0.19	0.05	0.04	0.20	
相对标准偏差 RSD %		9.37	1.07	0.51	6.99	

附表 1-10 实验室内 95 %置信区间

城市	地下水 (CFU/L)		地表水 (CFU/L)		废水 (CFU/L)		标样 (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
辽阳	$1.9 \times 10^2$	$1.1 \times 10^2 \sim 3.4 \times 10^2$	$1.1 \times 10^5$	$8.7 \times 10^4 \sim 1.3 \times 10^5$	$1.4 \times 10^7$	$1.3 \times 10^7 \sim 1.5 \times 10^7$	$4.3 \times 10^2$	$2.8 \times 10^2 \sim 6.7 \times 10^2$
丹东	$1.4 \times 10^2$	$0.76 \times 10^2 \sim 2.6 \times 10^2$	$9.8 \times 10^4$	$8.0 \times 10^4 \sim 1.2 \times 10^5$	$4.8 \times 10^6$	$2.5 \times 10^6 \sim 9.7 \times 10^6$	$2.6 \times 10^2$	$2.1 \times 10^2 \sim 3.4 \times 10^2$
大连	$2.6 \times 10^2$	$1.9 \times 10^2 \sim 3.5 \times 10^2$	$2.3 \times 10^5$	$2.1 \times 10^5 \sim 2.6 \times 10^5$	$1.6 \times 10^7$	$1.1 \times 10^7 \sim 2.4 \times 10^7$	$7.6 \times 10^2$	$4.6 \times 10^2 \sim 1.3 \times 10^3$
锦州	$1.4 \times 10^2$	$0.94 \times 10^2 \sim 2.1 \times 10^2$	$2.5 \times 10^5$	$2.3 \times 10^5 \sim 2.8 \times 10^5$	$3.8 \times 10^7$	$2.7 \times 10^7 \sim 5.3 \times 10^7$	$7.5 \times 10^2$	$4.9 \times 10^2 \sim 1.1 \times 10^3$
铁岭	$2.9 \times 10^2$	$1.4 \times 10^2 \sim 5.6 \times 10^2$	$2.4 \times 10^5$	$1.8 \times 10^5 \sim 3.1 \times 10^5$	$1.4 \times 10^7$	$9.3 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^7$	$7.0 \times 10^2$	$4.3 \times 10^2 \sim 1.1 \times 10^3$
沈阳	$1.2 \times 10^2$	$0.75 \times 10^2 \sim 1.9 \times 10^2$	$1.1 \times 10^5$	$9.4 \times 10^4 \sim 1.2 \times 10^5$	$1.7 \times 10^7$	$1.0 \times 10^7 \sim 2.8 \times 10^7$	$7.2 \times 10^2$	$4.1 \times 10^2 \sim 1.3 \times 10^3$

### 1.3 方法准确度测试数据

附表 1-11 有证标准物质/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/L)	1	1340	3.13
	2	840	2.92
	3	720	2.86
	4	280	2.45
	5	1060	3.03

	6	600	2.78	
平均值 $\bar{x}_i$		—	2.86	
标准样品浓度 (MPN/L)		3670	3.56	
相对误差 RE <sub>i</sub> (%)		—	-19.77	

附表 1-12 有证标准物质/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
		浓度值	对数值	
测定结果 (CFU/L)	1	380	2.58	
	2	220	2.34	
	3	560	2.75	
	4	360	2.56	
	5	680	2.83	
	6	580	2.76	
平均值 $\bar{x}_i$		—	2.64	
标准样品浓度 (MPN/L)		3670	3.56	
相对误差 RE <sub>i</sub> (%)		—	-26.02	

附表 1-13 有证标准物质/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
		浓度值	对数值	
测定结果 (CFU/L)	1	300	2.48	
	2	240	2.38	
	3	180	2.26	
	4	340	2.53	
	5	260	2.42	

	6	300	2.48	
平均值 $\bar{x}_i$		—	2.42	
标准样品浓度 (MPN/L)		3670	3.56	
相对误差 RE <sub>i</sub> (%)		—	-32.04	

附表 1-14 有证标准物质/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
		浓度值	对数值	
测定结果 (CFU/L)	1	640	2.81	
	2	440	2.64	
	3	500	2.70	
	4	1200	3.08	
	5	780	2.89	
	6	1500	3.18	
平均值 $\bar{x}_i$		—	2.88	
标准样品浓度 (MPN/L)		3670	3.56	
相对误差 RE <sub>i</sub> (%)		—	-19.13	

附表 1-15 有证标准物质/标准样品测试数据

验证单位：铁岭市环境保护监测站

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/L)	1	1300	3.11	
	2	620	2.79	
	3	420	2.62	
	4	600	2.78	
	5	820	2.91	

	6	1040	3.02	
平均值 $\bar{x}_i$		—	2.87	
标准样品浓度 (MPN/L)		3670	3.56	
相对误差 RE <sub>i</sub> (%)		—	-19.40	

附表 1-16 有证标准物质/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
		浓度值	对数值	
测定结果 (CFU/L)	1	560	2.75	
	2	580	2.76	
	3	1120	3.05	
	4	340	2.53	
	5	900	2.95	
	6	1040	3.02	
平均值 $\bar{x}_i$		—	2.84	
标准样品浓度 (MPN/L)		3670	3.56	
相对误差 RE <sub>i</sub> (%)		—	-20.22	

## 2 方法验证数据汇总

### 2.1 方法精密度数据汇总

附表 2-1 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 <sub>i</sub>									
1	2.41	0.13	5.30	5.36	0.05	0.84	7.20	0.17	2.38	2.81	0.27	9.56
2	2.08	0.19	9.37	5.03	0.05	1.07	7.23	0.21	2.89	2.64	0.23	8.89
3	2.15	0.25	11.71	4.99	0.08	1.64	6.69	0.28	4.23	2.71	0.27	9.81
4	2.28	0.25	10.75	5.03	0.08	1.67	7.14	0.04	0.51	2.65	0.24	8.89
5	2.46	0.28	11.46	5.38	0.11	2.10	7.13	0.16	2.18	2.84	0.22	7.66

6	2.15	0.16	7.67	5.41	0.04	0.81	7.58	0.14	1.90	2.87	0.25	8.69
$\bar{X}$	2.25		5.20		7.16		2.75					
$S_i$	0.15		0.20		0.28		0.10					
RSD <sub>i</sub> (%)	6.80		3.91		3.96		3.62					
95%置信 区间 (CFU/L)	1.4×10 <sup>2</sup> ~2.9×10 <sup>2</sup>		9.8×10 <sup>4</sup> ~2.6×10 <sup>5</sup>		8.2×10 <sup>6</sup> ~3.0×10 <sup>7</sup>		3.8×10 <sup>2</sup> ~9.9×10 <sup>2</sup>					

注： $\bar{X}$ 、S、RSD 是用原始数据以 10 为底，对数计算后所得。

结论：6 个实验室对三个不同浓度粪大肠菌群样品和标准样品进行了测定：

实验室内相对标准偏差为：5.30%~11.71%，0.81%~2.10%，0.51%~4.23%，7.66%~9.81%；

实验室间相对标准偏差为：6.80%，3.91%，3.96%，3.62%；

实验室间 95%置信区间见附表 2-2：

附表 2-2 实验室间 95%置信区间

地下水 (CFU/L)		地表水 (CFU/L)		废水 (CFU/L)		标样 (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 <sup>2</sup>	1.4×10 <sup>2</sup> ~ 2.9×10 <sup>2</sup>	1.6×10 <sup>5</sup>	9.8×10 <sup>4</sup> ~ 2.6×10 <sup>5</sup>	1.6×10 <sup>7</sup>	8.2×10 <sup>6</sup> ~ 3.0×10 <sup>7</sup>	6.1×10 <sup>2</sup>	3.8×10 <sup>2</sup> ~ 9.9×10 <sup>2</sup>

## 2.2 方法准确度汇总

附表 2-3 有证标准物质/标准样品测试数据汇总表

实验室号	$\bar{x}_i$	RE <sub>i</sub>
1	2.88	-19.13
2	2.86	-19.77
3	2.42	-32.04
4	2.64	-26.02
5	2.84	-20.22
6	2.87	-19.40
$\overline{RE}$	-22.76	
$S_{RE}$	5.23	

结论：6 个实验室对含粪大肠菌群浓度为 3670MPN/L 的标准样品进行了测定：

相对误差为-19.13%~-32.04%；

相对误差最终值为-22.76%±10.46%。

## 3 方法验证结论

按照《环境监测 分析方法标准制修订技术导则》(HJ 168-2010)的要求,七家有资质的实验室测定的结果表明:

(1) 精密度:

6个实验室对地下水(约 $5.0 \times 10^2$  CFU/L)、地表水(约 $3.0 \times 10^5$  CFU/L)和废水(约 $5.0 \times 10^6$  CFU/L)三个不同浓度粪大肠菌群的实际样品和标准样品(3670 MPN/L, 330~7710 MPN/L)进行了验证:实验室内相对标准偏差分别为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%置信区间见附表3-1。

附表3-1 实验室间95%置信区间

地下水 (CFU/L)		地表水 (CFU/L)		废水 (CFU/L)		标样 (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
$2.0 \times 10^2$	$1.4 \times 10^2 \sim 2.9 \times 10^2$	$1.6 \times 10^5$	$9.8 \times 10^4 \sim 2.6 \times 10^5$	$1.6 \times 10^7$	$8.2 \times 10^6 \sim 3.0 \times 10^7$	$6.1 \times 10^2$	$3.8 \times 10^2 \sim 9.9 \times 10^2$

(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:相对误差为-19%~-32%;相对误差最终值为:-23%±10%。

(3) 该方法实验室内相对偏差、实验室间相对偏差等特征指标的最终值达到预期要求。