ICS 13.060
Z 16

DB37

山　　东　　省　　地　　方　　标　　准

DB37/T 3787—2019

水质　粪大肠菌群测定　光度法

Water quality—determination of fecal coliforms—photometric method

2019－12－24发布　　2020－01－24实施

山东省市场监督管理局　发布

目　次

前言 II
1　范围 1
2　规范性引用文件 1
3　术语和定义 1
4　分光光度法 1
5　荧光法 4

前　言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由山东省生态环境厅提出并组织实施。

本标准由山东省环保标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：山东省生态环境监测中心、青岛佳明测控科技股份有限公司、北京华夏科创仪器股份有限公司。

本标准主要起草人：李恒庆、由希华、宗雪梅、王婷、王聪、郑琳琳、邹康、潘光、周成、张芳、张爱芳。

水质　粪大肠菌群测定　光度法

1　范围

本标准规定了测定水中粪大肠菌群的分光光度法和荧光法。

本标准适用于地表水、生活污水和工业废水中粪大肠菌群的应急现场快速测定。

本方法的检出限为30 MPN/L，检测范围：30～10^9 MPN/L，检测周期不大于18 h。

2　规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 14581　水质　湖泊和水库采样技术指导

HJ/T 91　地表水和污水监测技术规范

HJ 494　水质　采样技术指导

3　术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

粪大肠菌群　fecal coliforms

44.5 ℃培养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。

3.2

最大可能数　most probable number，MPN

最大可能数（most probable number，缩写为MPN），又称稀释培养计数，是一种基于泊松分布的间接计数法。利用统计学原理，根据一定体积不同稀释度样品经培养后产生的目标微生物阳性数，查表估算一定体积样品中目标微生物存在的数量（单位体积存在目标微生物的最大可能数）。

4　分光光度法

4.1　方法原理

一定量的水样与选择性培养基混合均匀放置于44.5 ℃环境下，粪大肠菌群产生β-半乳糖苷酶（β-D-galactosidase），并分解色原底物释放出色原体使培养基呈现颜色变化，通过连续分光光度（波长：300 nm～600 nm）测定，依据待测水样色度变化与水中粪大肠菌群数成一定关系的原理，得出粪大肠菌群浓度。

4.2　干扰和消除

4.2.1 活性氯具有氧化性，能破坏微生物细胞内的酶活性，导致细胞死亡，可在样品采集（4.5.1）时加入硫代硫酸钠溶液（4.3.4）消除干扰。

4.2.2 重金属离子具有细胞毒性，能破坏微生物细胞内的酶活性，导致细胞死亡，可在样品采集（4.5.1）时加入乙二胺四乙酸二钠溶液（4.3.5）消除干扰。

4.3 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试剂。

4.3.1 粪大肠菌群检测试剂主要成分：

——蛋白胨：5 g；

——硫酸锰：0.005 g；

——硫酸镁：0.001 g；

——硫酸锌：0.001 g；

——磷酸盐：1.78 g；

——两性霉素 B：0.60 g；

——蒸馏水 1 000 mL。

制法：上述试剂溶于蒸馏水中，充分混匀，调整pH值为7.2～7.4，68.95 kPa(115 ℃)，高压灭菌20 min，分装贮存于4 ℃避光备用。

注：也可采用市售商品化培养基制品。

4.3.2 硫代硫酸钠（$Na_2S_2O_3$•$5H_2O$）。

4.3.3 乙二胺四乙酸二钠（$C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2$•$2H_2O$）。

4.3.4 硫代硫酸钠溶液：ρ（$Na_2S_2O_3$）=0.10 g/mL，称取 15.7 g 硫代硫酸钠（4.3.2），溶于适量水中，定容至 100 mL，临用现配。

4.3.5 乙二胺四乙酸二钠（EDTA-Na_2）溶液：ρ（$C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2$•$2H_2O$）=0.15 g/mL，称取 15 g 乙二胺四乙酸二钠（4.3.3），溶于适量水中，定容至 100 mL，此溶液保质期为 30 d。

4.3.6 无菌水：取适量纯水，经 121 ℃高压蒸汽灭菌 20 min，备用。

4.4 仪器和设备

4.4.1 采样瓶：具螺旋帽或磨口塞的 100 mL、250 mL、500 mL 广口玻璃瓶。

注：在采集不存在或不考虑余氧、金属离子干扰的样品时，可采用市售无菌采样瓶或无菌采样袋。

4.4.2 微生物快速检测仪：

——恒温培养单元：不少于 2 个温控系统，温度控制精度 1 ℃，可自动调节待检测样本培养温度（44.5 ℃±1 ℃）；

——检测单元：不少于 4 个独立的检测系统，可实现多个样本的同时监测；

——数据显示、处理单元：自动输出检测结果，可查询和显示历史数据。

4.4.3 高压蒸汽灭菌器：121 ℃可调、101.3 kpa。

4.4.4 量筒：50 mL、100 mL。

4.4.5 移液管：1 mL、10 mL。

4.4.6 天平：感量 0.01 g。

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

4.5 样品

4.5.1 样品采集

点位布设及采样频次按照GB/T 14581、HJ 494和HJ/T 91的相关规定执行。

与其它项目一同采样时，先单独采集微生物样品，采样瓶（4.4.1）不得用水样洗涤，采集水样于灭菌的采样瓶中。

采集河流、湖库等地表水样时，可握住瓶子下部直接将带塞采样瓶插入水中，约距水面10 cm～15 cm处，瓶口朝水流方向，拔玻璃塞，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，可握住瓶子水平往前推。采样量一般为采样瓶容量的80%左右。采好水样后，迅速扎上无菌包装纸。

采集地表水、废水样品及一定深度的水样时，可使用灭菌过后专用采样装置采样。

在同一采样点进行分层采样时，应自上而下进行，避免不同层次的搅扰。

如果采集的是含有活性氯的样品时，需在采样瓶灭菌前加入硫代硫酸钠溶液（4.3.4），以除去活性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样品，则在采样瓶灭菌前加入乙二胺四乙酸二钠（EDTA-Na_2）溶液（4.3.5），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：15.7 mg硫代硫酸钠(4.3.2)可去除样品中1.5 mg活性氯，硫代硫酸钠用量可根据样品实际活性氯量调整。

4.5.2 样品保存

采样后应在2 h内检测，否则，应10 ℃以下冷藏但不得超过6 h。实验室接样后，不能立即开展检测的，将样品于4 ℃以下冷藏并在2 h内检测。

4.6 分析步聚

4.6.1 接种

接种待测水样于装有5 mL培养基的检测瓶中，定容至20 mL，水样与培养基应充分混匀。

4.6.2 培养

打开仪器电源开关，待仪器稳定30 min后，将接种后的检测瓶放置于微生物快速检测仪中，按照仪器说明书进行操作，设置检测温度为44.5 ℃，点击“检测”按钮，2～18小时，仪器自动培养得出结果。

4.6.3 对照试验

4.6.3.1 空白对照

采用无菌水（4.3.6）作为待测水样按照本标准4.6.1～4.6.2进行空白测定，测试结果不得检出，否则该次样品测定结果无效，应重新测定空白以及待测样品。

4.6.3.2 阴性及阳性对照

粪大肠菌群的阴性、阳性菌株参考表1。

表1 阴性、阳性菌株参照表

检测指标	阳性菌种	阴性菌种
粪大肠菌群	大肠埃希氏菌（耐热型）、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella trevisan*)（耐热型）	产气肠杆菌、粪链球菌 (*Streptococcus faecalis*)、假单胞菌属

将标准菌株制成300～3 000个/mL的菌悬液，将菌悬液按接种（4.6.1）和培养（4.6.2）要求操作，阳性菌株应呈现阳性反应；阴性菌株呈现阴性反应，否则，该次样品测定结果无效，应重新测定。

注：可先制备较高浓度菌悬液，采用血球计数器在显微镜下对其浓度进行初步测定，再根据实际情况用无菌水(4.3.6)稀释至300 MPN/mL～3 000 MPN/mL。

4.7 结果计算与表示

微生物快速检测仪自动计算检测结果，结果以科学计数方法表示。

4.8 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，其检测所得结果全部经对数（以10为底）转换后进行以下分析。

4.8.1 精密度

6家实验室对粪大肠菌群有证标准样品（7 620 MPN/L）进行测定：

实验室内相对标准偏差为1.92 %～4.77 %，实验室间相对标准偏差为3.98 %，重复性限为0.32，再现性限为0.52。

6家实验室对3个不同浓度实际样品（浓度为10^7 MPN/L、10^5 MPN/L、10^3 MPN/L）进行测定：

实验室内的相对标准偏差范围分别为：0.64 %～2.36 %、1.07 %～3.06 %、2.42 %～6.81 %，实验室间的相对标准偏差分别为：0.91 %、0.89 %、2.64 %，重复性限为0.34、0.35、0.49，再现性限为0.36、0.35、0.52。

4.8.2 准确度

6家实验室分别对有证标准菌株（所使用的标准菌株浓度为7 620 MPN/L）进行测定，相对误差为：-8.24 %～1.43 %，相对误差的最终值为：-3.56 %±7.82 %。

4.9 质量保证和质量控制

4.9.1 每批样品按对照试验（4.6.3）进行空白对照测定，定期使用有证标准菌株进行阳性、阴性对照试验。

4.9.2 每批次实验取待测水样数量的 10 %，做双样分析，检测结果以双样平均值计。

4.9.3 对每批次培养基应使用有证标准菌株进行培养基质量检验。

4.9.4 按有证标准菌株保存条件的要求，严格控制质量。

4.10 废弃物的处理

实验产生的废弃物经121 ℃高压蒸汽灭菌20 min后，作为一般废物处理。

5 荧光法

5.1 方法原理

一定量的水样与选择性培养基混合均匀放置于44.5 ℃环境下，粪大肠菌群产生β-半乳糖苷酶（β-D-galactosidase），并分解β-半乳糖苷释放出荧光。疏水的荧光产物聚合至光学检测区，通过光度计（波长：350 nm～650 nm）测定，依据荧光强度与水中粪大肠菌群数成一定关系的原理，从而得出粪大肠菌群浓度。

5.2 干扰和消除

按本标准4.2条进行。

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的分析纯试剂。

5.3.1 粪大肠菌群检测试剂主要成分：

——聚合氨基酸 1.3 g；

——氯化钠 0.34 g；

——磷酸盐 0.36 g。

制法：聚合氨基酸、氯化钠和磷酸盐，3种固体粉末至于容器中充分混匀，115 ℃高压灭菌20 min，贮存于4 ℃避光备用。

注：也可采用市售商品化培养基制品。

5.3.2 硫代硫酸钠（$Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$）。

5.3.3 乙二胺四乙酸二钠（$C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$）。

5.3.4 硫代硫酸钠溶液：同 4.3.4。

5.3.5 乙二胺四乙酸二钠（EDTA-Na_2）溶液：同 4.3.5。

5.3.6 无菌水：同 4.3.6。

5.4 仪器和设备

按本标准4.4条进行。

5.5 样品

5.5.1 样品采集

按本标准4.5.1进行。

5.5.2 样品保存

按本标准4.5.2进行。

5.6 分析步聚

5.6.1 接种

接种待测水样于装有2 g培养基的检测瓶中，定容至100 mL，水样与培养基应充分混匀。

5.6.2 培养

打开仪器电源开关，待仪器稳定30 min后，将接种后的检测瓶放置于微生物快速检测仪中，按照仪器说明书进行操作，设置检测温度为44.5 ℃，点击“检测”按钮，2～18小时，仪器自动培养得出结果。

5.6.3 对照试验

5.6.3.1 空白对照

采用无菌水（5.3.6）作为待测水样按照步骤5.6.1～5.6.2进行空白测定，测试结果不得检出，否则该次样品测定结果无效，应重新测定空白以及待测样品。

5.6.3.2 阴性及阳性对照

按本标准4.6.3.2进行。

5.7 结果计算与表示

微生物快速检测仪自动计算检测结果，结果以科学计数方法表示，保留三位有效数字。

5.8 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，其检测所得结果全部经对数（以10为底）转换后进行以下分析。

5.8.1 精密度

6家实验室对粪大肠菌群有证标准样品（6 530 MPN/L）进行测定：

实验室内相对标准偏差为2.32 %～4.15 %，实验室间相对标准偏差为1.84 %，重复性限为0.36，再现性限为0.38。

6家实验室对3个不同浓度实际样品（浓度为10^7 MPN/L、10^5 MPN/L、10^3 MPN/L）进行测定：

实验室内的相对标准偏差范围分别为：1.30 %～3.93 %、1.94 %～4.72 %、1.88 %～4.54 %，实验室间的相对标准偏差分别为：1.14 %、1.59 %、1.72 %，重复性限为0.55、0.51、0.35，再现性限为0.56、0.53、0.36。

5.8.2 准确度

6家实验室分别对有证标准菌株（所使用的标准菌株浓度为6 530 MPN/L）进行测定，相对误差为：-2.75 %～1.71 %，相对误差的最终值为：-0.48 %±3.68 % 。

5.9 质量保证和质量控制

5.9.1 每批样品按对照试验（5.6.3）进行空白对照测定，定期使用有证标准菌株进行阳性、阴性对照试验。

5.9.2 每批次实验取待测水样数量的 10 %，做双样分析，检测结果以双样平均值计。

5.9.3 对每批次培养基应使用有证标准菌株进行培养基质量检验。

5.9.4 按有证标准菌株保存条件的要求，严格控制质量。

5.10 废弃物的处理

按本标准4.10进行。