

附件3

《水质 总大肠菌群、粪大肠菌群和大肠埃希氏菌的
测定 酶底物法（征求意见稿）》

编制说明

《水质 总大肠菌群、粪大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定
酶底物法》标准编制组

二〇一七年八月

项目名称：水质 总大肠菌群、粪大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定
酶底物法

项目统一编号：2011-10

承担单位：上海市环境监测中心

编制组主要成员：汤琳、李备军、龚海燕、汪琴、吴阿娜、朱梦杰、
朱刚、怀红燕、刘丹青

标准所技术管理负责人：张虞

监测司项目管理负责人：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	标准制修订的必要性分析.....	3
2.1	环境监测意义.....	3
2.2	相关环保标准和环境工作的需要.....	5
3	国内外相关分析方法研究.....	7
3.1	主要国家、地区及国际组织相关分析方法研究.....	7
3.2	国内相关分析方法研究.....	8
3.3	酶底物法方法研究.....	9
4	标准制修订的基本原则和技术路线.....	10
4.1	标准制订的基本原则.....	10
4.2	标准制定的技术路线.....	11
5	方法研究报告.....	12
5.1	方法研究目标.....	12
5.2	术语和定义.....	24
5.3	方法原理.....	27
5.4	试剂和材料.....	27
5.5	仪器和设备.....	29
5.6	样品.....	29
5.7	分析步骤.....	31
5.8	结果计算与表示.....	42
5.9	质量保证和质量控制.....	43
5.10	废物处理.....	43
6	方法验证.....	43
6.1	方法验证方案.....	43
6.2	方法验证过程.....	45
7	专家函审及修改.....	46
8	与开题报告的差异说明.....	55
9	参考文献.....	55
附 1	59
1	原始数据.....	60
1.1	实验室基本情况.....	60
1.2	方法精密度的测试数据.....	61
1.3	方法准确度的测试数据.....	68
2	方法验证数据汇总.....	69

2.1	方法精密度数据汇总.....	69
2.2	方法准确度数据汇总.....	72
3	方法验证结论.....	73
3.1	精密度.....	73
3.2	准确度.....	73

《水质 总大肠菌群、粪大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定 酶底物法》编制说明

1 项目背景

1.1 任务来源

为进一步完善国家环境保护标准体系，根据环境保护部公布的《2011年度国家环境保护标准制修订项目计划》，科技标准司于2011年5月下达了关于制订《水质 粪大肠菌群的测定 酶底物法》标准编制修订课题项目，项目统一编号为：2011-10。

本标准制修订的承担单位为上海市环境监测中心。

1.2 工作过程

(1) 成立标准编制组

任务下达后，上海市环境监测中心作为承担单位成立了标准编制组，成员以多年从事生物监测工作的人员为主。

(2) 相关标准和文献资料调研

比较研究国内外总大肠菌群、粪大肠菌群和大肠埃希氏菌的检测方法，剖析国内水环境中总大肠菌群、粪大肠菌群和大肠埃希氏菌的检测技术特点、存在问题。同时，结合今后微生物检测的发展趋势及相关法律、法规和政策，提出了本标准制订的必要性，完成标准开题论证报告和标准草案的编写。

(3) 召开研讨会，研究建立标准方法，开展方法研究

按照标准制定要求，参考相关标准和资料，召开研讨会，就标准编制的重点、难点进行讨论，最终确立研究方案。于2011年~2014年开展了标准方法研究试验和适用性试验。

(4) 组织专家论证，确定标准制定的技术路线和原则

于2014年4月7日召开开题论证会，顺利通过标准开题论证报告和标准草案。结合专家提出的修改建议“将标准名称改为《水质 总大肠菌群、粪（耐热）大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定 酶底物法》；将适用范围确定为“地表水、地下水、废水”，增加方法检出限；充实质量保证和质量控制内容；研究过程中，针对不同类型的水体，比较国内外培养基的检测结果；6家实验室方法验证中，水样涵盖水源水、地表水、废水和有证标准物质”确定标准制定的技术路线和原则，进行标准后续完善和论证。

(5) 落实专家意见，深入开展方法试验研究

2014年5月~2015年6月,根据开题论证意见,标准编制组按照《国家环境保护标准制修订工作管理办法》(国家环境保护总局2006年第41号)、《环境监测分析方法标准制修订技术导则》(HJ168-2010)等文件的要求,开展和增加《水质 总大肠菌群、粪(耐热)大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定 酶底物法》的相关试验;并准备实验室方法验证工作,着手编写《水质 总大肠菌群、粪(耐热)大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定 酶底物法》标准征求意见稿及方法验证方案。

(6) 方法验证工作

2014年12月~2015年6月,组织了6家有资质的实验室进行方法验证,于2015年6月收回所有的验证报告,随后进行了数据的汇总和整理分析工作,编制《水质 总大肠菌群、粪(耐热)大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定 酶底物法》验证报告。同时完善《水质 总大肠菌群、粪(耐热)大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定 酶底物法》标准征求意见稿并编写标准编制说明。

(7) 确定标准征求意见稿和编制说明

2015年11月,完成《水质 总大肠菌群、粪(耐热)大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定 酶底物法》的标准征求意见稿及编制说明的编写。

(8) 标准征求意见稿和编制说明函审

2015年11月~2016年3月,邀请两位专家对《水质 总大肠菌群、粪(耐热)大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定 酶底物法》的标准征求意见稿及编制说明进行函审,并收回函审意见。

(9) 落实专家函审意见,对标准征求意见稿和编制说明进行修改

2016年3月~2016年6月,针对两位专家提出的函审意见,逐条分析和修改,完善《水质 总大肠菌群、粪(耐热)大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定 酶底物法》的标准征求意见稿及编制说明。

(10) 提交标准征求意见稿和编制说明的审查稿并根据审查意见修改

2016年7月~2016年11月,向环境保护部环境监测司及环境保护部环境标准研究所提交《水质 总大肠菌群、粪(耐热)大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定 酶底物法》的标准征求意见稿及编制说明审查稿。根据专家审查意见,修改完善标准文本的征求意见稿和编制说明。

(11) 召开标准征求意见稿技术审查会并根据审查意见修改

根据环境保护部环境监测司要求,于2017年1月12日召开了《水质 总大肠菌群、粪

（耐热）大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定 酶底物法》国家环境保护标准征求意见稿技术审查会，审查专家提出了将标准名称改为《水质 总大肠菌群、粪大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定 酶底物法》，并对文本进行相应修改，在标准文本中增加不同水体的样品稀释度选择的参考等审查意见，编制组根据专家审查意见，修改完善标准文本的征求意见稿和编制说明。

2 标准制修订的必要性分析

2.1 环境监测意义

水体中有机物质的增加使水体微生物污染问题日趋严重。水体中微生物污染的主要来源是土壤以及人类、动物的排泄物，而排泄物因含有致病微生物（如沙门氏菌、志贺式菌、霍乱弧菌、副溶血弧菌等），会导致某些肠道传染病的传播，对水体的污染影响较大。实际工作中，由于无法对水体中各种可能存在的致病微生物进行检测，因此，一般选择有代表性的一种或一类微生物作为指示菌进行检测，进行水环境卫生安全评价，以此反映水体微生物污染情况。目前，总大肠菌群、粪大肠菌群和大肠埃希氏菌，作为卫生质量的重要指标，已被广泛应用于水质、食品卫生安全评价工作中。

（1）总大肠菌群

总大肠菌群，并非细菌学分类命名，而是卫生细菌领域的用语。它不代表某一个或某一属细菌，而指的是具有某些特性的一组与粪便污染有关的细菌。传统上意义，总大肠菌群是指一类在 37 °C 下 24 h 内发酵乳糖产酸产气、需氧及兼性厌氧的革兰氏阴性无芽孢杆菌，包括埃希氏菌属、柠檬酸菌属、克雷伯菌属、肠杆菌属等细菌。随着检测技术的发展，总大肠菌群的定义也随之变化，多管发酵法对总大肠菌群的定义指“一类在 37 °C 下 24 h 内发酵乳糖产酸产气、需氧及兼性厌氧革兰氏阴性无芽孢杆菌”；滤膜法对总大肠菌群的定义是“在添加乳糖的选择性培养基上 37 °C 培养 24 h，能形成特征性菌落的需氧和兼性厌氧的革兰氏阴性无芽孢杆菌”；酶底物法对总大肠菌群的定义为“在选择性培养基上能产生 β -半乳糖苷酶（ β -D-galactosidase）的细菌群组”。本标准依据酶底物法的原理，将总大肠菌群定义为：37 °C 培养 24 h，能产生 β -半乳糖苷酶（ β -D-galactosidase），分解选择性培养基中的邻硝基苯- β -D-吡喃半乳糖苷（ONPG）生成黄色的邻硝基苯酚的肠杆菌科细菌。

（2）粪大肠菌群

粪大肠菌群与总大肠菌群相同，也是卫生细菌领域的用语，主要包括埃希氏菌属和耐热克雷伯菌属。粪大肠菌群主要来源于人和动物的粪便，能较为贴切地反映水体受粪便污染的程度。北美国家使用“粪大肠菌群”概念，AOAC、FDA、SN、AOAC 将粪大肠菌群定义为“于 LST 中 36 °C 培养 48 h 内产气，并于 EC 内 44 °C 培养 24 h 产气的一群细菌”；而欧

洲国家使用“耐热大肠菌群”概念，NMKL、ISO 中将耐热大肠菌群定义为“在 44.5 °C 培养，24 h 内能产酸产气的细菌”。

国内对粪大肠菌群、耐热大肠菌群的定义随标准、检测方法不同而变化。GB/T 5750.12-2006 中多管发酵法对耐热大肠菌群的定义为“用提高培养温度的方法将自然环境中的大肠菌群与粪便中的大肠菌群区分开，在 44.5 °C 仍能生长的大肠菌群”；滤膜法提到耐热大肠菌群为“在添加乳糖的选择性培养基上 44.5 °C 培养 24 h，能形成特征性菌落”的细菌。《水和废水监测分析方法》中对粪大肠菌群的命名为“总大肠菌群的一部分，主要来自粪便，在 44.5 °C 温度下能生长并发酵乳糖产酸产气的大肠菌群”。本标准中的粪大肠菌群，也称耐热大肠菌群，结合酶底物法的原理，以及通过提高培养温度至 44.5 °C 可将大肠菌群与粪大肠菌群区别开来的特点，将粪大肠菌群定义为“粪大肠菌群，又称耐热大肠菌群。44.5 °C 培养 24 h，能产生 β -半乳糖苷酶（ β -D-galactosidase），分解选择性培养基中的邻硝基苯- β -D-吡喃半乳糖苷（ONPG）生成黄色的邻硝基苯酚的肠杆菌科细菌。”

（3）大肠埃希氏菌（E. coli）

大肠埃希氏菌（E. coli），通常称为大肠杆菌，埃希氏菌属的模式种，是总大肠菌群、粪大肠菌群的主要种类。它于 1885 年由 Theodor Escherich 发现，主要附生在人或动物的肠道里，大多数是不致病的，为正常菌群，但当它侵入人体一些部位时，可引起感染，导致腹膜炎、胆囊炎、膀胱炎及腹泻等。此外，少数的大肠杆菌具有毒性，可引起疾病，如肠致病性大肠杆菌（EPEC）、肠产毒性大肠杆菌（ETEC）、肠侵袭性大肠杆菌（EIEC）、肠出血性大肠杆菌（EHEC）、肠黏附性大肠杆菌（EAEC）和弥散粘附性大肠杆菌（DAEC）。

大肠埃希氏菌的命名也随检测方法有所不同。多管发酵法定义为“多管发酵法总大肠菌群阳性，在含有荧光底物的培养基上 44.5 °C 培养 24 h 产生 β -半乳糖醛酸酶（ β -D-galactosidase），分解荧光底物释放出荧光产物，使培养基在紫外光下产生特征性荧光的细菌”；滤膜法定义为“总大肠菌群阳性的滤膜在含有荧光底物的培养基上培养，能产生 β -半乳糖醛酸酶分解荧光底物释放出荧光产物，使菌落能够在紫外光下产生特征性荧光”；酶底物法定义为“在选择性培养基上能产生 β -半乳糖苷酶（ β -D-galactosidase）分解色原底物释出色原体使培养基呈现颜色变化，并能产生 β -葡萄糖醛酸酶（ β -glucuronidase）分解荧光底物释放出荧光产物，使菌落能在紫外光下产生特征性荧光”。本标准中大肠埃希氏菌结合酶底物法的原理，定义为“又称大肠杆菌。37 °C 培养 24 h，能产生 β -半乳糖苷酶（ β -D-galactosidase），分解选择性培养基中的邻硝基苯- β -D-吡喃半乳糖苷（ONPG）生成黄

色的邻硝基苯酚，同时产生β-葡萄糖醛酸酶，分解选择性培养基中的4-甲基伞形酮-β-D-葡萄糖醛酸苷（MUG）释放出荧光物质（4-甲基伞形酮）的肠杆菌科细菌。”

2.2 相关环保标准和环境工作的需要

目前，总大肠菌群、粪大肠菌群、大肠埃希氏菌是世界各国环境管理中最具代表性的卫生学指标，美国、法国、德国、意大利、英国、俄罗斯及欧盟等将总大肠菌群、粪大肠菌群（耐热大肠菌群）、大肠埃希氏菌作为基本的微生物学指标进行应用。1983年，世界卫生组织《饮用水水质标准》（第一版）中就规定：所有用于饮用的水中，大肠杆菌或粪大肠菌群在任意100 ml水样中不得检出。

国内标准如《生活饮用水卫生标准》（GB 5749-2006）、《海水水质标准》（GB 3097-1997）、《农田灌溉水质标准》（GB 5084-2005）、《渔业水质标准》（GB 11607-1989）、《地下水质量标准》（GB/T 14848-1993）、《地表水环境质量标准》（GB 3838-2002）等对总大肠菌群、粪大肠菌群、大肠埃希氏菌的限值做了明确规定。

此外，总大肠菌群和粪大肠菌群也是我国控制水污染物排放的重要指标，现行的《医疗机构水污染物排放标准》（GB 18466-2005）、《生活垃圾填埋场污染控制标准》（GB 16889-2008）、《畜禽养殖业污染物排放标准》（GB 18596-2001）、《生物工程类制药工业水污染物排放标准》（GB 21907-2008）、《城镇污水处理厂污染物排放标准》（GB 18918-2002）、《肉类加工工业水污染物排放标准》（GB 13457-1992）等排放标准规定了总大肠菌群或粪大肠菌群的排放限值。

由表1可见，大肠菌群是我国环境污染物排放标准的重要指标，不管是环境质量标准，还是污染物排放标准都对其作了相应的浓度限值规定。综合分析这些标准，其中大肠菌群的监测方法主要为多管发酵法和滤膜法，只有在《生活饮用水卫生标准》（GB/T 5750.12-2006）中提到了酶底物法，但是该法只适用于水源水和生活饮用水中总大肠菌群和大肠埃希氏菌的检测。

表1 环境质量标准与污染物排放（控制）标准监测方法

标准类型	标准名称	排放限值	监测方法
环境质量标准	《生活饮用水卫生标准》（GB/T 5750.12-2006）	总大肠菌群不得检出	多管发酵法、滤膜法、酶底物法
		耐热大肠菌群不得检出	多管发酵法
		大肠埃希氏菌不得检出	多管发酵法、滤膜法、酶底物法

标准类型	标准名称	排放限值	监测方法
	地表水环境质量标准 (GB 3838-2002)	粪大肠菌群的限值为: I类 200 个/L; II类,2000 个/L; III类,10000 个/L; IV类,20000 个/L; V类,40000 个/L	多管发酵法、滤膜法
	《地下水质量标准》 (GB/T 14848-1993)	总大肠菌群的限值为: I、II和III类 3.0 个/L; IV类为 100 个/L	多管发酵法、滤膜法
	《海水水质标准》 (GB 3097-1997)	总大肠菌群限值: I类、II类和III类 10000 个/L; 粪大肠菌群限值: 2000 个/L	发酵法、滤膜法
	《农田灌溉水质标准》 (GB 5084-2005)	粪大肠菌群限值: 水作、旱作 40000 个/L, 蔬菜 10000~20000 个/L	多管发酵法
	《渔业水质标准》 (GB 11607-1989)	总大肠菌群限值: 5000 个/L;	多管发酵法、滤膜法
污染物排放标准	《医疗机构水污染物排放标准》 (GB 18466-2005)	传染病、结核病医疗机构粪大肠菌群排放 限值: 100 MPN/L	多管发酵法
		综合医疗机构和其他医疗机构粪大肠菌群 排放限值: 500 MPN/L	
		医疗机构污泥粪大肠菌群控制限值: 100 MPN/g	
	《生活垃圾填埋场污 染控制标准》 (GB 16889-2008)	粪大肠菌群排放限值: 10000 个/L	多管发酵法、滤膜法
	《畜禽养殖业污染物 排放标准》 (GB 18596-2001)	集约化畜禽养殖业粪大肠菌群排放限值: 1000 个/100 ml	多管发酵法
		畜禽养殖业废渣无害化粪大肠菌群排放限 值: 100000 个/kg	
	《生物工程类制药工 业水污染物排放标准》 (GB 21907-2008)	粪大肠菌群排放限值: 500 MPN/L	多管发酵、滤膜法
		粪大肠菌群特别排放限值: 100 MPN/L	
	《城镇污水处理厂污 染物排放标准》 (GB 18918-2002)	粪大肠菌群排放限值: 一级 A 1000 个/L, 一级 B 10000 个/L, 二级 10000 个/L	多管发酵法
	《肉类加工工业水污 染物排放标准》 (GB 13457-1992)	1989 年 1 月 1 日之前建设项目及建成后投 产的企业大肠菌群排放限值: 一级 5000 个/L	发酵法
1989 年 1 月 1 日至 1992 年 6 月 30 日之 间建设项目及建成后投产的企业大肠菌群排 放限值: 一级 5000 个/L			
1992 年 7 月 1 日起建成后投产的企业大肠 菌群排放限值: 一级 5000 个/L, 二级 10000 个/L			

考虑到现行标准中多管发酵法和滤膜法检测周期长、程序繁琐的缺点，难以适应目前快速评价水体卫生的需要。而酶底物法根据酶原反应来检测，用最大可能数法进行结果计算，检出限低，准确度高；此外，操作简便，在全国拥有酶底物法相关设备的环境监测站达到百余家，因此在推广性和应用性上已经有了相当的基础和前景；适用于实验室监测和应急监测，可以在 24 小时内快速评价水体卫生情况，可以大大提高时效性。故本标准的制订，在一定程度上满足了当前环境管理对时效性的迫切需求。一方面增加了大肠菌群的酶底物法监测方法，另一方面完善和优化了已有的总大肠菌群、大肠埃希氏菌的酶底物方法，并将适用范围从生活饮用水扩大到地表水、地下水、废水。本标准的制定，对于实时、准确、快速地监控各类水体的污染状况，评价其卫生状况，有效预报和控制流行疾病的发生和传播有及其重要的现实意义。

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

1895 年，T.Smith 首先提出用大肠杆菌作为饮用水被粪便污染的指示菌，这标志着大肠杆菌作为水的致病菌指标的开始；上世纪 70 年代，欧美开始使用总大肠菌群（Total coliform）作为饮用水安全的指标；随后，研究发现总大肠菌群不足以指示人或动物粪便污染，WHO、US、EPA、EU 选用大肠埃希氏菌作为水体污染的指标进行监控。100 多年来，欧美各国始终用大肠菌群作为水环境检测指标，作为衡量水环境被粪便污染的指标，具有科学的卫生学意义。

经调研，国外大肠菌群的检测方法主要为多管发酵法、滤膜法、酶底物法。其中采用多管发酵法标准有：美国 EPA 1681-2006《城市污泥（生物污泥）中粪大肠菌群的多管发酵法 A-1 培养基》、加拿大 MFHPB-19《食品中大肠菌群、大肠杆菌、粪大肠菌群的 MPN 法检测》、AOAC 978.23-1979《贝类养殖水体中粪大肠菌群的检测 A-1 培养基》、美国《Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater》22 版 9221 部分；采用滤膜法标准有：AOAC 983.25-1985《食品中总大肠菌群、粪大肠菌群、大肠杆菌的疏水性网膜过滤检测法》、加拿大 MFHPB-55《食品中粪大肠菌群的疏水性网膜过滤检测法》、美国《Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater》22 版 9222 部分等。

采用酶底物法标准有：美国《Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater》22 版 9223 部分、ISO 9308-2:2012《Water quality — Enumeration of Escherichia coli and Coliform bacteria — Part 2: Most probable number method》，主要涉及总大肠菌群和大肠埃希氏菌的检测。目前，酶底物技术已经在阿根廷、澳大利亚、巴西、加拿大、智利、

哥伦比亚、日本、墨西哥、马来西亚、新西兰、新加坡、台湾、澳门、英国、美国、爱尔兰、冰岛、南非、巴拿马、挪威、韩国、德国、捷克等国家及地方政府实验室获得认可并使用，而且得到世界各组织机构如 APHA、AWWA、WEF、AOAC、IBWA、EBWA、WHO 的认可使用。

3.2 国内相关分析方法研究

目前，我国现有的环境标准分析方法体系中，大肠菌群的主要检测方法为多管发酵法和滤膜法（见表 2），2006 年开始出现了酶底物法的应用。

表 2 标准分析体系中大肠菌群检测方法汇总

标准	方法
《水和废水监测分析方法》第四版（2002 年）	多管发酵法、滤膜法
《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）	多管发酵法和滤膜法
《进出口食品中大肠菌群、粪大肠菌群和大肠杆菌检验方法》（SN 0169-2010）	多管发酵法
《化妆品微生物标准检验方法-粪大肠菌群》（GB7918.3-1987）	多管发酵法
《水质 粪大肠菌群的测定——多管发酵法》（SL 355-2006）	多管发酵法
《食品卫生微生物学检验 粪大肠菌群计数》（GB/T 4789.39-2008）	多管发酵法
《医疗机构水污染物排放标准》（GB18466-2005）	多管发酵法
《进出口饮料中菌落总数、大肠菌群、粪大肠菌群、大肠杆菌计数方法 疏水栅格滤膜法》（SN/T 1607-2005）	滤膜法
《生活饮用水标准检验方法 微生物指标》（GB/T 5750.12-2006）	多管发酵法、滤膜法、酶底物法
《畜禽饮用水中总大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定 酶底物法》（Y/T 1665-2008）	酶底物法
《出口食品中大肠菌群、粪大肠菌群和大肠杆菌检验方法》（SN 0169-92）	多管发酵法、固体培养基测定法

《生活饮用水标准》（GB/T 5750.12-2006）成为我国第一个把酶底物法列入国家标准的标准，该标准中酶底物法主要用于生活饮用水和水源水中总大肠菌群和大肠埃希氏菌的检测。随后《畜禽饮用水中总大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定 酶底物法》（NY/T 1665-2008）中也提出酶底物法检测总大肠菌群和大肠埃希氏菌。如今，国内一些公司利用酶底物法简便、快速的检测特点，甚至自主研发出微生物-大肠菌群自动监测仪器，结合光、机电技术，通过精密的光度检测及特定算法处理，得出水样中大肠菌群的浓度。通过自动加样、数据实时传送，可以做到对各种水体、污染源进行实时监控，对今后水质微生物在线监测具有重要意义。

3.3 酶底物法方法研究

酶底物法，采用大肠菌群细菌能产生 β -半乳糖苷酶（ β -D-galactosidase）分解无色底物邻硝基苯- β -D-吡喃半乳糖苷 ONPG（Orthonitrophenyl- β -D-galactopyranoside）使培养液呈黄色，以及大肠埃希氏菌产生 β -葡萄糖醛酸酶（ β -glucuronidase）分解培养基中的4-甲基伞形酮- β -D-葡萄糖醛酸苷 MUG（4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide）使培养液在波长365~366 nm 紫外光下产生荧光，根据最大可能数法（MPN 法）来计算来水样中总大肠菌群、粪大肠菌群及大肠埃希氏菌的浓度。而多管发酵法，利用大肠菌群分解乳糖产酸产气等生理生化性状，再结合 MPN 法来计算水样中总大肠菌群、粪大肠菌群及大肠埃希氏菌的浓度。两种方法的结果计算方法一致，反应原理略有差异，酶底物法从酶反应进行判断，而多管发酵法则根据活性细菌的生化反应进行判断。国内外标准中对酶底物法的技术内容规定见表 3。

综合国内大肠菌群的检测方法比较（见表 4）发现，酶底物法可以选用成品培养基来进行试验，操作简便，检测时间短（24 小时），结果可靠，无需确认试验，并且该法已经被世界各国国家及地方实验室和世界各组织机构认可。此外，我国拥有酶底物法相关设备的各级环境监测站已超百余家（见图 1），表示本标准选取酶底物法进行大肠菌群的检测，在推广性和应用性上已经有了相当的基础。用该方法测定粪大肠菌群、总大肠菌群、大肠埃希氏菌，更适合我国国情。

表 3 国内外标准中酶底物法主要技术内容

标准名称	《Water quality - Enumeration of <i>Escherichia coli</i> and coliform bacteria - Part 2: Most probable number method》 (ISO 9308-2:2012)	《Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater》 22th	《生活饮用水卫生标准》 (GB/T 5750.12-2006)	《畜禽饮用水中总大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定 酶底物法》 Y/T 1665-2008
适用范围	所有类型的水	水和废水	生活饮用水及水源水	畜禽饮用水
监测指标	大肠埃希氏菌、总大肠菌群	大肠埃希氏菌、总大肠菌群	大肠埃希氏菌、总大肠菌群	大肠埃希氏菌、总大肠菌群
培养基	coliert 培养基	ONPG-MUG	MMO-MUG	MMO-MUG
使用管数	51 孔板、97 孔板	合适管数	51 孔板	51 孔板
培养温度	36±2 °C	35±0.5 °C	36±1 °C	36±1 °C
培养时间	18~22 h	18~24 h	24 h	24 h
结果判读	与比色盘对照，黄色的为大肠菌群阳性，黄色且有荧光的为大肠埃希氏菌阳性	黄色为总大肠菌群阳性，蓝色荧光为大肠埃希氏菌阳性	黄色为大肠菌群阳性，黄色且有蓝色荧光的为大肠埃希氏菌阳性	

表 4 粪大肠菌群各检测方法比较

检测方法	操作步骤	确认实验	检测时间	准确度	检测	推广度
发酵法	繁琐	需要	48-72 h	较准确	较便宜	易
滤膜法	繁琐	需要	48-72 h	较准确	较便宜	易
酶底物法	简易	不需要	24 h	准确	较贵	易

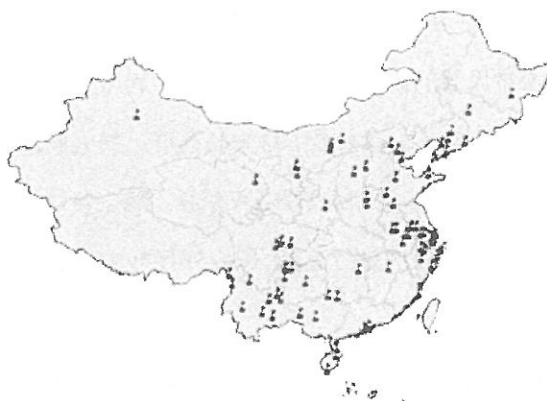


图 1 酶底物法在全国环境监测系统的应用现状

4 标准制修订的基本原则和技术路线

4.1 标准制订的基本原则

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)、《标准化工作导则 第一部分：标准的结构和编写》(GB/T 1.1-2009) 等文件的要求，以国内外标准及文献为基础而编制。本标准制定的主要原则是：

(1) 方法准确可靠，满足各项方法特性指标的要求；

新制定测定总大肠菌群、粪大肠菌群、大肠埃希氏菌的方法与现行方法相比，需具有较好的准确性和精密性。

(2) 方法的等效性，检出限和测定范围满足相关环保标准和环保工作的要求；

新制定的方法若在原理或结果计算上与现行标准方法一致，可以较好地实现方法的等效性。新制定的方法最好能适应不同水体中总大肠菌群、粪大肠菌群、大肠埃希氏菌测定，且方法检出限最好能低于或等同于现行标准方法，以更好地满足相关环保标准和环保工作的要求。

(3) 方法具有普遍适用性，易于推广使用。

新制定的测定总大肠菌群、粪大肠菌群、大肠埃希氏菌的方法需操作简便，在推广性和应用性上有相当的基础和前景，以便今后的推广使用。

4.2 标准制定的技术路线

酶底物法在我国应用较少，本标准的制定以《水质 大肠埃希氏菌和大肠菌群的检测》（ISO 9308-2:2012）和《生活饮用水卫生标准》（GB/T 5750.12-2006）中总大肠菌群酶底物法、大肠埃希氏菌酶底物法为基础，结合美国《Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater》（22 版）9223 部分、《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）、《生活饮用水标准检验方法 微生物指标》（GB/T 5750.12 -2006）、《水和废水监测分析方法》（第四版）、《海洋监测规范》等规范标准及本国实际情况，最终完成《水质 总大肠菌群、粪大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定 酶底物法》标准。

结合本国实际情况，引用、参考国内外现有相关标准以及相关实验研究来完成本标准方法的制定。方法技术上，选择 ISO 9308-2:2012《Water quality- Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria- Part 2: Most probable number method》中推荐的无菌、无抑制剂或氧化剂的水（去离子水或自来水）进行样品稀释；结合美国《Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater》（22 版）9223 部分、《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）、《生活饮用水标准检验方法 微生物指标》（GB/T 5750.12 -2006）、《水和废水监测分析方法》（第四版）、《海洋监测规范》等确定培养时间和温度，根据我国地表水环境质量状况进行定量盘的选择；通过实验研究探讨环境条件（常规环境和无菌室环境下）对酶底物法检测结果的影响，探讨不同来源的商品化培养基对检测结果的影响，探讨地表水、地下水、废水等不同水体的酶底物法适用性和准确性。

《水质 总大肠菌群、粪大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定 酶底物法》标准制定的技术路线，见图 2。

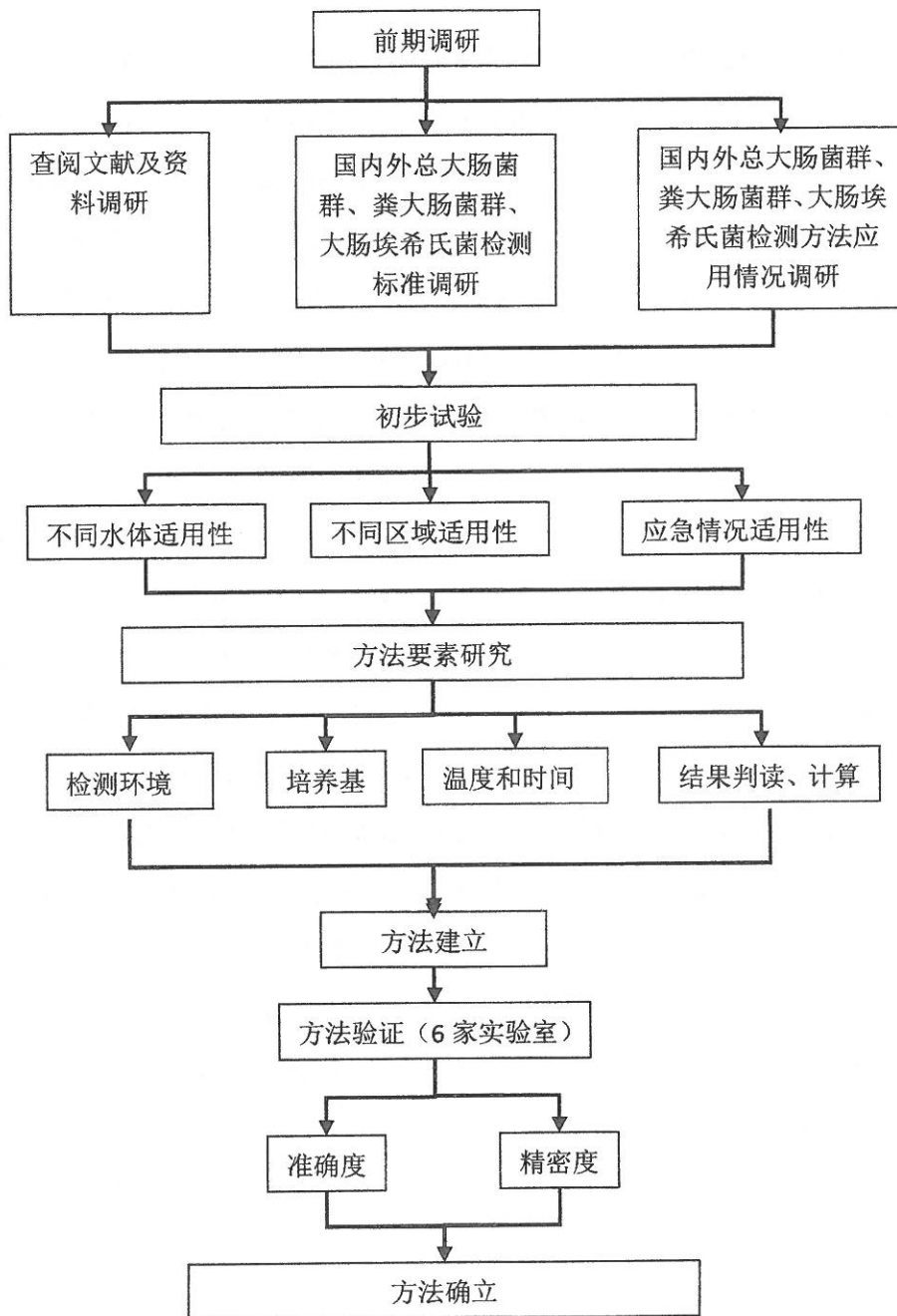


图2 酶底物法标准编制的技术路线图

5 方法研究报告

5.1 方法研究目标

本标准适用于地表水、地下水、废水中总大肠菌群、粪大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定。

通过方法研究和方法验证，确定酶底物法测定地表水、地下水、废水中总大肠菌群、粪大肠菌群和大肠埃希氏菌的可行性和适用性，建立简便、快速、准确的检测方法，并将方法

标准化以期应用。本标准的检测结果以最大可能数（most probable number，简称MPN）来计算表示，与经典的多管发酵法相同。本标准方法的检出限为10 MPN/L，为一个定值，与生活饮用水卫生标准（GB/T 5750.12-2006）中酶底物法的检出限相同。

本标准不适用于接种后颜色类似或深于标准阳性比色盘的水样（或稀释水样）。本标准运用酶原反应导致培养基产生颜色变化和荧光反应来检测总大肠菌群、粪大肠菌群和大肠埃希氏菌，若水体（或稀释水样）颜色类似或深于标准阳性比色盘，则会影响检测结果判读。

5.1.1 不同水体适用性研究

根据本标准的适用范围，选择地下水、地表水、废水三种实际水样进行酶底物法检测，同时进行多管发酵法的比对检测，对总大肠菌群、粪大肠菌群、大肠埃希氏菌三个指标进行检测。通过酶底物法与多管发酵法检测结果的比较，讨论方法的适用性。

（1）粪大肠菌群

用酶底物法和多管发酵法对 211 个地表水水样中粪大肠菌群进行比对检测，浓度范围在 $10^2 \sim 10^6$ MPN/L 之间。酶底物法按《水质 总大肠菌群、粪大肠菌群、大肠埃希氏菌 酶底物法》标准中的要求准备和测定。多管发酵法所用培养基、试剂和测定方法按照《水质 粪大肠菌群的测定 多管发酵法和滤膜法》（HJ/T 347-2007）中的要求准备和测定。结果如下图 3、4：

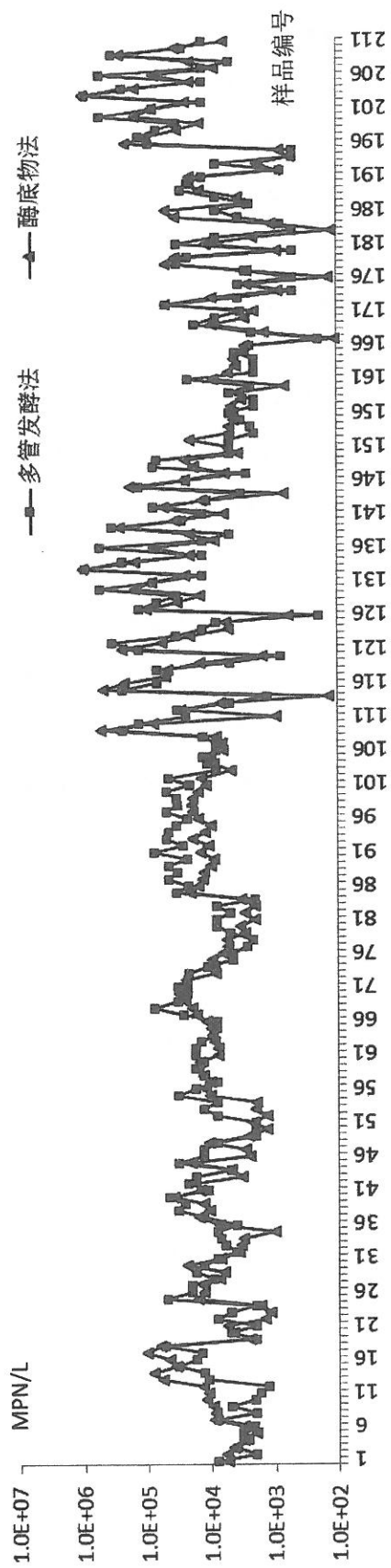


图3 酶底物法和多管发酵法检测地表水中粪大肠菌群的结果

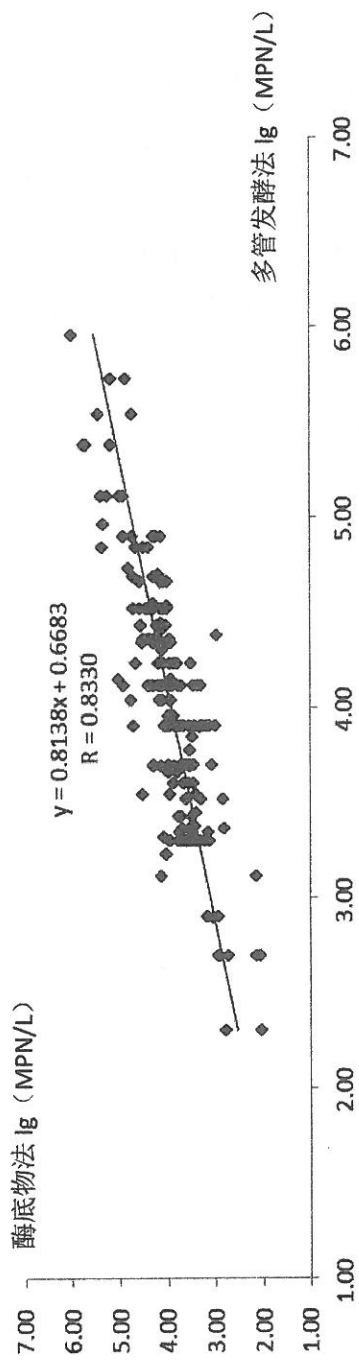


图4 酶底物法和多管发酵法检测地表水中粪大肠菌群结果的线性分析

用酶底物法和多管发酵法对 89 个浓度范围在 $10^3 \sim 10^9$ MPN/L 之间的废水样品进行对比检测。结果见图 5、图 6。

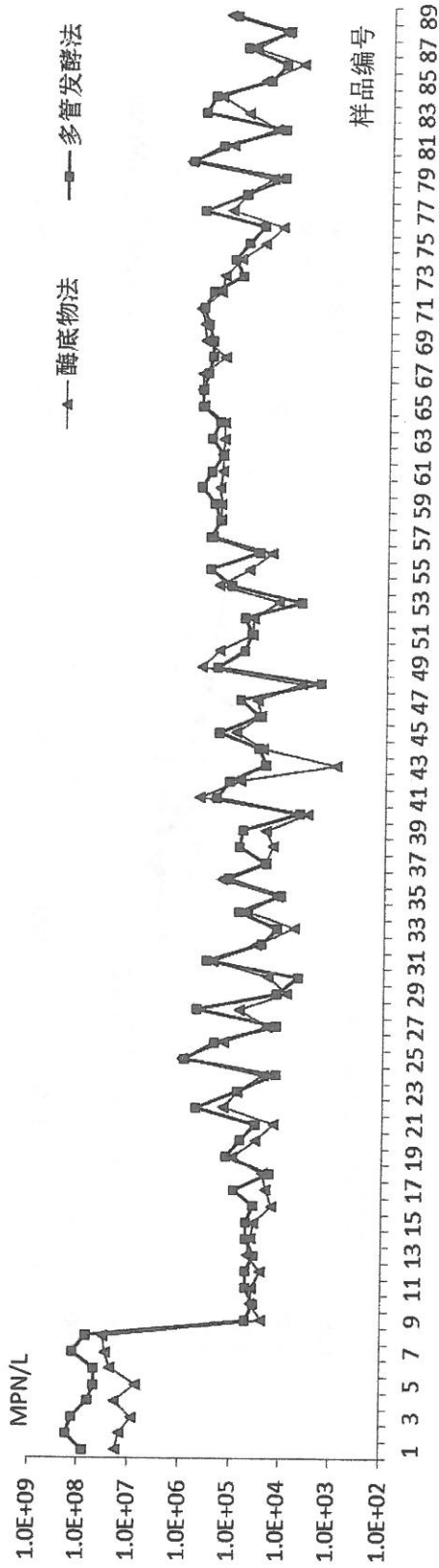


图 5 酶底物法和多管发酵法检测废水中粪大肠菌群的结果

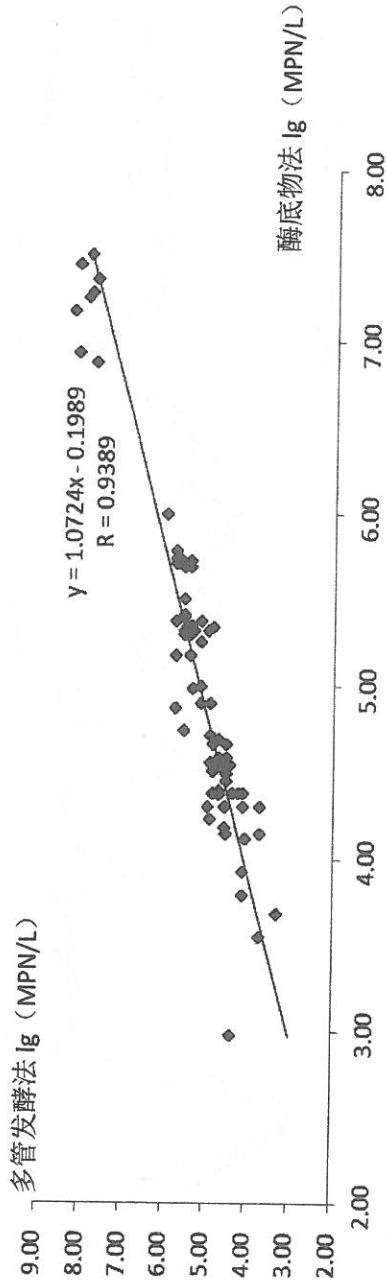


图 6 酶底物法和多管发酵法检测废水中粪大肠菌群的线性回归分析

用酶底物法和多管发酵法对 57 个浓度范围在 $10^0 \sim 10^5$ MPN/L 之间的地下水样品进行比对检测。结果见图 7、图 8。

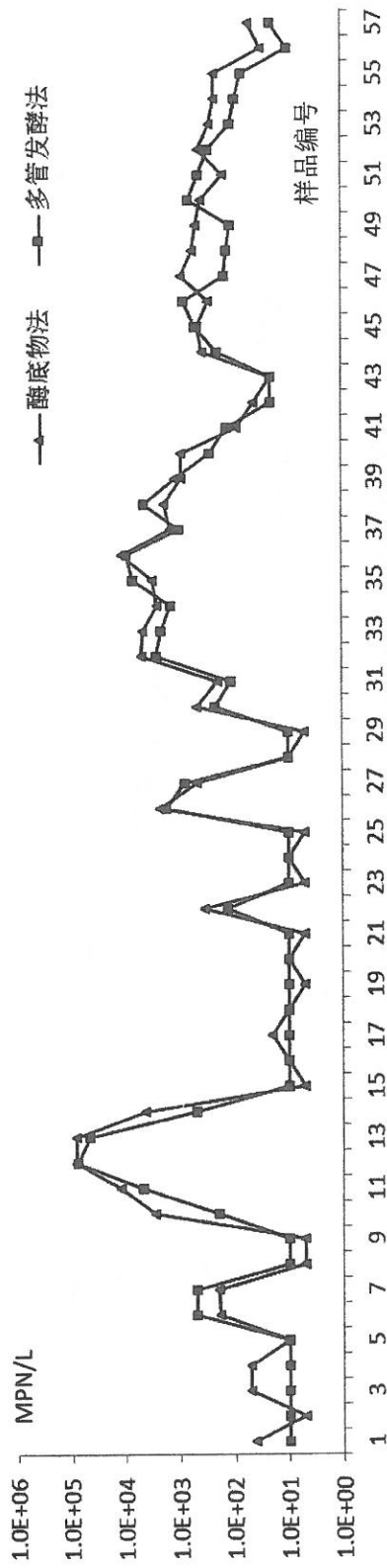


图 7 酶底物法和多管发酵法检测地下水中粪大肠菌群的结果

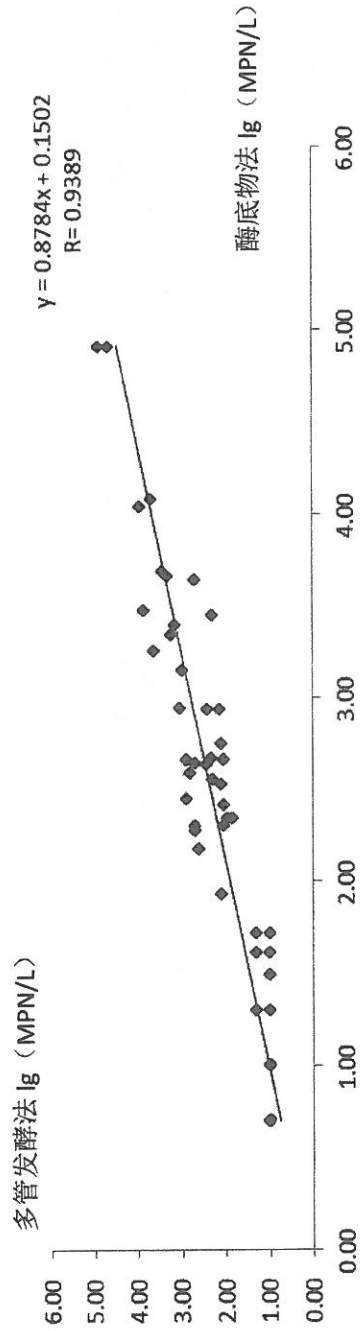


图 8 酶底物法和多管发酵法检测地下水中粪大肠菌群的线性回归分析

对检测结果进行线性回归分析（见图 4、图 6、图 8 和表 5）：酶底物法和多管发酵法检测地表水、废水、地下水中的粪大肠菌群数，标准化回归系数（Beta）分别达到 0.833、0.939、0.939，回归系数（B）分别为 0.853、0.822、1.004，回归系数 t 检验分别为 21.768、25.466、20.223，表明酶底物法与多管发酵法结果之间有显著的相关关系。

而对地表水、废水、地下水中粪大肠菌群酶底物法与多管发酵法 357 组测定结果进行配对 t 检验，用来检验两个方法所测定结果的差异性，统计结果表明（表 6）：粪大肠菌群酶底物法与多管发酵法的检测结果 P 值为 0.122，大于 0.05，两种方法无显著差异。

表 5 酶底物法和多管发酵法检测地下水和废水中粪大肠菌群的结果线性回归分析

	非标准化相关系数		标准化相关系数	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
(Constant) 变量 (地表水)	0.682	0.159	.833	4.295	0.000
	0.853	0.039		21.768	0.000
(Constant) 变量 (地下水)	0.113	0.117	.939	0.968	0.337
	1.004	.050		20.223	0.000
(Constant) 变量 (废水)	0.759	0.171	.939	4.436	0.000
	0.822	0.032		25.446	0.000

表 6 酶底物法和多管发酵法 t 检验结果

	成对差分					t	df	P值
	均值	标准差	均值的 标准误	差分的95%置信区间				
				下限	上限			
酶底物法和 多管发酵法	-0.0331	0.4026	0.0213	-0.0088	0.0750	1.551	356	0.122

综上所述，本次粪大肠菌群酶底物法适用性研究中，用酶底物法和多管发酵法两种检测方法，对不同来源（地表水、地下水、废水）的水质样品进行了粪大肠菌群测定。通过对测定结果的数理统计分析，发现酶底物法和多管发酵法在测定结果上趋势性良好，在测定值一致性、方法相关性等方面基本无显著差异。因此，认为“粪大肠菌群-酶底物法”可应用于地表水、地下水、废水中粪大肠菌群的检测。

(2) 总大肠菌群

用酶底物法和多管发酵法对 55 个浓度范围在 $10^2 \sim 10^8$ MPN/L 之间的实际水样（其中地表水 21 个，地下水 16 个，废水 18 个）中总大肠菌群进行比对检测。总大肠菌群酶底物

法按《水质 总大肠菌群、粪大肠菌群、大肠埃希氏菌 酶底物法》标准中的要求准备和测定。多管发酵法所用培养基、试剂和测定方法按照《水和废水监测分析方法》(第四版)中的要求准备和测定。结果如下图 9:

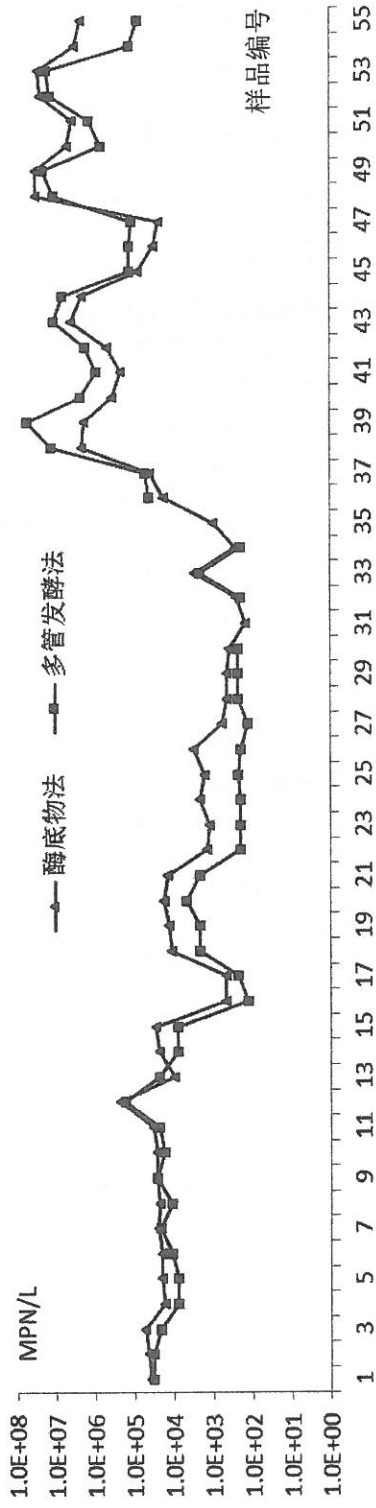


图 9 酶底物法和多管发酵法检测总大肠菌群的结果

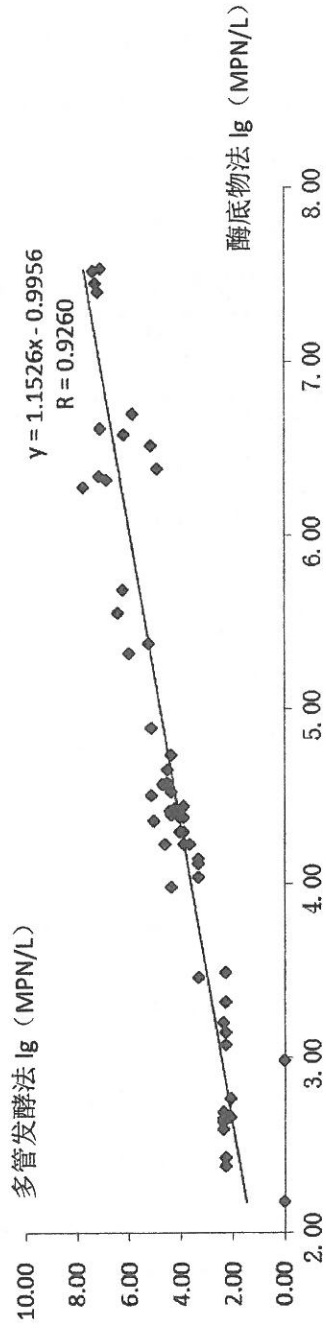


图 10 酶底物法和多管发酵法的线性回归分析

对两种方法检测总大肠菌群数的测定结果分别进行 t 检验（表 7）和线性回归分析（图 10 和表 8），结果表明：酶底物法和多管发酵法的 t 检验 $t=17.682$ ， $P=0.003<0.05$ ，两种方法具有显著差异；回归系数（B）为 0.745，标准化回归系数（Beta）为 0.925，相关性分析显示两种方法显著相关。

综合分析，本次总大肠菌群酶底物法方法适用性研究针对不同来源（地表水、地下水、废水）的水质样品进行了总大肠菌群测定，通过对测定结果的数理统计分析，发现酶底物法和多管发酵法在测定结果上趋势性良好，在测定值一致性、方法相关性等方面基本无显著差异。因此，认为总大肠菌群-酶底物法可应用于地表水、地下水、污水中总大肠菌群的检测。

表 7 酶底物法和多管发酵法 t 检验结果

	成对差分					t	df	P值
	均值	标准差	均值的 标准误	差分的95%置信区间				
				下限	上限			
酶底物法和多管发酵法	0.3109	0.72712	0.0980	0.1143	0.5075	3.171	54	0.003

表 8 酶底物法和多管发酵法检测总大肠菌群的结果线性回归分析

	非标准化相关系数		标准化相关系数	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
(Constant) 变量	1.390	0.194	0.925	7.167	0.000
	0.745	0.042		17.682	0.000

（3）大肠埃希氏菌

用酶底物法和多管发酵法对 61 个浓度范围在 $10^0\sim 10^7$ MPN/L 之间的实际水样（其中地表水 23 个，地下水 20 个，废水 18 个）中大肠埃希氏菌进行比对检测。大肠埃希氏菌酶底物法按《水质 总大肠菌群、粪大肠菌群、大肠埃希氏菌 酶底物法》标准中的要求准备和测定。多管发酵法所用培养基、试剂和测定方法按照《生活饮用水标准检验方法 微生物指标》（GB/T 5750.12-2006）中的要求准备和测定。

结果如下图 11：

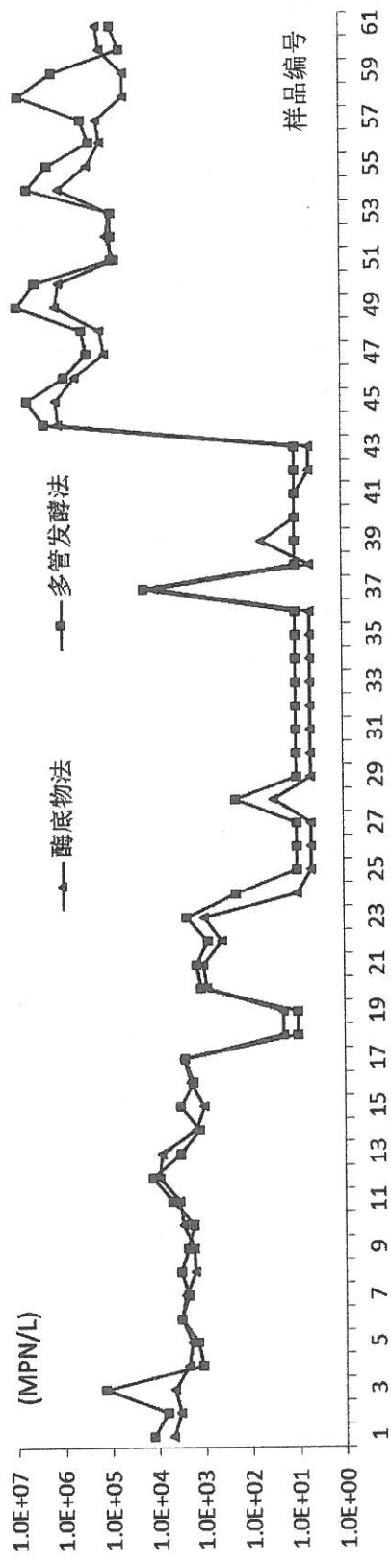


图 11 酶底物法和多管发酵法检测大肠埃希氏菌的结果

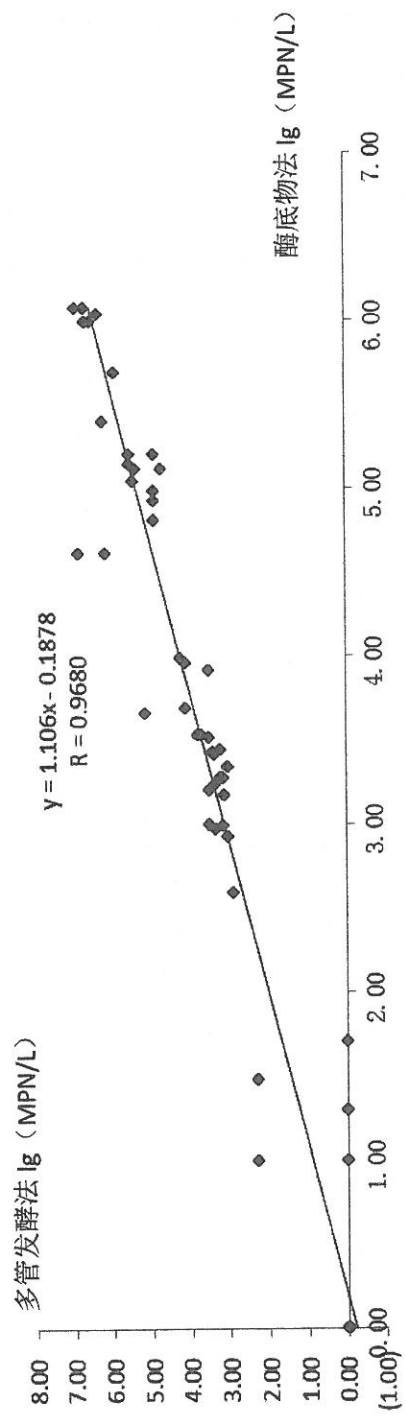


图 12 酶底物法和多管发酵法的线性回归分析

表 9 酶底物法和多管发酵法 t 检验结果

	成对差分					t	df	P值
	均值	标准差	均值的 标准误	差分的95%置信区间				
				下限	上限			
酶底物法 和多管发 酵法	-0.1180	0.6238	0.7987	-0.2778	0.04174	-1.478	60	0.145

从两种方法水样检测值的相互关系（图 12）和 t 检验分析（表 9），可以发现，两种方法的大肠埃希氏菌测定值相关性 R 值为 0.9680，相关性很好； $P=0.145 > 0.05$ ，无显著差异。

综合分析，本次大肠埃希氏菌酶底物法的适用性研究针对不同来源（地表水、地下水、废水）的水质样品进行了大肠埃希氏菌测定，通过对测定结果进行数理统计分析，发现酶底物法和多管发酵法在测定结果上趋势性良好，在测定值一致性、方法相关性等方面无显著差异。因此，认为大肠埃希氏菌-酶底物法可应用于地表水、地下水、污水中大肠埃希氏菌的检测。

5.1.2 新疆适用性研究

于 2012 年 8 月 8 日~15 日，对西部实验室（新疆环境监测总站、伊犁州环境监测站和奎屯市环境监测站）条件进行了调研，并对当地的水环境中的粪大肠菌群指标做了测定和比对。取 12 份各种类型的水样（低浓度样品 6 个，中浓度样品 5 个，高浓度样品 1 个），采用多管发酵法和酶底物法两种方法进行了粪大肠菌群的测定，来检验方法的适用性和差异性。其中酶底物法按《水质 总大肠菌群、粪大肠菌群、大肠埃希氏菌 酶底物法》标准中的要求准备和测定。多管发酵法所用培养基、试剂和测定方法按照《水质 粪大肠菌群的测定 多管发酵法和滤膜法》（HJ/T 347-2007）中的要求准备和测定。

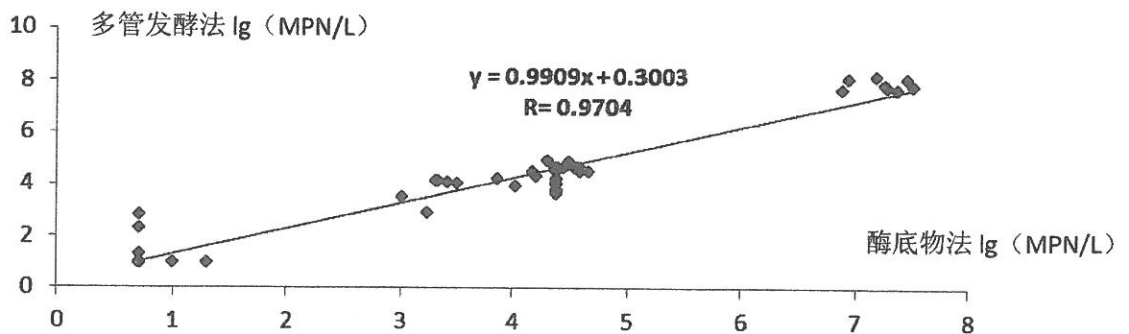


图 13 多管发酵法和酶底物法的线性回归分析

从图 13 中可以发现，酶底物法检测粪大肠菌群与多管发酵法检测结果的相关性 R 值高

达 0.97，相关性很好。故酶底物法在西部的适用性也十分良好。

5.1.3 酶底物法在应急监测上的应用

水样来源于受污染的地表水，按照 HJ 494 -2009 的规定采水样于灭菌采样瓶中，并低温保存送实验室分析。

粪大肠菌群酶底物法按《水质 总大肠菌群、粪大肠菌群、大肠埃希氏菌 酶底物法》标准中的要求准备和测定。多管发酵法所用培养基、试剂和测定方法按照《水质 粪大肠菌群的测定 多管发酵法和滤膜法》(HJ/T 347-2007) 中的要求准备和测定。

多管发酵法和酶底物法测定粪大肠菌群结果见图 14。

由图 15 可知，酶底物法和多管发酵法测定值间 R 为 0.8362，相关性较好。运用统计软件 SPSS17.0 软件对酶底物法和多管发酵法测得的 124 份粪大肠杆菌数据做配对 t 检验分析（表 10），结果可知，酶底物法和多管发酵法测定值 P 值为 $0.460 > 0.05$ ，即两种方法无显著性差异。因此，酶底物法用于环境中粪大肠杆菌群的检测，方法可行，结果可信。

表 10 酶底物法和多管发酵法 t 检验结果

	成对差分					t	df	P值
	均值	标准差	均值的 标准误	差分的95%置信区间				
				下限	上限			
酶底物法 和多管发 酵法	-0.0442	0.6638	0.05961	-0.16220	0.07379	-0.742	123	0.460

本研究初步认为，粪大肠菌群酶底物法在应急监测中，与多管发酵法具有较好相关性，数据可靠。因此，酶底物法快速、准确的特点，使其符合突发性环境应急监测中实时、快速、准确的要求，可以在环境应急事件中采用酶底物法进行粪大肠菌群检测。

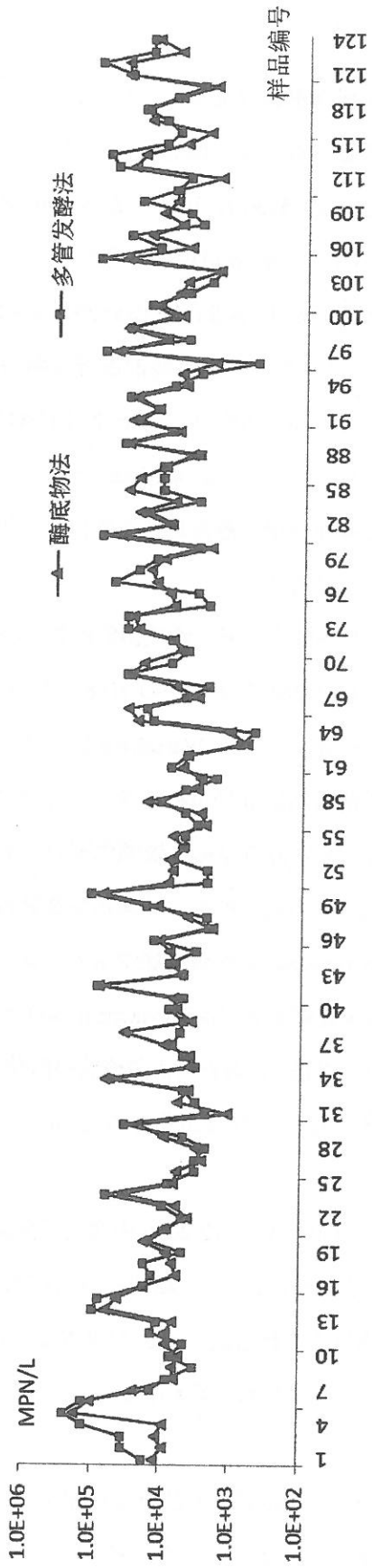


图14 酶底物法和多管发酵法测定粪大肠菌群结果 (MPN/L)

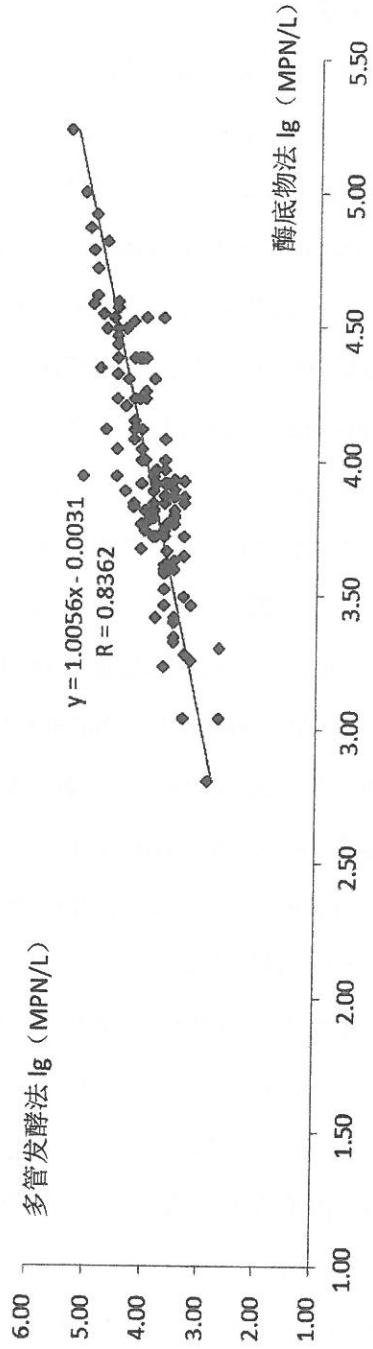


图 15 酶底物法和多管发酵法的线性回归分析

5.2 术语和定义

参考国内外标准对总大肠菌群、大肠埃希氏菌、粪大肠菌群的定义（表11），同时结合本标准方法的原理，进行本标准总大肠菌群、大肠埃希氏菌、粪大肠菌群的定义规定。

本标准中总大肠菌群定义中“37℃培养24h”参考GB/T 5750.12-2006中总大肠菌群的定义提到的“37℃培养24h”；“能产生β-半乳糖苷酶（β-D-galactosidase）的肠杆菌科细菌”，参考ISO 9308-2:2012、GB/T 5750.12-2006、《Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater》中总大肠菌群的定义提到的“能够产生β-半乳糖苷酶的肠杆菌科细菌”、“能产生β-半乳糖苷酶（β-D-galactosidase）”；“分解邻硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷（ONPG）生成黄色的邻硝基苯酚”，参考GB/T 5750.12-2006、《Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater》中提到的“分解色原底物释放出有色原体使培养基呈现颜色变化”、“使显色培养基释放出有色原体”，同时结合本方法采用的培养基，归纳后提出。

在本标准中大肠埃希氏菌定义中：参考GB/T 5750.12-2006中大肠埃希氏菌酶底物法检验步骤“36℃±1℃的培养箱内培养24h”，提出“37℃培养24h”；参考ISO 9308-2:2012、GB/T 5750.12-2006、《Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater》中大肠埃希氏菌定义提到的“能够产生β-半乳糖苷酶和β-葡萄糖醛酸酶的肠杆菌科细菌”，“能产生β-半乳糖苷酶（β-D-galactosidase）分解色原底物释放出有色原体使培养基呈现颜色变化，并能产生β-葡萄糖醛酸酶（β-glucuronidase）分解荧光底物释放出荧光产物，使菌落能在紫外光下产生特征性荧光”、“能产生β-葡萄糖醛酸酶（β-glucuronidase），使荧光底物培养基释放出荧光”，结合本法采用选择性培养基，提出“能产生β-半乳糖苷酶（β-D-galactosidase）分解邻硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷（ONPG）生成黄色的邻硝基苯酚，同时产生β-葡萄糖醛酸酶，分解选择性培养基中的4-甲基伞形酮-β-D-葡萄糖醛酸苷（MUG），释放出荧光物质（4-甲基伞形酮）的肠杆菌科细菌”。

本标准中粪大肠菌群定义中“44.5℃培养24h”参考GB/T 5750.12-2006中粪大肠菌群的定义提到的“在44.5℃仍能生长”；结合《水和废水监测分析方法》（第四版）中提到的“是总大肠菌群的一部分”，归纳为“粪大肠菌群，又称耐热大肠菌群。44.5℃培养24h，能产生β-半乳糖苷酶（β-D-galactosidase），分解选择性培养基中的邻硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷（ONPG）生成黄色的邻硝基苯酚的肠杆菌科细菌”。

此外，根据近30篇相关文献分析发现，β-半乳糖苷酶作为水解乳糖的重要代谢酶，在大肠菌群体内广泛存在，90%以上的大肠杆菌在生长过程中产生β-葡萄糖醛酸酶。再结合其

他生化反应（如吲哚试验）或者选择培养基，选择性抑制少数能产生 β -半乳糖苷酶或 β -葡萄糖醛酸酶的杂菌生长。可见，本标准结合酶原反应和选择培养基来综合定义总大肠菌群、粪大肠菌群、大肠埃希氏菌具有一定科学依据。

根据《水和废水监测分析方法》（第四版），最大可能数（MPN）most probable number 的定义为“根据统计学理论，估计水体中大肠杆菌密度和卫生质量的一种方法”；《食品微生物学检验 大肠菌群计数》（GB 47893-2010）中定义最可能数为“基于泊松分布的一种间接计数方法”；刘淑燕等在《最可能数的精确计算及其在食品微生物检验中的应用》中提到“最可能数（most probable number, MPN）计数又称稀释培养计数，是基于泊松分布的一种间接计数方法”、“它是概率理论与实验设计方法在微生物测定上的实际应用，适用于测定在混杂的微生物群落中虽不占优势，但却具有特殊生理功能的类群”；杨聚在发表的《细菌最可能数（MPN）的计算方法与程序》中提到：“细菌在水体中可以视为一个质点，由于受液体分子的碰撞而作不规则的热运动即布朗运动，可随机地出现在液体的任意部分，如果每份接种水样的大肠菌群细菌数平均为 m 个，每个乳糖管中接种进入 k 个细菌的概率 P 接近于泊松分布”；陆苏颺发表的《MPN 法原理与局限性分析》中“MPN 法（最大可能数法），这是一种应用概率理论来估算细菌浓度的方法”、“因为细菌在样本内的分布是随机的，所以检测细菌时，可按概率理论计算菌数”。

参考以上资料，定义本标准最大可能数（MPN）most probable number：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）。

表 11 大肠菌群定义比较汇总

来源	指标	定义
ISO9308-2: 2012	大肠菌群	能够产生 β -半乳糖苷酶的肠杆菌科细菌。
	大肠埃希氏菌	能够产生 β -半乳糖苷酶和 β -葡萄糖醛酸酶的肠杆菌科细菌。
	总大肠菌群	一群在37℃培养24 h能发酵乳糖、产酸产气、需氧和兼性厌氧的革兰氏阴性无芽孢杆菌。
GB/T 5750.12-2006	耐热大肠菌群	用提高培养温度的方法将自然环境中的大肠菌群与粪便中的大肠菌群区分开, 在44.5℃仍能生长的大肠菌群, 称为耐热大肠菌群。
	大肠埃希氏菌酶底物法	在选择性培养基上能产生 β -半乳糖苷酶 (β -D-galactosidase) 分解色原底物释放出色原体使培养基呈现颜色变化, 并能产生 β -葡萄糖醛酸酶 (β -glucuronidase) 分解荧光底物释放出荧光产物, 使菌落在紫外光下产生特征性荧光; 以此技术来检测水中大肠埃希氏菌的方法。
	总大肠菌群酶底物法	在选择性培养基上能产生 β -半乳糖苷酶 (β -D-galactosidase) 的细菌群组, 该细菌群组能分解色原底物释放出色原体使培养基呈现颜色变化, 以此技术来检测水中总大肠菌群的方法。
	总大肠菌群	那些能在37℃48 h之内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。主要包括埃希氏菌属、柠檬酸杆菌属、肠杆菌属、克雷伯氏菌属等菌属的细菌。
	粪大肠菌群	是总大肠菌群的一部分, 主要来自粪便。在44.5℃温度下能生长并发酵乳糖产酸产气的大肠菌群称为粪大肠菌群。
《Standard Methods for the Examination of Water and	总大肠菌群	能产生 β -半乳糖苷酶 (β -D-galactosidase), 使显色培养基释出色原体的细菌群组。
	大肠埃希氏菌	能产生 β -葡萄糖醛酸酶 (β -glucuronidase), 使荧光底物培养基释放出荧光的总大肠菌群。

来源	指标	定义
Wastewater		
本标准	总大肠菌群	37 °C 培养 24 h, 能产生β-半乳糖苷酶 (β-D-galactosidase), 分解选择性培养基中的邻硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷 (ONPG), 生成黄色的邻硝基苯酚的肠杆菌科细菌。
	大肠埃希氏菌	又称大肠杆菌。37 °C 培养 24 h, 能产生β-半乳糖苷酶 (β-D-galactosidase), 分解选择性培养基中的邻硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷 (ONPG) 生成黄色的邻硝基苯酚, 同时产生β-葡萄糖醛酸酶, 分解选择性培养基中的 4-甲基伞形酮-β-D-葡萄糖醛酸苷 (MUG) 释放出荧光物质 (4-甲基伞形酮) 的肠杆菌科细菌。
	粪大肠菌群	粪大肠菌群, 又称耐热大肠菌群。44.5 °C 培养 24 h, 能产生β-半乳糖苷酶 (β-D-galactosidase), 分解选择性培养基中的邻硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷 (ONPG) 生成黄色的邻硝基苯酚的肠杆菌科细菌。

5.3 方法原理

参考《畜禽饮用水中总大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定 酶底物法》(Y/T 1665-2008) 的方法原理及《应用 4-甲基伞形酮-β-D-半乳糖苷快速检测食品中的大肠菌群》等文献, 本标准酶底物法原理为: 在特定温度下培养特定的时间, 总大肠菌群、粪大肠菌群、大肠埃希氏菌能产生特定的β-半乳糖苷酶将选择性培养基中的无色底物邻硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷 (ONPG) 分解为邻硝基酚 (ONP), 呈黄色反应; 且大肠埃希氏菌同时又能产生β-葡萄糖醛酸酶将选择性培养基中的 4-甲基伞形酮-β-D-葡萄糖醛酸苷 (MUG) 分解为 4-甲基伞形酮, 在紫外灯照射下呈荧光反应。统计阳性反应出现数量, 查 MPN 表, 再除以接种样品的稀释度, 计算相应水体中总大肠菌群、粪大肠菌群、大肠埃希氏菌的浓度值。

5.4 试剂和材料

除非另有说明, 分析时均使用符合国家标准和分析纯试剂和蒸馏水, 实验用水为新制备的蒸馏水或去离子水, 实验用水规格应符合《分析实验用水和实验方法》(GB/T 6682) 的相关要求。

(1) 培养基

本法采用 MMO-MUG 培养基 (Minimal Medium ONPG-MUG 培养基), 具体成分参考《生活饮用水卫生标准》(GB/T 5750.12-2006) 中总大肠菌群酶底物法和大肠埃希氏菌酶底物法。即每 1000 ml MMO-MUG 培养基所含成份为

硫酸铵 [(NH ₄) ₂ SO ₄]	5.0 g
硫酸锰 (MnSO ₄)	0.5 mg
硫酸锌 (ZnSO ₄)	0.5 mg
硫酸镁 (MgSO ₄)	100 mg
氯化钠 (NaCl)	10 g
氯化钙 (CaCl ₂)	50 mg
亚硫酸钠 (Na ₂ SO ₃)	40 mg
两性霉素 B (Amphotericin B)	1 mg
邻硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷 (ONPG)	500 mg
4-甲基伞形酮-β-D-葡萄糖醛酸苷(MUG)	75 mg
茄属植物萃取物 (Solanium 萃取物)	500 mg
N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸钠盐(HEPES 钠盐)	5.3 g
N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸 (HEPES)	6.9 g

其中硫酸铵、硫酸锰、硫酸锌、硫酸镁、氯化钠、氯化钙、亚硫酸钠, 提供目标菌群生长需要的微量元素; 邻硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷和 4-甲基伞形酮-β-D-葡萄糖醛酸苷作为重要的特异性底物以筛选目标菌群; 两性霉素 B 和茄属植物萃取物作为抑制剂, 可以有效抑制真菌、霉菌等杂菌生长; N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸钠盐和 N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸作为离子缓冲剂, 可调节 pH 值范围在 4.5~10.5 之间的水体, 控制水样最终 pH 值范围在 7.0~7.6 之间。

参考联邦公报中对 MMO-MUG 培养基的配置建议, 考虑到培养基的质量控制, 建议采用市售商品化培养基制品。

(2) 硫代硫酸钠溶液 (0.10 g/ml): 称取硫代硫酸钠 10 g, 溶于适量实验用水, 定容至 100 ml, 临用现配。参考《水质 总大肠菌群和粪大肠菌群的测定 纸片法》HJ 755-2015。考虑到硫代硫酸钠 (CAS: 7772-98-7) 具有还原性, 可被空气氧化, 故硫代硫酸钠溶液是临用时配制。

(3) 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA-Na₂) 溶液 (0.15 g/ml): 称取 EDTA-Na₂ 15 g, 溶于适量实验用水, 定容至 100 ml, 此溶液保质期为 30 d。参考《水质 总大肠菌群和粪大肠菌群的测定 纸片法》(HJ 755-2015)。

(4) 无菌水: 实验用水应满足《分析实验用水规格和实验方法》(GB/T 6682-2008) 中三

级水的要求，经121 °C高压蒸汽灭菌20 min，备用。

5.5 仪器和设备

(1) 采样瓶：具螺旋帽或磨口塞500 ml广口玻璃瓶。

(2) 恒温培养箱或振荡培养箱：37±1 °C、44.5±0.5 °C。

(3) 高压蒸汽灭菌器：要求提供均匀的高达121 °C的高压蒸汽灭菌温度。

(4) 程控定量封口机：用于97孔定量盘的封口。

(5) 97孔定量盘：含49个大孔，48个小孔。48个小孔可容纳0.186 ml水样，49个大孔可容纳1.86 ml水样。考虑到环氧乙烷气体穿透力强、杀菌力强、杀菌谱广，可杀灭各种微生物包括细菌芽孢，相比于高压蒸汽灭菌，无需干燥过程，相比紫外灭菌，灭菌效果更彻底。故选择环氧乙烷灭菌为97孔定量盘的灭菌方式。

(6) 标准阳性比色盘。

(7) 紫外灯：365~366 nm。

根据US EPA 《Manual for the Certification of Laboratories Analyzing Drinking Water》

5.3.1.2.3内容：一些酶底物培养基可以在含波长为365~366 nm的紫外灯（6 w灯泡）照射下产生荧光物质；美国《Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater》22版9223部分、ISO 9308-2:2012 《Water quality — Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria — Part 2: Most probable number method》规定紫外灯（6 w灯泡）波长为365 nm；《生活饮用水标准》（GB/T 5750-2006）规定紫外灯波长为366 nm。此外，根据相关文献，4-甲基伞形酮在365~366 nm的紫外光下均有较好激发效应。综合以上，设定本标准紫外灯波长为365~366 nm。

(8) 天平：感量0.01 g。

(9) 移液管：1±0.01 ml、10±0.1 ml。也可采用量筒或计量合格的可调式移液器。

(10) 三角瓶：100 ml。

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

5.6 样品

5.6.1 样品的采集

样品的采集主要参考《水和废水监测分析方法》（第四版）的采样规定及要求。

本标准样品采集内容为：与其它项目一同采样时，先单独采集微生物样品，采样瓶不得

用水样洗涤。

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 10~15 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。此处采样体积根据美国《Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater》(22 版) 微生物检验部分的相关规定“为便于样品充分混合，水样采集体积应略小于采样瓶体积，120 ml 瓶采集水样 100 ml”以及《水和废水监测分析方法》(第四版) 水样采集和保存中规定：“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，以便在实验室检查时，能充分振摇混合样品，获得具有代表性的样品”。

从龙头装置采集样品时，不要选用漏水龙头，采水前将龙头打开至最大，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。采水时控制水流速度，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。

5.6.2 样品的保存

各种水体，特别是地表水、废水水样，易受物理、化学或生物的作用，从采水到检验的时间间隔内会很快发生变化。因此，当水样不能及时运到实验室，或运到实验室不能立即进行分析时，必须采取相关措施。

根据《水和废水监测分析方法》(第四版) 和 HJ 493 细菌类样品保存要求，采集好的水样应尽快运往实验室进行检验，采样后应 2 h 内检测。否则，应 10 °C 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，将样品放入 0~4 °C 冷藏，在 2 h 内检测。

5.6.3 干扰和消除

根据美国《Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater》(22 版) 微生物检验部分的相关规定，①100 ml 水样加入硫代硫酸钠溶液[$\rho(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)=0.10 \text{ g/ml}$] 0.1 ml 去除水样中余氯，以排除干扰；②100 ml 水样加入乙二胺四乙酸二钠(EDTA- Na_2)溶液[$\rho(\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O})=0.15 \text{ g/ml}$]0.3 ml 去除水样中重金属离子的干扰。

故本标准规定：如果采集的是经加氯处理或含有余氯的水样，在采样瓶灭菌前加入 0.4 ml 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，在采样瓶灭菌前加入 1.2 ml 乙二胺四乙酸二钠(EDTA- Na_2)溶液。加入干扰消除剂的采样瓶 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min，

采样瓶外壁及包扎纸干燥后可用于样品采集。此外，根据培养基 pH 缓冲成分，本方法适用于 pH 值范围在 4.5~10.5 的水体。

注 3:10 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。

5.7 分析步骤

5.7.1 水样稀释

地表水中，水源水和湖泊（水库）水样的参考接种量为 100 ml，河流水样的参考接种量为 100 ml、10 ml、1 ml；废水中，生活污水水样的参考接种量为 10 ml、1 ml、0.1 ml，处理前工业废水水样的参考接种量为 10 ml、1 ml、0.1 ml、0.01 ml，处理后工业废水水样的参考接种量为 100 ml；地下水水样的参考接种量为 100 ml；见表 12。

表 12 水样接种量参考表

水样类型		接种量 (ml)					
		100	10	1	0.1	0.01	
地表水	水源水	√					
	湖泊（水库）	√					
	河流	√	√	√			
废水	生活污水		√	√	√		
	工业废水	处理前		√	√	√	√
		处理后	√				
地下水		√					

根据水样污染程度确定稀释度，避免接种水样培养后 97 孔定量盘出现全部阳性或全部阴性。接种量小于 100 ml 时，取 10 ml 水样加入到盛有 90 ml 无菌水的三角瓶中混匀制成 1:10 稀释的样品，其他接种量的稀释样品依次类推。

注：参照《水和废水监测分析方法》（第四版）采用无菌水进行样品稀释，ISO 9308-2:2012《水质 大肠埃希氏菌和大肠菌群检测》中采用无菌的、无抑制剂或氧化剂的水（去离子水或自来水），而非 GB/T 5750.12-2006 使用的生理盐水来稀释样品。此外，根据《3 种方法测定水中粪便污染指示菌比较研究》，使用无菌纯水作为稀释介质时，多管发酵法、滤膜法和酶底物法的检测结果具有较好的一致性，优于使用生理盐水作为稀释介质，原因可能是使用生理盐水作为稀释介质时，其盐分会影响酶底物法的显色反应。

5.7.2 接种、培养

量取 100 ml 水样（或稀释样品）于三角瓶，加入 2.7±0.5 g 培养基，充分混匀，完全溶解后，全部倒入灭菌后的 97 孔定量盘内，以手抚平 97 孔定量盘背面，赶除孔内气泡，然后

用程控定量封口机封口。观察 97 孔定量盘颜色，若出现类似或深于标准阳性比色盘的颜色，则需排查水样、培养基、无菌水等一系列因素后，重新操作。因为水样或无菌水的 pH 超标、培养基变质都可能导致该结果。

测定总大肠菌群和大肠埃希氏菌时，将 97 孔定量盘放入 37 ± 1 °C 的培养箱中培养 24 h。测定粪大肠菌群时，将 97 孔定量盘放入 44.5 ± 1 °C 的培养箱中培养 24 h。

5.7.2.1 无菌操作环境条件必要性研究

以粪大肠菌群为例，对酶底物法的操作环境进行研究，比较常规环境和无菌室环境下操作对样品结果的影响，样品浓度范围在 $10^0\sim 10^6$ MPN/L 之间。酶底物法按《水质 总大肠菌群、粪大肠菌群、大肠埃希氏菌 酶底物法》标准中的要求准备和测定。

两种检测环境下，对酶底物法检测水样结果进行相互性分析（图 16、17）和 t 检验分析（表 13），结果表明，两种检测环境下，粪大肠菌群测定值 R 为 0.9565，相关性好； $P=0.146 > 0.05$ ，测定结果无显著差异。因此，环境条件（是否无菌环境）对酶底物法测定大肠菌群无明显影响，酶底物法可以在常规环境下进行。

表 13 酶底物法和多管发酵法 t 检验结果

	成对差分					t	df	P值
	均值	标准差	均值的 标准误	差分的95%置信区间				
				下限	上限			
多管发酵法和酶底物法	-0.0553	0.3496	0.0377	-1.3022	0.0196	-1.466	85	0.146

5.7.2.2 不同来源成品培养基检测效果研究

GB/T 5750.12-2006《生活饮用水标准检验方法》中总大肠菌群酶底物法和大肠埃希氏菌酶底物法和美国《Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater》（22 版）9223 酶底物法，选择 MMO-MUG 培养基作为检测培养基。

由于成品化的商用培养基来源不同，本研究以粪大肠菌群为例，用酶底物法对不同来源（美国科立德、西安立科）的成品培养基进行方法比较，酶底物法按《水质 总大肠菌群、粪大肠菌群、大肠埃希氏菌 酶底物法》标准中的要求准备和测定，探讨培养基对检测结果的影响，样品浓度范围在 $10^0\sim 10^8$ MPN/L 之间。

对不同培养基检测粪大肠菌群的测定结果（图 18）进行数理统计分析，用来检验两个方法所测定结果的差异性。统计结果表明（表 14）：不同培养基下水样测定值之间 $P=0.000$

<0.05 ，测定结果之间有差异；对两种培养基的检测结果进行线性回归分析（图 19 和表 15），检测值的回归系数（B）为 0.928，标准化回归系数 t 检验 $t=9.203$ ，认为不同培养基检测结果之间有显著的相关关系。

综合以上分析，不同的成品（商用）ONPG-MUG（MMO-MUG）培养基，对粪大肠菌群的检出具有较好相关性。因此，可以使用成品（商用）ONPG-MUG（MMO-MUG）培养基进行酶底物法的检测。

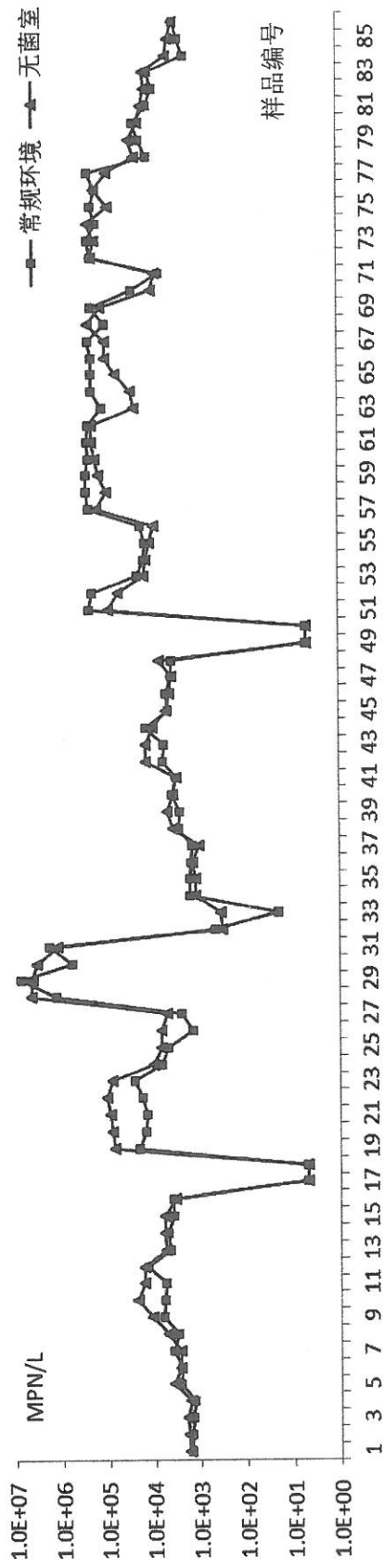


图 16 不同操作环境下酶底物法检测粪大肠菌群结果

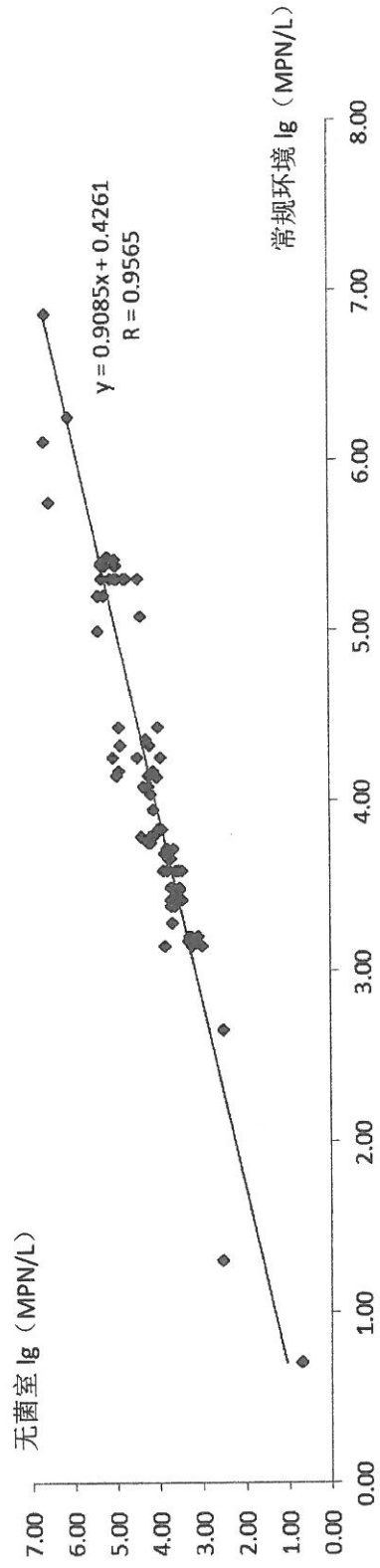


图 17 不同操作环境下酶底物法检测粪大肠菌群的线性分析

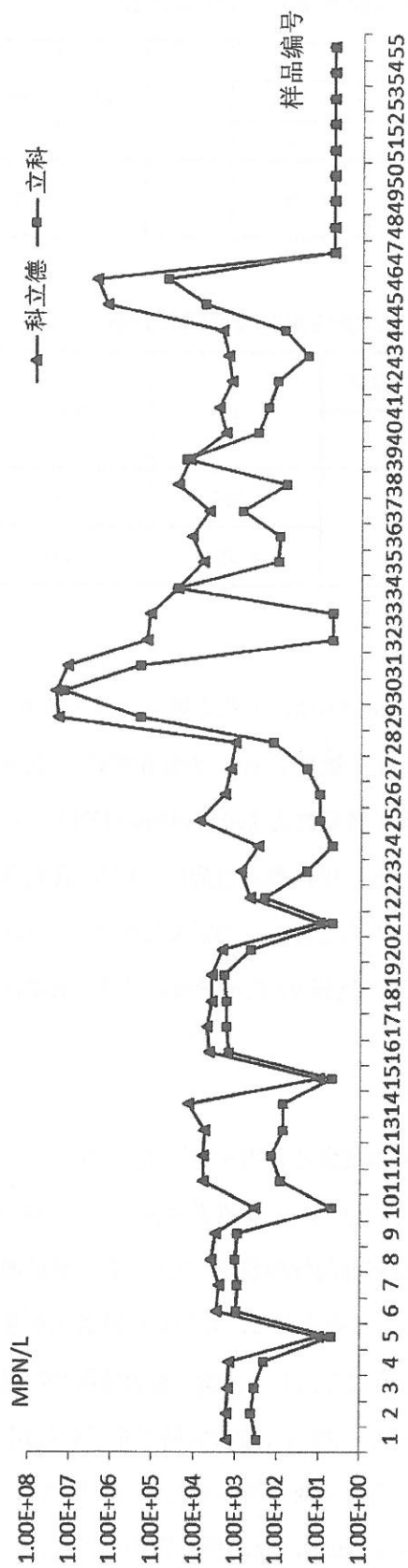


图 18 不同来源的成品培养基检测粪大肠菌群的结果

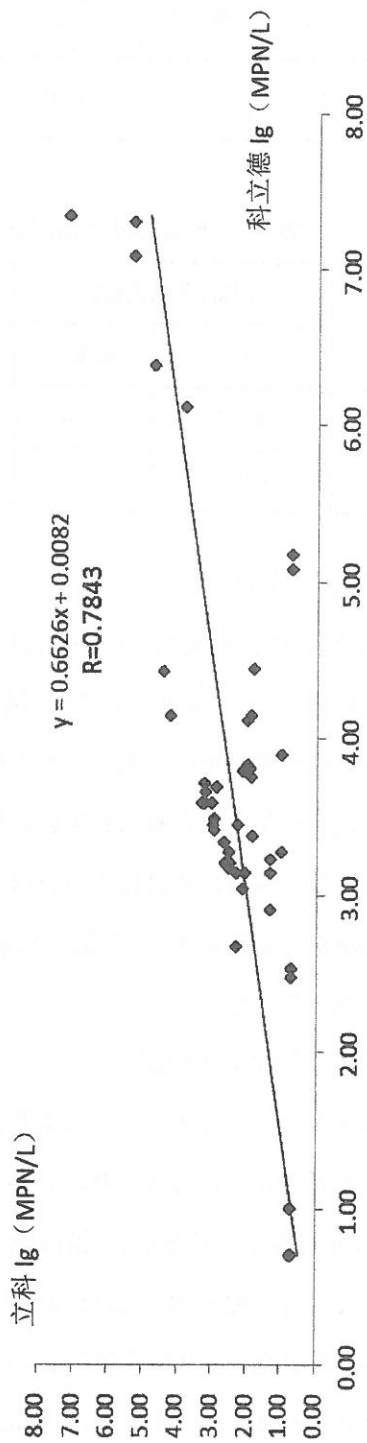


图 19 不同来源的成品培养基检测粪大肠菌群的线性分析

表 14 不同培养基检测水体中粪大肠菌群结果的 t 检验分析

	成对差分					t	df	P值
	均值	标准差	均值的 标准误	差分的95%置信区间				
				下限	上限			
科立德和 立科	1.0895	1.0602	0.1430	0.8028	1.3761	7.621	54	0.000

表 15 不同培养基检测水体中粪大肠菌群结果的线性回归分析

	非标准化相关系数		标准化相关系数	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
(Constant) 变量	1.245	0.261	0.784	4.764	0.000
	0.928	0.101		9.203	0.000

5.7.2.3 定量盘的选择

本标准选择 97 孔定量盘，而不是 GB/T 5750.12-2006 中的 51 孔定量盘，是因为 97 孔定量盘检出范围为 10~24190 MPN/L，远远大于 51 孔定量盘的 10~2005 MPN/L。此外，我国地表水环境质量标准中 I 类~IV 类水体中粪大肠菌群范围为 200~40000 MPN/L。由于本标准适用范围包括废水，故大肠菌群数值包括高浓度，以 IV 类水质为例，用 97 孔定量盘进行结果检测时，需对水样进行 10 倍稀释，若使用 51 孔定量盘，则需要进行 100 倍稀释，由此带来的稀释误差远远大于 97 孔定量盘。因此本标准选择 97 孔定量盘，有更广的检出范围，适用范围更为广泛。

5.7.2.4 培养温度和时间的选择

总大肠菌群、大肠埃希氏菌、粪大肠菌群的培养温度参考各类标准，见表 16。

总大肠菌群的培养温度参考 ISO 9308-2:2012 为 36±2 °C，温度范围涵盖 34 °C~38 °C，结合《水和废水监测分析方法》(第四版)中总大肠菌群的检测温度 37±1 °C，温度涵盖 36 °C~38 °C，在 ISO 9308-2:2012 规定的范围之内，故确定 37±1 °C 为本标准总大肠菌群的检测温度；最终选择 37±1 °C 测定总大肠菌群和大肠埃希氏菌；大肠埃希氏菌的培养温度参考 ISO 9308-2:2012 为 36±2 °C，温度范围涵盖 34 °C~38 °C，结合大肠埃希氏菌的定义，参考总大肠菌群的检测温度 37±1 °C，确定 37±1 °C 为本标准大肠埃希氏菌的检测温度；粪大肠菌群的培养温度参考 HJ/T 347-2007、GB/T 5750.12 -2006、《水和废水监测分析方法》(第四版)、《海洋监测规范》中粪大肠菌群的检测温度，均为 44.5±0.5 °C，故选择 44.5±0.5 °C

测定粪大肠菌群。培养时间参考表 16 标准，确定 24 h。

表 16 国内外检测标准及相关技术内容

监测项目	分析方法名称代号及来源	培养温度 (°C)	培养时间 (h)
总大肠菌群	多管发酵法 《水和废水监测分析方法》 (第四版) 第五篇第二章 (五) 国家环保总局 (2002)	37±1	24±2
	多管发酵法 生活饮用水标准检验方法 GB/T5750.12-2006 (2.2)	36±1	24±2
	酶底物法 生活饮用水标准检验方法 GB/T5750.12-2006 (2.3)	36±1	24
	酶底物法 《Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater》 (21th) 9223	35±0.5	18 或 24
	《Water quality -- Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria -- Part 2: Most probable number method》 ISO 9308-2:2012	36±2	18~22
	水质 总大肠菌群的测定 多管发酵法 DB 31/199-2009 附录 M	36±1	24±2
	本标准	37±1	24
粪大肠菌群(耐热大肠菌群)	水质 粪大肠菌群的测定 多管发酵法 HJ/T347-2007	44.5±0.5	24±2
	多管发酵法 生活饮用水标准检验方法 GB/T5750.12-2006 (3.1)	44.5±0.5	24±2
	多管发酵法 《水和废水监测分析方法》 (第四版) 第五篇第二章 (五) 国家环保总局 (2002)	44.5±0.5	24±2
	医疗机构水污染物排放标准 GB 18466-2005 附录 A	44	24
	海洋监测规范 第 7 部分: (粪大肠菌群 发酵法 近海污染生态调查和生物监测) (GB17378.7/9.1-2007)	44±0.5	24±2
	本标准	44.5±0.5	24
大肠埃希氏菌	酶底物法 《Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater》 (21th) 9223 (2005 年)	35±0.5	18 或 24
	《Water quality -- Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria -- Part 2: Most probable number method》 ISO 9308-2:2012	36±2	18~22
	酶底物法 生活饮用水标准检验方法 GB/T5750.12-2006(4.3)	36±1	24
	本标准	37±1	24

5.7.3 对照试验

(1) 空白对照

用无菌水做实验室空白测定，培养后的 97 孔定量盘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。

(2) 阴性及阳性对照

将标准菌株制成浓度大于 10 MPN/L 的菌悬液，分别取相应水量的菌悬液按“8.2 接种”、“8.3 培养”要求培养，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，应查明原因后重新测定。

结合《水和废水监测分析方法》（第四版）中微生物监测的对照培养（表 17），以及粪大肠菌群的组成特点，粪大肠菌群的阳性菌株选择耐热型的大肠埃希氏菌和耐热型的克雷伯氏菌。阴性菌株选择假单胞菌属中的铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*），通过实验检测（表 18），假单胞菌可以作为总大肠菌群、粪大肠菌群、大肠埃希氏菌的阴性对照菌，产气肠杆菌在 37 ± 1 °C 可以生长，而在 44.5 ± 0.5 °C 温度下不能生长，相比铜绿假单胞菌，产气肠杆菌还可以对温度进行有效监控。

表 17 微生物监测的对照培养

检测指标	阳性菌种	阴性菌种
总大肠菌群	大肠埃希氏菌、产气肠杆菌	金黄色葡萄球菌、假单胞菌属
粪大肠菌群	大肠埃希氏菌	产气肠杆菌、粪链球菌

表 18 铜绿假单胞菌和产气肠杆菌监测的对照培养

菌株	检测指标	结果	
		37 ± 1 °C	44.5 ± 0.5 °C
铜绿假单胞菌	总大肠菌群	不生长	/
	大肠埃希氏菌	不生长	/
	粪大肠菌群	不生长	不生长
产气肠杆菌		生长	不生长

综合表 17 及表 18 分析，总大肠菌群、大肠埃希氏菌、粪大肠菌群的阴性、阳性菌株参考表 19。使用金黄色葡萄球菌或假单胞菌属时，基于生物安全考虑，最好于 P2 实验室内进行，选用克雷伯氏菌(耐热型)作为粪大肠菌群的阳性菌株时，尽量选用无致病作用的菌株。操作时用无菌水将上述标准菌株制成菌悬液，取 100 ml 菌悬液按标准文本“8.2 接种”、“8.3 培养”要求操作。

表 19 阴、阳性菌株参考表

检测指标	阳性菌种	阴性菌种
总大肠菌群	大肠埃希氏菌、产气肠杆菌	金黄色葡萄球菌、假单胞菌属
大肠埃希氏菌	大肠埃希氏菌	金黄色葡萄球菌、假单胞菌属
粪大肠菌群	大肠埃希氏菌（耐热型）、克雷伯氏菌（耐热型）	产气肠杆菌、粪链球菌、假单胞菌属

5.7.4 结果判读与计数

参考 ISO 9308-2:2012、GB/T 5750.12-2006 及美国《Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater》（22 版）9223 酶底物法的结果判读内容。

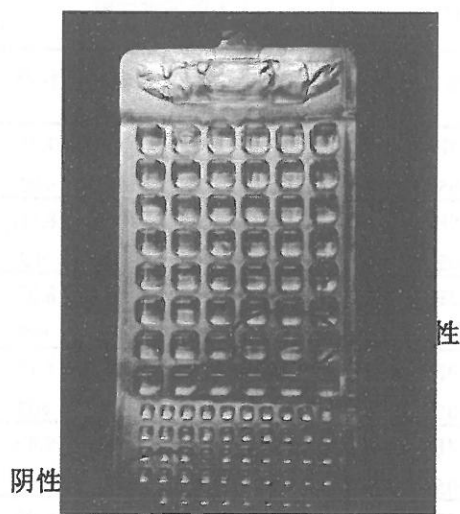


图 23 总大肠菌群、粪大肠菌群阴阳性参考

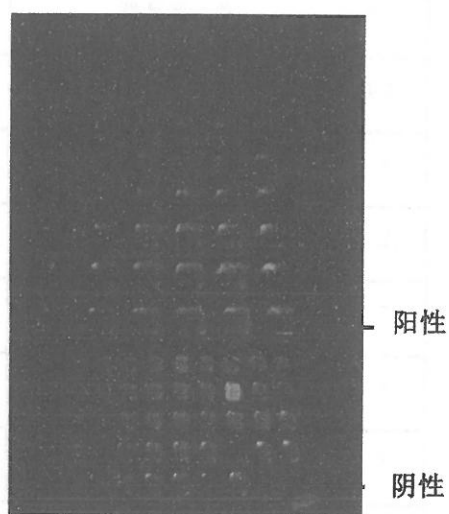


图 24 大肠埃希氏菌阴阳性参考

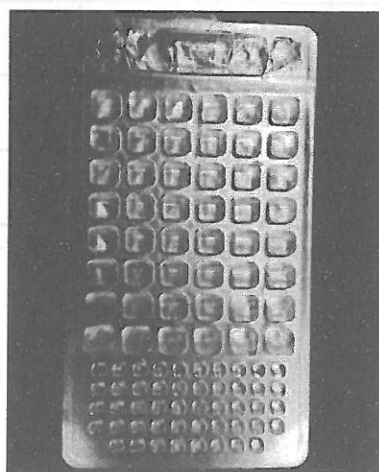


图 25 标准阳性对照盘参考

本标准规定：将培养 24 h 后的定量盘进行结果判读，水样变黄色判断为大肠菌群或粪（耐热）大肠菌群阳性；水样变黄色且在紫外灯照射下有荧光判断为大肠埃希氏菌阳性。分别记录定量盘中大孔和小孔中阳性孔数量。如果结果可疑，可延长培养时间到 28 h 进行结果判读，超过 28 h 后出现的颜色反应不作为阳性结果。可用标准阳性比色盘进行辅助判读。结果判读参照上图 23、24、25。

5.7.5 精密度与准确度

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 值应经对数（以 10 为底）转换后，再进行精密度的统计分析。本标准采用有证标准物质，以及高、中、低三种浓度的实际样品进行方法准确度和精密度研究，结果见附 1 验证报告。

表 20 精密度测定数据

指标	总大肠菌群				粪大肠菌群				大肠埃希氏菌			
	低	中	高	标准	低	中	高	标准	低	中	高	标准
1	1.1E +02	4.4E +04	5.5E +05	1.5E +03	2.0E +01	6.1E +03	3.7E +05	2.2E +03	3.1E +01	1.1E +04	1.8E +05	7.9E +02
2	9.6E +01	2.9E +04	1.1E +06	1.2E +03	3.1E +01	1.1E +04	4.9E +05	2.5E +03	3.0E +01	6.5E +03	2.9E +05	8.4E +02
3	8.6E +01	3.4E +04	9.2E +05	1.5E +03	5.2E +01	9.2E +03	2.5E +05	3.1E +03	3.1E +01	6.5E +03	2.6E +05	8.0E +02
4	2.6E +02	2.8E +04	1.1E +06	1.1E +03	5.2E +01	9.2E +03	1.9E +05	3.3E +03	3.1E +01	7.7E +03	3.9E +05	1.1E +03
5	1.2E +02	2.5E +04	9.2E +05	1.3E +03	2.0E +01	8.2E +03	3.4E +05	2.4E +03	2.0E +01	4.4E +03	3.4E +05	9.8E +02
6	1.7E +02	2.4E +04	1.0E +06	1.3E +03	2.0E +01	9.8E +03	3.7E +05	4.0E +03	2.0E +01	9.2E +03	3.7E +05	9.9E +02
\bar{x}	1.4E +02	3.1E +04	9.3E +05	1.3E +03	3.3E +01	8.9E +03	3.4E +05	2.9E +03	2.7E +01	7.6E +03	3.1E +05	9.2E +02
S	0.18	0.10	0.11	0.05	0.20	0.09	0.15	0.10	0.10	0.14	0.12	0.06
RSD	0.08	0.02	0.02	0.02	0.13	0.02	0.03	0.03	0.07	0.04	0.02	0.02

注： \bar{x} 为几何平均值，S、RSD为原始数据以10为底，对数转化后计算所得

5.7.4.1 精密度的测定

标准编制组实验室精密度的研究，通过采集地下水、地表水、废水，采用本标准方法进行总大肠菌群、粪大肠菌群、大肠埃希氏菌的检测，平行测定 6 次。

标准编制组对实验室的数据进行汇总统计分析，计算实验室内精密度，以实验室内相对标准偏差表示（见表 20）。

结果表明：低、中、高三种浓度样品中测定总大肠菌群的实验室内相对标准偏差为 0.08、0.10、0.11；低、中、高三种浓度样品中测定粪大肠菌群的实验室内相对标准偏差为 0.13、0.02、0.03；低、中、高三种浓度样品中测定大肠埃希氏菌的实验室内相对标准偏差为 0.07、0.04、0.02。

5.7.4.2 准确度的测定

标准编制组实验室内准确度研究，采用总大肠菌群、粪大肠菌群、大肠埃希氏菌的标准品进行本标准方法检测，平行测定 6 次。结果见表 20。

表 21 准确度测定数据

	总大肠菌群 (2000 MPN/L)	大肠埃希氏菌 (2000 MPN/L)	粪大肠菌群 (3700 MPN/L)
1	1.5E+03	7.9E+02	2.2E+03
2	1.2E+03	8.4E+02	2.5E+03
3	1.5E+03	8.0E+02	3.1E+03
4	1.1E+03	1.1E+03	3.3E+03
5	1.3E+03	9.8E+02	2.4E+03
6	1.3E+03	9.9E+02	4.0E+03
\bar{x}_i	1.3E+03	9.2E+02	2.9E+03
S_i	0.05	0.06	0.10
RSD_i	0.02	0.02	0.03
RE%	-5.67	1.05	-9.25

注： \bar{x}_i 为几何平均值， S_i 、 RSD_i 、RE%为原始数据以10为底，对数转化后计算所得

标准编制组对实验室的数据进行汇总统计分析，计算实验室内相对误差，以计算酶底物法的准确度。结果表明：总大肠菌群标准品（2000 MPN/L）实验室内相对误差为-5.67%；粪大肠菌群标准品（3700 MPN/L）实验室内相对误差为 1.05%；大肠埃希氏菌标准品（2000 MPN/L）实验室内相对误差为-9.25%。

5.8 结果计算与表示

5.8.1 结果计算

从 MPN 表中查得每 100 ml 水样中总大肠菌群、粪大肠菌群数或大肠埃希氏菌的 MPN 值后，再根据样品不同的稀释度，经公式（1）换算并报告每 1 L 水样中总大肠菌群、粪大肠菌群数或大肠埃希氏菌浓度。

$$C = \frac{MPN \text{值} \times 10}{f} \quad (1)$$

式中：

C—每 1 L 水样中总大肠菌群、粪大肠菌群数或大肠埃希氏菌浓度（MPN/L）

MPN 值—每 100 ml 水样中总大肠菌群、粪大肠菌群数或大肠埃希氏菌浓度（MPN/100 ml）

10—将 MPN 值的单位 MPN/100ml 转换为 MPN/L。

f—接种样品的稀释度

注：附录A中97孔定量表的计算方法：

小孔体积0.186 ml，大孔体积1.86 ml

$$\sum_{i=1}^K \frac{V_i d_i P_i}{1 - e^{-V_i d_i N_{mpn}}} = \sum_{i=1}^K V_i d_i n_i \quad (2)$$

式中：

V_i ——孔格中的样品体积 i ；

d_i ——稀释倍数；

n_i ——样品孔数 i ；

P_i ——阳性孔数 i ；

K——稀释水平的数量；

N_{mpn} ——MPN。

95%置信区间：

$$T_0 = (\ln N_{mpn} - 1.96) \times \varepsilon (\ln N_{mpn})$$

$$T_1 = (\ln N_{mpn} + 1.96) \times \varepsilon (\ln N_{mpn})$$

式中：

T_0 ——低区间；

T_1 ——高区间；

ε ——标准误差，

$$\varepsilon(\ln N_{mpn}) = \sqrt{N_{mpn}^{-2} \sum_{i=1}^K \frac{V_i^2 d_i^2 n_i^2}{e^{-V_i d_i N_{mpn}} - 1}} \quad (3)$$

5.8.2 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 MPN/L。

5.9 质量保证和质量控制

(1) 每批样品按“7.4 对照试验”进行空白对照测定，并使用有证标准菌株进行阳性、阴性对照试验。

(2) 参考《水和废水监测分析方法》(第四版)中分析工作的质量控制内容，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。

(3) 为减少配制中的误差，尽量选用市售的商品化培养基；对每批次培养基须用有证标准菌株进行培养基质量检验。

(4) 定期使用有证标准物质/标准样品进行质量控制。根据 CL-09《检测和校准实验室能力 认可准则在微生物检测领域的应用说明》要求，应定期使用有证标准物质/标准样品(如菌落总数标准物质、大肠菌群标准物质等)进行监控，或使用质控样品开展内部质量控制活动。

5.10 废物处理

实验产生的废弃物经 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min 后，废弃物作为一般废物处理。

6 方法验证

6.1 方法验证方案

6.1.1 参与方法验证的实验室、验证人员的基本情况

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 22。

表 22 方法验证单位及验证人员相关信息

姓名	职称	从事分析工作年限(年)	单位名称
俞晓蓓	工程师	9	上海市长宁区环境监测站
林杰	助理工程师	4	上海市长宁区环境监测站
张翔	工程师	7	常州市环境监测中心
张小琼	工程师	5	常州市环境监测中心
吴旦	工程师	13	常州市环境监测中心
潘枫燕	工程师	14	上海市青浦区环境监测站

姓名	职称	从事分析工作年限（年）	单位名称
钱晓霞	助理工程师	5	上海市青浦区环境监测站
陆晓怡	助理工程师	5	上海市青浦区环境监测站
康琦	助理工程师	2	上海市青浦区环境监测站
于海燕	研究员级高工	22	浙江省环境监测中心
顾卿	工程师	7	浙江省环境监测中心
厉以强	研究员级高工	28	江苏省环境监测中心
李娣	工程师	8	江苏省环境监测中心
蔡琨	工程师	3	江苏省环境监测中心
李萍	工程师	20	上海市松江区环境监测站
夏秀芳	工程师	25	上海市松江区环境监测站
赵丹	助理工程师	2	上海市松江区环境监测站

6.1.2 方法验证方案

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，选择高、中、低三种浓度的水样及标准样品，于6家实验室进行方法验证。

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，考虑到标准的应用范围，分别采集水源水（考虑采样方便，用以代表地下水）、地表水和废水，作为低浓度、中浓度、高浓度样品。其中，总大肠菌群测定的实际样品浓度为高（ 9.0×10^7 MPN/L）、中（ 4.0×10^4 MPN/L）、低（ 6.0×10^2 MPN/L），有证标准品为2000 MPN/L；大肠埃希氏菌群测定的实际样品浓度为高（ 2.0×10^6 MPN/L）、中（ 9.0×10^3 MPN/L）、低（70 MPN/L），有证标准品为2000 MPN/L；粪大肠菌群测定的实际样品浓度为高（ 3.0×10^6 MPN/L）、中（ 1.3×10^4 MPN/L）、低（ 1.0×10^2 MPN/L），有证标准品为3700 MPN/L。各验证实验室在统一的时间（低温冷藏6 h内），分别按本研究制定的检测方法进行总大肠菌群、大肠埃希氏菌、粪大肠菌群的检测，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，其中，总大肠菌群有证标准品浓度为2000 MPN/L；大肠埃希氏菌群有证标准品浓度为2000 MPN/L；粪大肠菌群有证标准品浓度为3700 MPN/L。各验证实验室按本研究制定的检测方法进行粪大肠菌群、

总大肠菌群、大肠埃希氏菌的检测，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

按照《环境监测 分析方法标准制修订技术导则》（HJ 168-2010）的规定，于2014年12月~2015年6月，组织两次验证试验，分别在浙江省环境监测站、常州市环境监测站、江苏省环境监测站以及上海长宁区环境监测站、上海青浦区环境监测站和上海松江区环境监测站6家实验室进行验证。验证工作主要内容是方法精密度、准确度的验证试验。

(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) 数据处理和分析。对所测数据进行实验室内标准偏差、相对标准偏差，实验室间标准偏差、相对标准偏差，重复性和再现性等进行精密度和准确度的分析。根据《环境水质监测质量保证手册》和美国《Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater》(22版)要求，由于微生物检测数据为偏态分布，其监测数据的统计值以几何平均数计算，其检测所得结果全部经对数（以10为底）转换后进行分析。

(3) 《方法验证报告》见附1。

(4) 方法验证结论

精密度：6家实验室分别对高浓度（ 9.0×10^7 MPN/L）、中浓度（ 4.0×10^4 MPN/L）、低浓度（ 6.0×10^2 MPN/L）的实际样品以及有证标准品（2000 MPN/L），进行总大肠菌群的测定。实验室内的相对标准偏差范围分别为：0.26%~1.3%、0.65%~2.0%、1.3%~3.7%、0.68%~2.8%；实验室间的相对标准偏差为分别为：9.9%、1.3%、4.2%、1.3%。重复性限为0.17、0.18、0.21、0.18；再现性限为1.84、0.23、0.38、0.20。实验室内置信区间分别为 $7.8 \times 10^5 \sim 1.9 \times 10^7$ MPN/L、 $3.2 \times 10^4 \sim 5.4 \times 10^4$ MPN/L、 $3.5 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^3$ MPN/L、 $1.1 \times 10^3 \sim 1.8 \times 10^3$ MPN/L，实验室间置信区间分别为 $3.7 \times 10^6 \sim 4.6 \times 10^6$ MPN/L、 $3.5 \times 10^4 \sim 4.6 \times 10^4$ MPN/L、 $5.5 \times 10^2 \sim 7.4 \times 10^2$ MPN/L、 $1.8 \times 10^3 \sim 2.3 \times 10^3$ MPN/L。

6家实验室分别对高浓度（ 2.0×10^6 MPN/L）、中浓度（ 9.0×10^3 MPN/L）、低浓度（70 MPN/L）的实际样品以及有证标准品（2000 MPN/L），进行大肠埃希氏菌群的测定。实验室内的相对标准偏差范围分别为：0.69%~1.9%、0.93%~2.9%、5.4%~21%、1.8%~3.0%；实验室间的相对标准偏差为分别为9.6%、1.6%、15%、3.7%。重复性限为0.23、0.21、0.58、

0.19;再现性限为 1.67、0.26、0.90、0.35。实验室内置信区间分别为 $2.0 \times 10^5 \sim 5.5 \times 10^6$ MPN/L、 $5.9 \times 10^3 \sim 1.2 \times 10^4$ MPN/L、 $1.1 \times 10^1 \sim 1.4 \times 10^2$ MPN/L、 $5.5 \times 10^2 \sim 1.4 \times 10^3$ MPN/L，实验室内置信区间分别为 $1.3 \times 10^6 \sim 1.7 \times 10^6$ MPN/L、 $7.3 \times 10^3 \sim 9.8 \times 10^3$ MPN/L、 $3.9 \times 10^1 \sim 9.0 \times 10^1$ MPN/L、 $1.7 \times 10^3 \sim 2.3 \times 10^3$ MPN/L。

6家实验室分别对高(3.0×10^6 MPN/L)、中(1.3×10^4 MPN/L)、低浓度(1.0×10^2 MPN/L)的实际样品以及有证标准品(3700 MPN/L)，进行粪大肠菌群的测定。实验室内的相对标准偏差范围分别为：0.40%~2.4%、1.3%~2.9%、3.4%~17%、2.4%~9.2%；实验室间的相对标准偏差为分别为：8.9%、6.4%、6.6%、6.4%。重复性限为 0.22、0.26、0.58、0.55；再现性限为 1.58、0.76、0.64、0.75。实验室内置信区间分别为 $3.0 \times 10^5 \sim 8.8 \times 10^6$ MPN/L、 $4.0 \times 10^3 \sim 2.3 \times 10^4$ MPN/L、 $3.7 \times 10^1 \sim 1.7 \times 10^2$ MPN/L、 $6.1 \times 10^2 \sim 5.0 \times 10^3$ MPN/L，实验室内置信区间分别为 $1.6 \times 10^6 \sim 2.1 \times 10^6$ MPN/L、 $9.5 \times 10^3 \sim 1.4 \times 10^4$ MPN/L、 $6.2 \times 10^1 \sim 1.3 \times 10^2$ MPN/L、 $2.5 \times 10^3 \sim 5.4 \times 10^3$ MPN/L。

准确度：6家合格实验室分别对总大肠菌群有证标样(2000 MPN/L)进行测定。实验室内的相对误差范围为：-6.4%~-3.5%；相对误差的最终值为：-4.7%±1.2%。

6家合格实验室分别对大肠埃希氏菌群有证标样(2000 MPN/L)进行测定。实验室内的相对误差范围为：-15%~-6.3%；相对误差的最终值为：-13%±3.3%。

6家合格实验室分别对粪大肠菌群的有证标样(3700 MPN/L)进行测定。实验室内的相对误差范围为：-17%~-0.81%；相对误差的最终值为：-13%±6.1%。

7 专家函审及修改

2015年11月~2016年3月，在完成方法验证，由环境保护部环境标准司组织专家对编制的标准文本和编制说明的征求意见稿草案进行函审。编制《水质 总大肠菌群、粪(耐热)大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定 酶底物法》。

2017年1月~2017年2月，由环境保护部环境标准司组织征求意见稿经技术审查会专家进行审查，根据专家审查意见，进一步修改并完成《水质 总大肠菌群、粪大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定 酶底物法》标准文本和编制说明的标准征求意见稿。

表 23 标准征求意见前函审专家意见情况汇总表

标准名称		水质 总大肠菌群、粪大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定 酶底物法				
标准主编单位		上海市环境监测中心				
序号	标准条款编号	原内容	意见内容	提出人	处理意见及理由	备注
1		水质 总大肠菌群、粪大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定 酶底物法	酶底物法没有确认试验的步骤，实质为快速方法，建议标准名称改为“水质 总大肠菌群、粪大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定 酶底物快速法”。	2	不采纳。与传统方法相比，酶底物法为固定底物酶底物技术，从酶反应、选择培养基、培养温度、培养时间四方面达到目标菌群的综合检测，专一性强，国内外现有标准中均无需确认试验。	
	1	本标准适用于地表水、地下水、废水中总大肠菌群、粪大肠菌群和大肠埃希氏菌的酶底物法测定。 本方法的检出限为 10 MPN/L。	方法的检出限 10 MPN/L 与地下水管理标准（I、II 和 III 类限值为 3.0 个/L，IV 类 100 个/L）的匹配度较低，标准适用范围中是否还考虑地下水？	2	不采纳。GB/T 14848-93 为推荐性国家标准，用户可根据管理目标、现状等合理选择检测方法。根据相关文献，国内地下水大肠菌群指标超标严重，远高于本法检出限。此外，GB/T 14848-93 标准为 23 年前的管理标准，标准很可能更新，以适用当前环境状况。	
	2.1	37℃培养 24h，能产生 β-半乳糖苷酶（β-D-galactosidase）分解邻硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷（ONPG）发生黄色反应的细菌菌群。	37℃培养 24h，能产生 β-半乳糖苷酶（β-D-galactosidase），分解培养基中的邻硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷（ONPG），生成黄色的邻硝基苯酚的细菌菌群。 自然界中许多动植物及非大肠菌群类微生物能产生 β-半乳糖苷酶，文	1	采纳	37℃培养 24h，能产生 β-半乳糖苷酶（β-D-galactosidase），分解选择培养基中的邻硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷（ONPG），生成黄色的邻硝基苯酚的肠杆菌科细菌。
				2	采纳	

2		<p>粪大肠菌群，又称耐热大肠菌群。44.5℃培养 24h，能产生 β-半乳糖苷酶 (β-D-galactosidase) 分解邻硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷 (ONPG) 发生黄色反应的细菌菌群。</p>	<p>本中的定义有可能扩大化，将非大肠菌群类细菌组包括进来。ISO 9308-2:2012 的定义“能够产生 β-半乳糖苷酶的肠杆菌科细菌”是可行的。</p>		
2.2		<p>粪大肠菌群，又称耐热大肠菌群。44.5℃培养 24h，能产生 β-半乳糖苷酶 (β-D-galactosidase)，分解培养基中的邻硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷 (ONPG)，生成黄色的邻硝基苯酚的细菌菌群。</p>	<p>粪大肠菌群，又称耐热大肠菌群。44.5℃培养 24h，能产生 β-半乳糖苷酶 (β-D-galactosidase)，分解培养基中的邻硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷 (ONPG)，生成黄色的邻硝基苯酚的肠杆菌科细菌。</p>	1	<p>粪大肠菌群，又称耐热大肠菌群。44.5℃培养 24h，能产生 β-半乳糖苷酶 (β-D-galactosidase)，分解培养基中的邻硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷 (ONPG)，生成黄色的邻硝基苯酚的肠杆菌科细菌。</p>
		<p>自然界中许多动植物及非大肠菌群类微生物能产生 β-半乳糖苷酶，文本中的定义有可能扩大化，将非大肠菌群类细菌组包括进来。ISO 9308-2:2012 的定义“能够产生 β-半乳糖苷酶的肠杆菌科细菌”是可行的。</p>	<p>自然中许多动植物及非大肠菌群类微生物能产生 β-半乳糖苷酶，文本中的定义有可能扩大化，将非大肠菌群类细菌组包括进来。ISO 9308-2:2012 的定义“能够产生 β-半乳糖苷酶的肠杆菌科细菌”是可行的。</p>	2	<p>选择性采纳</p>

3	<p>又称大肠杆菌。37℃培养 24h, 能产生 β-半乳糖苷酶 (β-D-galactosidase) 分解邻硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷 (ONPG) 发生黄色反应, 产生 β-葡萄糖醛酸酶分解 4-甲基伞形酮-β-D-葡萄糖醛酸苷 (MUG) 发生荧光反应的细菌菌群。</p>	2.3	<p>又称大肠杆菌。37℃培养 24h, 能产生 β-半乳糖苷酶 (β-D-galactosidase), 分解培养基中的邻硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷 (ONPG), 生成黄色的邻硝基苯酚, 同时产生 β-葡萄糖醛酸酶, 分解培养基中的 4-甲基伞形酮-β-D-葡萄糖醛酸苷 (MUG), 释放出荧光物质 (4-甲基伞形酮) 的细菌菌群。</p>	1	<p>又称大肠杆菌。37℃培养 24h, 能产生 β-半乳糖苷酶 (β-D-galactosidase), 分解选择培养基中的邻硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷 (ONPG), 生成黄色的邻硝基苯酚, 同时产生 β-葡萄糖醛酸酶, 分解选择培养基中的 4-甲基伞形酮-β-D-葡萄糖醛酸苷 (MUG), 释放出荧光物质 (4-甲基伞形酮) 的肠杆菌科细菌。</p>	<p>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可能数)。</p>
4	<p>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。对水样进行连续系列稀释, 加入培养基培养, 统计阳性反应的出现率, 推算样品中目标微生物近似浓度。该法适用于测定在一个混杂的微生物群落中虽不占优势, 但却具有特殊生理功能的菌群。</p>	2.4	<p>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目标微生物阳性出现的份数, 通过查表, 估计一定体积样品中目标微生物存在的数量 (单位体积存在微生物的最可能数)。</p>	1	<p>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可能数)。</p>	<p>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可能数)。</p>
5	<p>在特定温度培养下, 总大肠菌群、</p>	3	<p>将加入培养基的一定体积的水样</p>	1	<p>在特定温度下培养特定的时</p>	<p>在特定温度下培养特定的时</p>

		<p>粪大肠菌群、大肠埃希氏菌能产生特定的β-半乳糖苷酶将无色底物邻硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷(ONPG)分解为邻硝基酚(ONP),呈黄色反应;且大肠埃希氏菌同时又能产生β-葡萄糖醛酸酶将4-甲基伞形酮-β-D-葡萄糖醛酸苷(MUG)分解为4-甲基伞形酮,在紫外灯照射下呈荧光反应。统计阳性反应出现率,查MPN表,统计相应水体中总大肠菌群、粪大肠菌群、大肠埃希氏菌的浓度值。</p>	<p>(或稀释样品)放入97孔定量盘中,密封,在特定温度下培养,总大肠菌群、粪大肠菌群和大肠埃希氏菌能产生β-半乳糖苷酶分解培养基(无色)中的邻硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷(ONPG),生成黄色的邻硝基酚(ONP);同时大肠埃希氏菌还能产生β-葡萄糖醛酸酶,分解培养基中的4-甲基伞形酮-β-D-葡萄糖醛酸苷(MUG),释放出荧光物质4-甲基伞形酮。根据定量盘中大孔和小孔出现阳性反应的数目,查MPN表,再除以接种样品的稀释度,估计单位体积存在总大肠菌群、粪大肠菌群或大肠埃希氏菌的最可能数。</p>		<p>间,总大肠菌群、粪大肠菌群、大肠埃希氏菌能产生特定的β-半乳糖苷酶将选择培养基中的无色底物邻硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷(ONPG)分解为邻硝基酚(ONP),呈黄色反应;且大肠埃希氏菌同时又能产生β-葡萄糖醛酸酶将选择培养基中的4-甲基伞形酮-β-D-葡萄糖醛酸苷(MUG)分解为4-甲基伞形酮,在紫外灯照射下呈荧光反应。统计阳性反应出现数量,查MPN表,再除以接种样品的稀释度,计算相应水体中总大肠菌群、粪大肠菌群、大肠埃希氏菌的浓度值。</p>
			<p>要强调培养时间及培养基为选择性培养基,酶底物法主要是通过这两个方面将能产生β-半乳糖苷酶的非大肠菌群类微生物排除在外的,建议修改方法原理。</p>	<p>2</p> <p>采纳</p>	
6	5.5	97孔定量盘。	给出97孔定量盘大孔和小孔的规格	1	97孔定量盘:48个小孔可容纳0.186ml水样,49个大孔

						可容纳 1.86 ml 水样。
7	5.7	紫外灯: 366 nm。	给出紫外灯的波长范围	1	<p>采纳。根据 US EPA 《Manual for the Certification of Laboratories Analyzing Drinking Water》5.3.1.2.3 内容: 一些酶底物培养基可以在含波长为 365~366 nm 的紫外灯(6w 灯泡)照射下产生荧光物质; 美国《Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater》22 版 9223 部分、ISO 9308-2:2012 《Water quality — Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria — Part 2: Most probable number method》规定紫外灯(6w 灯泡)波长为 365 nm; 《生活饮用水标准》(GBT5750-2006)规定紫外灯波长为 366 nm。此外, 根据相关文献, 4-甲基伞形酮在 365~366 nm 的紫外光下均有较好激发效应。</p>	紫外灯: 365~366 nm。
	7.1		虽然标准编制单位进行了“无菌操作环境条件必要性研究”, 但无菌操作是微生物检验的基本操作要求, 建议文本中稀释、接种步骤明确要	2	不采纳。无菌操作作为微生物检验的基本操作要求, 在野外工作中, 尽可能达到这个要求, 故本标准中采样、接种环节均规定使	
	7.2					

		<p>结果判读</p> <p>将培养 24h 后的定量盘进行结果判读,水样变黄色判断为总大肠菌群或粪大肠菌群阳性;水样变黄色且有荧光判断为大肠埃希氏菌阳性。如果结果可疑,可延长培养时间到 28h 进行结果判读,超过 28h 后出现的颜色反应不作为阳性结果。可使用保质期内的标准阳性比色盘以辅助判读。</p>	<p>求按无菌操作进行,实际上,无菌操作并不意味着一定要使用洁净室、超净台等高端设备。</p> <p>增加阳性判别和计数的内容,如在紫外灯照射下,观察是否产生荧光的内容,增加“分别记录定量盘中大孔和小孔中阳性孔出现的数量”。</p>	1	<p>用无菌工具,正体现无菌操作和</p> <p>要求。</p> <p>采纳</p>	<p>结果判读与计数</p> <p>将培养 24h 后的定量盘进行结果判读,水样变黄色判断为总大肠菌群或粪大肠菌群阳性;水样变黄色且在紫外灯照射下有荧光判断为大肠埃希氏菌阳性。分别记录定量盘中大孔和小孔中阳性孔数量。如果结果可疑,可延长培养时间到 28h 进行结果判读,超过 28h 后出现的颜色反应不作为阳性结果。可使用保质期内的标准阳性比色盘以辅助判读。</p>
8	7.4			1	采纳	见标准内容 9
9	9		<p>实验室内相对标准偏差、实验室内相对标准偏差、相对误差和相对误差最终值保留 2 位有效数字即可。</p> <p>重复性限和再现性限物理意义不明显,建议给不同浓度验证结果的置信区间。计算方法可参见附件;对</p>	1	采纳	见标准内容 9
	9.1			1	采纳	见标准内容 9

		数正态分布平均值的置信区间。				
10.1	实验过程中,须增加空白对照试验,对所用试剂、器皿和操作过程进行无菌性检验;每批次实验取待测水样数量的10%,做双样分析,以检验实验精密度。	每次检测过程中除进行空白对照试验外还需进行阳性、阴性标准菌株对照试验,不能只是用阳性、阴性标准菌株一次性对培养基质量进行鉴定。每次检测的过程控制必须要有阳性、阴性对照试验,建议修改文本相关部分。	2	采纳	实验过程中,须增加空白对照试验,阴性、阳性标准菌株对照试验,对所用试剂、器皿和操作过程进行检验;每批次实验取待测水样数量的10%,做双样分析,以检验实验精密度。	
10.2	阳性菌株为大肠埃希氏菌(<i>Escherichia coli</i>),阴性菌株为铜绿假单胞菌(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)。	建议粪大肠菌群阴性标准菌株采用产气肠杆菌(<i>Enterobacter aerogenes</i>),它可对温度的失控进行有效的甄别,而铜绿假单胞菌(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)不能。	2	选择性采纳。根据《水和废水监测分析方法》及相关实验研究,综合得出阴阳标准菌株,由使用单位自行选择使用。	见标准内容10	

表 24 标准编制说明函审专家意见情况汇总表

《水质 总大肠菌群、粪大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定 酶底物法》编制说明						
上海市环境监测中心						
名称						
标准主编单位						
序号	编制说明条款编号	原内容	意见内容	提出人	处理意见及理由	备注
1	3.3		建议说清总大肠菌群、粪大肠菌群酶底物法测定原理与经典多管发酵法之间的关系,仅仅做实际样品两个方法测定对比是不够的。	2	采纳。	见编制说明 3.3

5.1	标准的检出限为10 MPN/L, 优于经典方法 - 多管发酵法的检出限 (20 MPN/L)	实际上多管发酵法的检出限为3 MPN/L。	2	采纳。删除“优于经典方法 - 多管发酵法的检出限 (20 MPN/L)”	
5.1.1. (3)	多管发酵法所用培养基、试剂和测定方法按照 HJ/T 347-2007《水质大肠菌群群的测定 多管发酵法和滤膜法》中的要求准备和测定	HJ/T 347-2007 并没有大肠埃希氏菌的测定方法, 如何比较酶底物法和多管发酵法的大肠埃希氏菌测定?	2	采纳。修改为“多管发酵法所用培养基、试剂和测定方法按照 GB/T 5750.12-2006《生活饮用水标准检验方法 微生物指标》中的要求准备和测定”	
3.1		美国《standard methods for the examination of water and wastewater》现行有效的版本为22版, 将21版改为22版。	2	采纳。将21版改为22版。	
		图表中应注明(如: 坐标轴)有关项目内容和单位。	2	采纳。完善图表内容, 增加单位和相关内容。	

表 25 标准征求意见稿技术审查专家意见情况汇总表

《水质 总大肠菌群、粪大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定 酶底物法》编制说明					
上海市环境监测中心					
序号	标准条款编号	原内容	意见内容	处理意见及理由	备注
1		水质 总大肠菌群、粪(耐热)大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定酶底物法	粪大肠菌群又称耐热大肠菌群, 为同一类菌群, 建议将标题及文本统一使用粪大肠菌群。	采纳。	
2	7.1		在标准文本中增加不同水体的样品稀释度选择的参考。	采纳。	在7.1样品稀释章节中增加相关说明及参考表

8 与开题报告的差异说明

根据开题后专家建议,将标准名称由《水质 粪大肠菌群的测定 酶底物法》改为《水质 总大肠菌群、粪(耐热)大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定 酶底物法》;增加了水质总大肠菌群、大肠埃希氏菌的相关内容;补充了地下水中粪大肠菌群的相关检测数据;补充了酶底物法检测水质总大肠菌群、大肠埃希氏菌的相关数据。

根据征求意见稿技术审查会的专家审查意见,将标准名称由《水质 总大肠菌群、粪(耐热)大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定 酶底物法》改为《水质 总大肠菌群、粪大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定酶底物法》,并对文本进行相应修改,在标准文本中增加不同水体的样品稀释度选择。

9 参考文献

- [1] 高瑞坤. 美国环保署的大肠菌群检测技术[J]. 福建分析测试, 2006, 15 (2), 36-37.
- [2] Eaton, Andrew D. (EDT) / Clesceri, Lenore S. (EDT) / Rice. Standard Methods for Examination of Water & Wastewater (HRD) .Amer Public Health Assn, 20th Edition, 1998.
- [3] U.S Envirmental Protection AgencyFinal Approval of Colilert, Quanti-Tray and Quanti-Tray/2000 for Wastewater testing. U.S. EPA, 2007.
- [4] Gary P. Water Environment Research. Number 2. 2002, (74) .
- [5] 付强, 汤琳. 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[J]. 中国环境监测杂志, 2008, 24 (04): 39-41.
- [6] 罗应婷, 杨钰娟. SPSS 统计分析从基础到实践. 电子工业出版社, 2008.
- [7] 卢纹岱. SPSS for Windows 统计分析 (第三版). 电子工业出版社, 2006.
- [8] SM Committee. 9223 Chromogenic Substrate Coliform Test, 2004.
- [9] Olstadt J. et al. A comparison of ten US EPA approved total coliform/*E. coli* tests. *Journal of Water and Health*[J]. 2007, 5 (2): 267-282.
- [10] A Fricker EJ. Comparison of Five Commercially Available Methods for the Detection of Coliforms and *E. coli*[J]. Proceedings from: 2003 WQTC.
- [11] U.S. EPA Proposed approval of Colilert, Colilert-18, Colisure, Enterolert and Quanti-Tray for Ambient Water Testing[M]. Washengton DC: U.S. Federal Register, 2001.
- [12] 丁程成. 欧美水质大肠菌群相关检验标准探究[J]. 环境科技, 2010, 23 (01) :67-69.
- [13] 遇晓杰, 谢平会, 焦艳玲等. 固定底物酶底物法与多管发酵法检测水中耐热大肠菌群的比较研究[J]. 卫生监测与检验. 2012 (04), 28 (02): 251-252.

- [14] 赵春霞, 张哲海, 厉以强等.酶底物法与多管发酵法和纸片法监测环境水样大肠菌群的比较[J]. 环境监测管理与技术, 2009, 21 (2): 63-64.
- [15] 康苏花.酶底物法测定水中大肠菌群[J]. 河北环境科学, 2011: 154-155.
- [16] 段玉林, 张少梅, 温韬等.酶底物法快速测定地表水中粪大肠菌群的研究[J]. 洛阳理工学院学报(自然科学版), 2011, 04: 13-15.
- [17] 张少峰, 刘国强, 魏春雷. 粪大肠菌群检测方法的研究进展[J]. 海洋通报.2008, 27(03): 102-106.
- [18] 罗应婷, 杨钰娟.SPSS 统计分析从基础到实践[M]. 电子工业出版社, 2008.
- [19] 卢纹岱.SPSS for Windows 统计分析(第三版)[M]. 电子工业出版社, 2006.
- [20] 孙宗科, 吴榕等.水中大肠菌群快速检测方法-酶底物法和多管发酵法的比较[J]. 卫生研究, 2006, 35 (4): 497-498.
- [21] 高瑞坤, 汤琳等. 水中粪大肠菌群快速检测方法-固定底物酶底物法[J]. 中国环境监测, 2008, 6 (4): 39-41.
- [22] 杨琳. Colilert(科立得)固定底物技术酶底物法的快速检测方法分析[J]. 大众科技.2012, 04: 131-1321.
- [23] 蒋荣荣. 两种方法检测水中粪大肠菌群的比较[J]. 黑龙江环境通报. 2010 (12), 34 (04) :46-47.
- [24] 李平, 甄宏太, 方原民等. 应用4-甲基伞形酮- β -D-半乳糖苷快速检测食品中的大肠菌群[J]. 食品科学, 2007, 28 (04): 285-288.
- [25] 邹爱玲, 阮健, 付竹霓等. 4-甲基伞形酮半乳糖苷快速检定药品中大肠菌群的方法研究[J]. 2003, 06 (15), 470-471.
- [26] 褚天新, 苏丽霞, 路文彬. MUCAP 荧光试验快速检测沙门氏菌[J]. 中国公共卫生, 2000 (01), 69-70.
- [27] 张莉, 李庆章, 田雷. β -半乳糖苷酶研究进展[J]. 东北农业大学学报. 2009, 40 (7): 128-131.
- [28] 苏德模, 徐维洁, 刘鹏等. MUG-Indole 快速检定大肠杆菌方法研究[J]. 药物分析杂志. 1996, 02, 108-112.
- [29] 苏德模, 徐维洁, 刘鹏等. MUG-EMB 快速检定大肠杆菌方法研究[J]. 卫生研究, 1994, 23 (6), 343-347.

- [30] 谢朝梅, 韩朝霞. 快速鉴定肠杆菌科细菌的实验观察[J]. 现代医药, 2002,18(11), 1020.
- [31] 施明华, 方维焕. 荧光法快速鉴定大肠杆菌的初步研究[J]. 浙江农业学报, 1999, 11(2), 92-95.
- [32] 方维焕, 施明华. 牛奶中大肠杆菌生长的荧光测定法[J]. 浙江农业学报, 1999, 18(4), 59-62.
- [33] 马延霞, 吴清平, 张菊美等. 大肠菌群特异性检测荧光底物 MUGal 的合成及应用[J]. 现代食品科技, 2014,30(8), 257-257.
- [34] 李建煌, 姚蕾, 李玉优. ONPG 培养基快速测定食品中大肠菌群的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2015,6(12), 4839-4843.
- [35] 杨聚在. 《细菌最可能数 (MPN) 的计算方法与程序》[J]. 中国卫生检验杂志, 2000, 2(10), 101-102.
- [36] 陆苏飏. 《MPN 法原理与局限性分析》[J]. 食品安全与检测, 2001, 7, 58-59.
- [37] 方维焕, 施明华. 《牛奶中大肠杆菌 (Escherichia coli) 生长的荧光测定法》[J]. 浙江农业大学学报, 1992, 18(4), 59-62.
- [38] 马延霞, 吴清平, 张菊梅等. 《大肠菌群特异性检测荧光底物 MUGal 的合成及应用》[J]. 现代食品科技, 2014, 30(8), 251-257.
- [39] 国家环境保护总局《水和废水监测方法》编委会. 水和废水监测分析方法[M].第四版, 2002.
- [40] ISO 9308-2:2012 Water quality — Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria — Part 2: Most probable number method.
- [41] 《Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater》(21st) USA, 2005.
- [42] 《生活饮用水卫生标准》(GB5750-2006)
- [43] 《地表水环境质量标准》(GB3838-2002)
- [44] 《地下水质量标准》(GB/T14848-1993)
- [45] 《海水水质标准》(GB3097-1997)
- [46] 《农田灌溉水质标准》(GB5084-2005)
- [47] 《渔业水质标准》(GB11607-1989)
- [48] 《医疗机构水污染物排放标准》(GB18466-2005)
- [49] 《生活垃圾填埋场污染控制标准》(GB16889-2008)
- [50] 《畜禽养殖业污染物排放标准》(GB18596-2001)

- [51] 《生物工程类制药工业水污染物排放标准》（GB21907-2008）
- [52] 《城镇污水处理厂污染物排放标准》（GB18918-2002）
- [53] 《肉类加工工业水污染物排放标准》（GB13457-1992）
- [54] 《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）
- [55] 《出口食品中大肠菌群、粪大肠菌群和大肠杆菌检验方法》（SN 0169-92）
- [56] 《食品卫生微生物学检验 粪大肠菌群 计数》（GB/T 4789.39-2008）

附 1

方法验证报告

方法名称：水质 总大肠菌群、粪大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定 酶底物法

项目主编单位：上海市环境监测中心

验证单位：江苏省环境监测中心、浙江省环境监测中心、常州市环境监测中心、上海市松江区环境监测站、上海市长宁区环境监测站、上海市青浦区环境监测站

项目负责人及职称：汤琳 教授级高级工程师

通讯地址：上海市徐汇区三江路55号 电话：021-24011766

报告编写人及职称：汤琳 教授级高级工程师

报告日期：2015 年 7 月 1 日

本方法的6家验证实验室分别为：（1）上海市长宁区环境监测站，（2）常州市环境监测站，（3）上海市青浦区环境监测站，（4）浙江省环境监测中心，（5）江苏省环境监测中心，（6）上海市松江区环境监测站。编制组将《水质 总大肠菌群、粪大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定 酶底物法》方法验证的结果进行汇总及统计分析，得出验证报告。

1 原始数据

1.1 实验室基本情况

附表1 方法验证单位及验证人员相关信息

姓名	职称	从事分析工	单位名称	实验室号
俞晓蓓	工程师	9	上海市长宁区环境监测站	1
林杰	助理工程师	4	上海市长宁区环境监测站	1
张翔	工程师	7	常州市环境监测中心	2
张小琼	工程师	5	常州市环境监测中心	2
吴旦	工程师	13	常州市环境监测中心	2
潘枫燕	工程师	14	上海市青浦区环境监测站	3
钱晓霞	助理工程师	5	上海市青浦区环境监测站	3
陆晓怡	助理工程师	5	上海市青浦区环境监测站	3
康琦	助理工程师	2	上海市青浦区环境监测站	3
于海燕	研究员级高工	22	浙江省环境监测中心	4
顾卿	工程师	7	浙江省环境监测中心	4
厉以强	研究员级高工	28	江苏省环境监测中心	5
李娣	工程师	8	江苏省环境监测中心	5
蔡琨	工程师	3	江苏省环境监测中心	5
李萍	工程师	20	上海市松江区环境监测站	6
夏秀芳	工程师	25	上海市松江区环境监测站	6
赵丹	助理工程师	2	上海市松江区环境监测站	6

附表 2 参加验证单位仪器情况登记表

验证实验室	仪器名称	规格型号	出厂编号	性能状况
常州市环境监测中心	恒温培养箱	HERA THERM	20122030261002	正常
常州市环境监测中心	隔水式恒温培养箱	GSP-9270MBE		正常
常州市环境监测中心	立式灭菌器	LMQ.C		正常
常州市环境监测中心	程控定量封口机	2009D		正常
常州市环境监测中心	紫外灯	MODEL		正常
浙江省环境监测中心	高压蒸汽灭菌锅	GI 54DW	AA08N001	正常
浙江省环境监测中心	电热恒温培养箱	DHP 9162	0810251041HH	正常
浙江省环境监测中心	紫外分析仪	ZF-I	/	正常
浙江省环境监测中心	封口机	Model-2X	9211	正常
江苏省环境监测中心	立式压力蒸汽灭菌	YXQ-LS-30 SII	9901	正常
江苏省环境监测中心	理化干燥箱；	LG050B	B0005月	正常
江苏省环境监测中心	程控定量封口机	2006A	070134	正常
江苏省环境监测中心	光照培养箱；	GZP-250	401051	正常
江苏省环境监测中心	振荡培养箱	HZQ-F160	17	正常
松江区环境监测站	隔水式电热恒温培	GNP-9270BS	1009348026	正常
松江区环境监测站	生化培养箱	BSP-100	12033	正常
松江区环境监测站	手提式紫外检测灯	ZF-7B		正常
松江区环境监测站	Quanti-Tray Sealer	Model 2X		正常
长宁区环境监测站	压力蒸汽灭菌器	YXQ-LS-II	7934	正常
长宁区环境监测站	压板器	PQ-SEALER	070087	正常
长宁区环境监测站	手提式紫外检测灯	ZF-7B	—	正常
长宁区环境监测站	培养箱	BINDER115	08-54290	正常
青浦区环境监测站	培养箱	Thermo 310	2076100559336	正常
青浦区环境监测站	培养箱	Thermo 310	2076100559337	正常
青浦区环境监测站	灭菌锅	GR-60	21703101182014	正常
青浦区环境监测站	封口机	89-10894-05	5372	正常
青浦区环境监测站	紫外灯	ZF-7B	/	正常

1.2 方法精密度的测试数据

6 家验证单位的实际样品及标准样品的精密度验证数据见附表3~14。

1.2.1 总大肠菌群的精密验证数据

附表 3 标准样品精密密度测试数据汇总表 (总大肠菌群) (单位: MPN/L)

实验室	测定值											95%可信限值	
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	\bar{x}_i	s_i	RSD _i	下限	上限		
	1	1.9E+03	1.6E+03	1.5E+03	1.7E+03	1.3E+03	1.3E+03	1.5E+03	0.07	2.05	1.3E+03	1.8E+03	
2	1.8E+03	1.3E+03	1.5E+03	2.0E+03	1.2E+03	1.4E+03	1.5E+03	0.09	2.78	1.2E+03	1.8E+03		
3	1.6E+03	1.2E+03	1.6E+03	1.4E+03	1.5E+03	1.5E+03	1.5E+03	0.05	1.48	1.3E+03	1.6E+03		
4	1.2E+03	1.2E+03	1.2E+03	1.2E+03	1.3E+03	1.3E+03	1.2E+03	0.02	0.68	1.2E+03	1.3E+03		
5	1.2E+03	1.5E+03	2.0E+03	1.3E+03	1.6E+03	1.4E+03	1.5E+03	0.08	2.41	1.3E+03	1.7E+03		
6	1.3E+03	1.2E+03	1.3E+03	1.2E+03	1.5E+03	1.1E+03	1.2E+03	0.05	1.60	1.1E+03	1.4E+03		

注: \bar{x}_i 为几何平均值, s_i 、RSD_i(%)为原始数据以10为底,对数转化后计算所得(下同)

附表 4 低浓度样品精密密度测试数据汇总表 (总大肠菌群) (单位: MPN/L)

实验室	测定值											95%可信限值	
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	\bar{x}_i	s_i	RSD _i	下限	上限		
	1	9.1E+02	8.6E+02	7.2E+02	1.0E+03	9.6E+02	1.0E+03	9.0E+02	0.05	1.84	8.1E+02	1.0E+03	
2	3.7E+02	4.1E+02	3.4E+02	4.4E+02	6.1E+02	4.0E+02	4.2E+02	0.09	3.33	3.5E+02	5.0E+02		
3	5.5E+02	5.4E+02	6.2E+02	4.8E+02	6.0E+02	7.9E+02	5.9E+02	0.07	2.67	5.0E+02	6.9E+02		
4	9.1E+02	6.4E+02	1.2E+03	8.2E+02	6.0E+02	8.0E+02	8.1E+02	0.11	3.75	6.4E+02	1.0E+03		
5	6.1E+02	5.6E+02	5.0E+02	5.4E+02	6.1E+02	6.3E+02	5.7E+02	0.04	1.35	5.3E+02	6.2E+02		
6	5.1E+02	7.8E+02	6.9E+02	7.4E+02	6.7E+02	6.0E+02	6.6E+02	0.07	2.37	5.7E+02	7.6E+02		

附表 5 中浓度样品精密密度测试数据汇总表 (总大肠菌群) (单位: MPN/L)

实验室	测定值											95%可信限值	
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	\bar{x}_i	s_i	RSD _i	下限	上限		
	1	4.4E+04	4.1E+04	4.9E+04	5.5E+04	5.2E+04	5.5E+04	4.9E+04	0.05	1.12	4.4E+04	5.4E+04	
2	3.9E+04	3.4E+04	3.4E+04	3.3E+04	4.1E+04	3.1E+04	3.5E+04	0.05	1.03	3.2E+04	3.9E+04		
3	4.4E+04	3.4E+04	2.8E+04	3.9E+04	4.1E+04	5.2E+04	3.9E+04	0.09	2.03	3.2E+04	4.7E+04		
4	4.6E+04	6.1E+04	4.1E+04	3.7E+04	4.6E+04	4.9E+04	4.6E+04	0.08	1.62	3.9E+04	5.4E+04		
5	3.9E+04	3.7E+04	3.4E+04	3.9E+04	3.7E+04	3.3E+04	3.6E+04	0.03	0.65	3.4E+04	3.8E+04		
6	3.3E+04	3.4E+04	4.6E+04	3.3E+04	3.9E+04	4.4E+04	3.8E+04	0.06	1.41	3.3E+04	4.3E+04		

附表 6 高浓度样品精密密度测试数据汇总表 (总大肠菌群) (单位: MPN/L)

实验室	测定值											95%可信限值	
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	\bar{x}_i	s_i	RSD _i	下限	上限		
	1	1.6E+07	1.3E+07	1.6E+07	1.4E+07	1.4E+07	1.6E+07	1.5E+07	0.03	0.45	1.4E+07	1.6E+07	
2	7.9E+05	8.2E+05	8.3E+05	7.7E+05	7.8E+05	8.4E+05	8.0E+05	0.02	0.26	7.8E+05	8.3E+05		
3	1.6E+07	2.4E+07	1.4E+07	1.6E+07	1.4E+07	1.3E+07	1.6E+07	0.10	1.34	1.3E+07	1.9E+07		
4	9.3E+05	8.4E+05	9.6E+05	7.7E+05	8.4E+05	9.3E+05	8.8E+05	0.04	0.62	8.1E+05	9.5E+05		
5	1.9E+06	1.3E+06	1.4E+06	1.8E+06	2.1E+06	1.7E+06	1.7E+06	0.08	1.21	1.4E+06	2.0E+06		
6	1.6E+07	1.7E+07	2.0E+07	1.7E+07	1.6E+07	2.0E+07	1.8E+07	0.04	0.62	1.6E+07	1.9E+07		

1.2.2 粪大肠菌群的精密度验证数据

附表 7 标准样品精密度测试数据汇总表 (粪大肠菌群) (单位: MPN/L)

实验室	测定值											95%可信限值	
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	\bar{x}_i	S_i	RSD _i	下限	上限		
	1	1.2E+03	1.5E+03	1.2E+03	5.6E+02	1.1E+03	1.1E+03	1.1E+03	0.14	4.74	7.8E+02	1.4E+03	
2	7.5E+02	2.9E+03	6.6E+02	9.1E+02	1.2E+03	1.8E+03	1.2E+03	0.24	7.96	7.2E+02	2.0E+03		
3	1.2E+03	7.7E+02	1.2E+03	1.1E+03	1.1E+03	9.6E+02	1.0E+03	0.07	2.44	9.0E+02	1.2E+03		
4	3.7E+03	6.1E+03	5.2E+03	2.4E+03	2.5E+03	2.6E+03	3.5E+03	0.18	4.99	2.4E+03	5.0E+03		
5	1.6E+03	9.1E+02	6.8E+02	2.4E+03	1.7E+03	4.3E+02	1.1E+03	0.28	9.19	6.1E+02	2.0E+03		
6	1.6E+03	1.7E+03	1.8E+03	1.5E+03	6.2E+02	2.1E+03	1.5E+03	0.19	5.96	9.9E+02	2.2E+03		

注: \bar{x}_i 为几何平均值, S_i 、RSD_i(%)为原始数据以10为底, 对数转化后计算所得(下同)

附表 8 低浓度样品精密度测试数据汇总表 (粪大肠菌群) (单位: MPN/L)

实验室	测定值											95%可信限值	
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	\bar{x}_i	S_i	RSD _i	下限	上限		
	1	1.7E+02	1.4E+02	8.6E+01	1.3E+02	1.6E+02	1.2E+02	1.3E+02	0.11	5.0	1.1E+02	1.6E+02	
2	3.1E+01	8.6E+01	6.3E+01	5.2E+01	1.3E+02	9.7E+01	6.9E+01	0.22	12.09	4.4E+01	1.1E+02		
3	1.1E+02	2.0E+01	9.5E+01	1.7E+02	1.3E+02	7.5E+01	8.4E+01	0.33	17.16	4.2E+01	1.7E+02		
4	8.5E+01	9.8E+01	1.2E+02	8.6E+01	1.1E+02	1.2E+02	1.0E+02	0.07	3.38	8.9E+01	1.2E+02		
5	3.1E+01	1.2E+02	3.1E+01	6.3E+01	8.6E+01	9.7E+01	6.3E+01	0.25	14.11	3.7E+01	1.1E+02		
6	9.6E+01	1.4E+02	1.2E+02	7.5E+01	1.5E+02	1.7E+02	1.2E+02	0.13	6.41	9.2E+01	1.6E+02		

附表 9 中浓度样品精密度测试数据汇总表 (粪大肠菌群) (单位: MPN/L)

实验室	测定值											95%可信限值	
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	\bar{x}_i	s_i	RSD _i	下限	上限		
	1	1.3E+04	1.7E+04	1.3E+04	1.2E+04	1.3E+04	1.4E+04	1.4E+04	0.06	1.34	1.2E+04	1.5E+04	
2	2.0E+04	1.7E+04	2.4E+04	2.0E+04	1.7E+04	2.4E+04	2.0E+04	0.07	1.51	1.8E+04	2.3E+04		
3	6.1E+03	4.6E+03	8.7E+03	5.2E+03	5.5E+03	8.2E+03	6.2E+03	0.11	2.91	4.9E+03	7.8E+03		
4	2.0E+04	1.6E+04	1.4E+04	2.0E+04	1.1E+04	1.7E+04	1.6E+04	0.10	2.28	1.3E+04	2.0E+04		
5	4.6E+03	5.8E+03	3.9E+03	5.2E+03	3.7E+03	6.1E+03	4.8E+03	0.09	2.49	4.0E+03	5.8E+03		
6	1.7E+04	1.1E+04	1.7E+04	2.0E+04	2.4E+04	1.6E+04	1.7E+04	0.11	2.67	1.3E+04	2.2E+04		

附表 10 高浓度样品精密度测试数据汇总表 (粪大肠菌群) (单位: MPN/L)

实验室	测定值											95%可信限值	
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	\bar{x}_i	s_i	RSD _i	下限	上限		
	1	5.8E+06	7.7E+06	5.8E+06	6.5E+06	5.2E+06	7.3E+06	6.3E+06	0.07	0.97	7.2E+06	5.5E+06	
2	5.5E+05	5.8E+05	5.3E+05	5.0E+05	5.0E+05	5.1E+05	5.3E+05	0.02	0.40	5.5E+05	5.0E+05		
3	2.1E+06	2.9E+06	2.5E+06	2.5E+06	2.4E+06	2.9E+06	2.5E+06	0.05	0.81	2.8E+06	2.3E+06		
4	3.0E+05	3.7E+05	2.9E+05	3.3E+05	3.6E+05	4.2E+05	3.4E+05	0.06	1.11	3.9E+05	3.0E+05		
5	2.0E+06	1.0E+06	1.1E+06	1.2E+06	2.4E+06	1.4E+06	1.5E+06	0.15	2.38	2.0E+06	1.1E+06		
6	7.3E+06	8.2E+06	8.7E+06	7.7E+06	9.2E+06	7.7E+06	8.1E+06	0.04	0.54	8.8E+06	7.5E+06		

1.2.3 大肠埃希氏菌的精密度验证数据

附表 11 标准样品精密度测试数据汇总表 (大肠埃希氏菌) (单位: MPN/L)

实验室	测定值											95%可信限值	
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	\bar{x}_i	S_i	RSD _i	下限	上限		
	1	9.9E+02	1.5E+03	1.1E+03	1.3E+03	1.4E+03	1.2E+03	1.2E+03	0.07	2.17	1.1E+03	1.4E+03	
2	7.5E+02	7.8E+02	6.8E+02	8.0E+02	7.9E+02	5.7E+02	7.2E+02	0.06	2.04	6.4E+02	8.1E+02		
3	8.4E+02	5.6E+02	7.9E+02	6.9E+02	5.4E+02	8.3E+02	7.0E+02	0.09	3.01	5.8E+02	8.3E+02		
4	7.5E+02	6.6E+02	7.3E+02	1.1E+03	8.2E+02	9.3E+02	8.1E+02	0.07	2.55	7.0E+02	9.5E+02		
5	6.3E+02	8.1E+02	7.2E+02	5.8E+02	6.3E+02	7.2E+02	6.8E+02	0.05	1.83	6.1E+02	7.5E+02		
6	5.2E+02	7.0E+02	5.8E+02	6.3E+02	7.4E+02	5.8E+02	6.2E+02	0.06	2.06	5.5E+02	7.0E+02		

注: \bar{x}_i 为几何平均值, S_i 、RSD_i(%)为原始数据以10为底,对数转化后计算所得(下同)

附表 12 低浓度样品精密度测试数据汇总表 (大肠埃希氏菌) (单位: MPN/L)

实验室	测定值											95%可信限值	
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	\bar{x}_i	S_i	RSD _i	下限	上限		
	1	9.8E+01	1.1E+02	1.1E+02	7.4E+01	1.6E+02	1.2E+02	1.1E+02	0.11	5.38	8.7E+01	1.4E+02	
2	5.2E+01	3.1E+01	6.3E+01	3.1E+01	9.8E+01	9.8E+01	5.6E+01	0.23	12.90	3.5E+01	8.9E+01		
3	5.2E+01	3.1E+01	1.1E+02	3.1E+01	6.3E+01	1.1E+02	5.8E+01	0.24	13.89	3.5E+01	9.6E+01		
4	1.2E+02	4.1E+01	9.7E+01	8.5E+01	4.1E+01	4.1E+01	6.4E+01	0.22	12.09	4.1E+01	1.0E+02		
5	1.1E+02	6.3E+01	1.4E+02	8.6E+01	9.8E+01	1.1E+02	9.7E+01	0.11	5.67	7.7E+01	1.2E+02		
6	1.0E+01	5.2E+01	3.1E+01	2.0E+01	1.0E+01	2.0E+01	2.0E+01	0.28	21.45	1.1E+01	3.6E+01		

附表 13 中浓度样品精密度测试数据汇总表 (大肠埃希氏菌) (单位: MPN/L)

实验室	测定值											RSD _i	95%可信限值	
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	\bar{x}_i	s_i			下限		上限	
1	1.0E+04	1.1E+04	8.2E+03	1.0E+04	8.2E+03	1.3E+04	9.9E+03	0.08	1.92	8.5E+03	1.2E+04			
2	6.5E+03	9.8E+03	7.7E+03	1.4E+04	9.8E+03	9.8E+03	9.3E+03	0.11	2.89	7.4E+03	1.2E+04			
3	1.0E+04	8.7E+03	9.8E+03	6.5E+03	7.7E+03	9.2E+03	8.6E+03	0.08	1.92	7.4E+03	1.0E+04			
4	8.2E+03	1.0E+04	9.2E+03	9.2E+03	8.7E+03	8.7E+03	9.0E+03	0.04	0.93	8.4E+03	9.8E+03			
5	6.9E+03	8.7E+03	8.2E+03	6.9E+03	6.1E+03	5.5E+03	6.9E+03	0.07	1.94	5.9E+03	8.1E+03			
6	8.2E+03	7.3E+03	8.7E+03	7.3E+03	5.8E+03	6.9E+03	7.3E+03	0.06	1.59	6.4E+03	8.3E+03			

附表 14 高浓度样品精密度测试数据汇总表 (大肠埃希氏菌) (单位: MPN/L)

实验室	测定值											RSD _i	95%可信限值	
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	\bar{x}_i	s_i			下限		上限	
1	5.2E+06	4.4E+06	5.5E+06	4.9E+06	5.8E+06	4.6E+06	5.0E+06	0.05	0.69	4.6E+06	5.5E+06			
2	3.1E+05	3.0E+05	2.6E+05	3.5E+05	2.5E+05	2.6E+05	2.8E+05	0.06	1.03	2.5E+05	3.2E+05			
3	3.7E+06	4.9E+06	4.4E+06	4.6E+06	3.1E+06	2.5E+06	3.7E+06	0.11	1.74	3.0E+06	4.7E+06			
4	3.5E+05	2.9E+05	2.0E+05	2.4E+05	1.9E+05	2.9E+05	2.6E+05	0.10	1.93	2.0E+05	3.1E+05			
5	2.4E+06	1.4E+06	2.0E+06	2.4E+06	2.0E+06	2.0E+06	2.0E+06	0.09	1.35	1.7E+06	2.4E+06			
6	3.4E+06	4.4E+06	3.9E+06	4.4E+06	4.4E+06	3.4E+06	4.0E+06	0.05	0.83	3.5E+06	4.4E+06			

1.3 方法准确度的测试数据

6 家验证单位的实际样品及标准样品的准确度验证数据见附表15~17。

1.3.1 总大肠菌群的准确度验证数据

附表 15 有证标准物质测试数据（总大肠菌群）（单位：MPN/L）

实验室	测定值								有证标准物质
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	\bar{x}_i	$\overline{RE}_i\%$	
1	1.9E+03	1.6E+03	1.5E+03	1.7E+03	1.3E+03	1.3E+03	1.5E+03	-3.48	2000
2	1.8E+03	1.3E+03	1.5E+03	2.0E+03	1.2E+03	1.4E+03	1.5E+03	-4.01	
3	1.6E+03	1.2E+03	1.6E+03	1.4E+03	1.5E+03	1.5E+03	1.5E+03	-4.14	
4	1.2E+03	1.2E+03	1.2E+03	1.2E+03	1.3E+03	1.3E+03	1.2E+03	-6.37	
5	1.2E+03	1.5E+03	2.0E+03	1.3E+03	1.6E+03	1.4E+03	1.5E+03	-4.10	
6	1.3E+03	1.2E+03	1.3E+03	1.2E+03	1.5E+03	1.1E+03	1.2E+03	-6.24	

注： \bar{x}_i 为几何平均值， $\overline{RE}_i\%$ 为原始数据以10为底，对数转化后计算所得

1.3.2 粪大肠菌群的准确度验证数据

附表 16 有证标准物质测试数据（粪大肠菌群）（单位：MPN/L）

实验室	测定值								有证标准物质
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	\bar{x}_i	$\overline{RE}_i\%$	
1	1.2E+03	1.5E+03	1.2E+03	5.6E+02	1.1E+03	1.1E+03	1.1E+03	-16.55	3700
2	7.5E+02	2.9E+03	6.6E+02	9.1E+02	1.2E+03	1.8E+03	1.2E+03	-14.94	
3	1.2E+03	7.7E+02	1.2E+03	1.1E+03	1.1E+03	9.6E+02	1.0E+03	-16.66	
4	3.7E+03	6.1E+03	5.2E+03	2.4E+03	2.5E+03	2.6E+03	3.5E+03	-0.81	
5	1.6E+03	9.1E+02	6.8E+02	2.4E+03	1.7E+03	4.3E+02	1.1E+03	-15.99	
6	1.6E+03	1.7E+03	1.8E+03	1.5E+03	6.2E+02	2.1E+03	1.5E+03	-12.26	

注： \bar{x}_i 为几何平均值， $\overline{RE}_i\%$ 为原始数据以10为底，对数转化后计算所得

1.3.3 大肠埃希氏菌的准确度验证数据

附表 17 有证标准物质测试数据（大肠埃希氏菌）（单位：MPN/L）

实验室	测定值								有证标准物质
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	\bar{x}_i	$\overline{RE}_i\%$	
1	9.9E+02	1.5E+03	1.1E+03	1.3E+03	1.4E+03	1.2E+03	1.2E+03	-6.33	2000
2	7.5E+02	7.8E+02	6.8E+02	8.0E+02	7.9E+02	5.7E+02	7.2E+02	-13.42	
3	8.4E+02	5.6E+02	7.9E+02	6.9E+02	5.4E+02	8.3E+02	7.0E+02	-13.86	
4	7.5E+02	6.6E+02	7.3E+02	1.1E+03	8.2E+02	9.3E+02	8.1E+02	-11.82	
5	6.3E+02	8.1E+02	7.2E+02	5.8E+02	6.3E+02	7.2E+02	6.8E+02	-14.26	
6	5.2E+02	7.0E+02	5.8E+02	6.3E+02	7.4E+02	5.8E+02	6.2E+02	-15.42	

注： \bar{x}_i 为几何平均值， $\overline{RE}_i\%$ 为原始数据以10为底，对数转化后计算所得

2 方法验证数据汇总

2.1 方法精密度数据汇总

附表18~20是6家实验室方法验证结果中总大肠菌群、粪大肠菌群、大肠埃希氏菌的精密度测试结果的统计分析。

附表 18 总大肠菌群精密度测试数据汇总表

实验室	低浓度						中浓度						高浓度						标准样品					
	\bar{x}_i	s_i	RSD _i	室内 95%可信限值		\bar{x}_i	s_i	RSD _i	室内 95%可信限值		\bar{x}_i	s_i	RSD _i	室内 95%可信限值		\bar{x}_i	s_i	RSD _i	室内 95%可信限值					
				下限	上限				下限	上限				下限	上限				下限	上限				
1	9.0E+02	0.05	1.84	8.1E+02	1.0E+03	4.9E+04	0.05	1.12	4.4E+04	5.4E+04	1.5E+07	0.03	0.45	1.4E+07	1.6E+07	1.5E+03	0.07	2.05	1.3E+03	1.8E+03				
2	4.2E+02	0.09	3.33	3.5E+02	5.0E+02	3.5E+04	0.05	1.03	3.2E+04	3.9E+04	8.0E+05	0.02	0.26	7.8E+05	8.3E+05	1.5E+03	0.09	2.78	1.2E+03	1.8E+03				
3	5.9E+02	0.07	2.67	5.0E+02	6.9E+02	3.9E+04	0.09	2.03	3.2E+04	4.7E+04	1.6E+07	0.10	1.34	1.3E+07	1.9E+07	1.5E+03	0.05	1.48	1.3E+03	1.6E+03				
4	8.1E+02	0.11	3.75	6.4E+02	1.0E+03	4.6E+04	0.08	1.62	3.9E+04	5.4E+04	8.8E+05	0.04	0.62	8.1E+05	9.5E+05	1.2E+03	0.02	0.68	1.2E+03	1.3E+03				
5	5.7E+02	0.04	1.35	5.3E+02	6.2E+02	3.6E+04	0.03	0.65	3.4E+04	3.8E+04	1.7E+06	0.08	1.21	1.4E+06	2.0E+06	1.5E+03	0.08	2.41	1.3E+03	1.7E+03				
6	6.6E+02	0.07	2.37	5.7E+02	7.6E+02	3.8E+04	0.06	1.41	3.3E+04	4.3E+04	1.8E+07	0.04	0.62	1.6E+07	1.9E+07	1.2E+03	0.05	1.60	1.1E+03	1.4E+03				
$\bar{\bar{x}}_i$	6.4E+02						4.0E+04						4.1E+06						1.4E+03					
S'	0.12						0.06						0.66						0.04					
RSD'	4.22						1.27						9.91						1.31					
r	0.21						0.18						0.17						0.18					
R	0.38						0.23						1.84						0.20					
下限	5.5E+02						3.5E+04						3.7E+06						1.8E+03					
上限	7.4E+02						4.6E+04						4.6E+06						2.3E+03					

附表 19 粪大肠菌群精密度测试数据汇总

实验室	低浓度						中浓度						高浓度						标准样品			
	\bar{x}_i	s_i	RSD _i	室内 95%可信限值		\bar{x}_i	s_i	RSD _i	室内 95%可信限值		\bar{x}_i	s_i	RSD _i	室内 95%可信限值		\bar{x}_i	s_i	RSD _i	室内 95%可信限值			
				下限	上限				下限	上限				下限	上限				下限	上限		
1	1.3E+02	0.11	5.0	1.1E+02	1.6E+02	1.4E+04	0.06	1.34	1.2E+04	1.5E+04	6.3E+06	0.07	0.97	7.2E+06	5.5E+06	1.1E+03	0.14	4.74	7.8E+02	1.4E+03		
2	6.9E+01	0.22	12.09	4.4E+01	1.1E+02	2.0E+04	0.07	1.51	1.8E+04	2.3E+04	5.3E+05	0.02	0.40	5.5E+05	5.0E+05	1.2E+03	0.24	7.96	7.2E+02	2.0E+03		
3	8.4E+01	0.33	17.16	4.2E+01	1.7E+02	6.2E+03	0.11	2.91	4.9E+03	7.8E+03	2.5E+06	0.05	0.81	2.8E+06	2.3E+06	1.0E+03	0.07	2.44	9.0E+02	1.2E+03		
4	1.0E+02	0.07	3.38	8.9E+01	1.2E+02	1.6E+04	0.10	2.28	1.3E+04	2.0E+04	3.4E+05	0.06	1.11	3.9E+05	3.0E+05	3.5E+03	0.18	4.99	2.4E+03	5.0E+03		
5	6.3E+01	0.25	14.11	3.7E+01	1.1E+02	4.8E+03	0.09	2.49	4.0E+03	5.8E+03	1.5E+06	0.15	2.38	2.0E+06	1.1E+06	1.1E+03	0.28	9.19	6.1E+02	2.0E+03		
6	1.2E+02	0.13	6.41	9.2E+01	1.6E+02	1.7E+04	0.11	2.67	1.3E+04	2.2E+04	8.1E+06	0.04	0.54	8.8E+06	7.5E+06	1.5E+03	0.19	5.96	9.9E+02	2.2E+03		
$\bar{\bar{x}}_i$			9.2E+01					1.1E+04					1.8E+06					1.4E+03				
S'			0.13					0.26					0.56					0.20				
RSD'			6.60					6.36					8.93					6.43				
r			0.58					0.26					0.22					0.55				
R			0.64					0.76					1.58					0.75				
下限			6.2E+01					9.5E+03					1.6E+06					2.5E+03				
上限			1.3E+02					1.4E+04					2.1E+06					5.4E+03				

附表 20 大肠埃希氏菌精密度测试数据汇总

实验室	低浓度						中浓度						高浓度						标准样品			
	\bar{x}_i	s_i	RSD _i	室内 95%可信限值		\bar{x}_i	s_i	RSD _i	室内 95%可信限值		\bar{x}_i	s_i	RSD _i	室内 95%可信限值		\bar{x}_i	s_i	RSD _i	室内 95%可信限值			
				下限	上限				下限	上限				下限	上限				下限	上限		
1	1.1E+02	0.11	5.38	8.7E+01	1.4E+02	9.9E+03	0.08	1.92	8.5E+03	1.2E+04	5.0E+06	0.05	0.69	4.6E+06	5.5E+06	1.2E+03	0.07	2.17	1.1E+03	1.4E+03		
2	5.6E+01	0.23	12.90	3.5E+01	8.9E+01	9.3E+03	0.11	2.89	7.4E+03	1.2E+04	2.8E+05	0.06	1.03	2.5E+05	3.2E+05	7.2E+02	0.06	2.04	6.4E+02	8.1E+02		
3	5.8E+01	0.24	13.89	3.5E+01	9.6E+01	8.6E+03	0.08	1.92	7.4E+03	1.0E+04	3.7E+06	0.11	1.74	3.0E+06	4.7E+06	7.0E+02	0.09	3.01	5.8E+02	8.3E+02		
4	6.4E+01	0.22	12.09	4.1E+01	1.0E+02	9.0E+03	0.04	0.93	8.4E+03	9.8E+03	2.6E+05	0.10	1.93	2.0E+05	3.1E+05	8.1E+02	0.07	2.55	7.0E+02	9.5E+02		
5	9.7E+01	0.11	5.67	7.7E+01	1.2E+02	6.9E+03	0.07	1.94	5.9E+03	8.1E+03	2.0E+06	0.09	1.35	1.7E+06	2.4E+06	6.8E+02	0.05	1.83	6.1E+02	7.5E+02		
6	2.0E+01	0.28	21.45	1.1E+01	3.6E+01	7.3E+03	0.06	1.59	6.4E+03	8.3E+03	4.0E+06	0.05	0.83	3.5E+06	4.4E+06	6.2E+02	0.06	2.06	5.5E+02	7.0E+02		
$\bar{\bar{x}}$	5.9E+01						8.5E+03						1.5E+06						7.7E+02			
S'	0.26						0.06						0.59						0.11			
RSD'	14.72						1.57						9.58						3.72			
r	0.58						0.21						0.23						0.19			
R	0.90						0.26						1.67						0.35			
下限	3.9E+01						7.3E+03						1.3E+06						1.7E+03			
上限	9.0E+01						9.9E+03						1.7E+06						2.3E+03			

2.2 方法准确度数据汇总

附表21~23是6家实验室方法验证中总大肠菌群、粪大肠菌群、大肠埃希氏菌的准确度测试结果的统计分析。

附表 21 总大肠菌群标准样品测试数据汇总

实验室号	标准样品	
	\bar{x}_i	$\overline{RE}_i\%$
1	1.5E+03	-3.48
2	1.5E+03	-4.01
3	1.5E+03	-4.14
4	1.2E+03	-6.37
5	1.5E+03	-4.10
6	1.2E+03	-6.24
$\overline{RE}\%$	-4.72	
S_{RE}	1.25	

附表 22 粪大肠菌群标准样品测试数据汇总

实验室号	标准样品	
	\bar{x}_i	$\overline{RE}_i\%$
1	1.1E+03	-16.55
2	1.2E+03	-14.94
3	1.0E+03	-16.66
4	3.5E+03	-0.81
5	1.1E+03	-15.99
6	1.5E+03	-12.26
$\overline{RE}\%$	-12.87	
S_{RE}	6.13	

附表 23 大肠埃希氏菌标准样品测试数据汇总

实验室号	标准样品	
	\bar{x}_i	$\overline{RE}_i\%$
1	1.2E+03	-6.33
2	7.2E+02	-13.42
3	7.0E+02	-13.86
4	8.1E+02	-11.82
5	6.8E+02	-14.26
6	6.2E+02	-15.42
$\overline{RE}\%$	-12.52	
S_{RE}	3.25	

3 方法验证结论

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。

3.1 精密度

6家实验室分别对高浓度（ 9.0×10^7 MPN/L）、中浓度（ 4.0×10^4 MPN/L）、低浓度（ 6.0×10^2 MPN/L）的实际样品以及有证标准品（2000 MPN/L），进行总大肠菌群的测定。实验室内的相对标准偏差范围分别为：0.26%~1.3%、0.65%~2.0%、1.3%~3.7%、0.68%~2.8%；实验室间的相对标准偏差为分别为：9.9%、1.3%、4.2%、1.3%。重复性限为0.17、0.18、0.21、0.18；再现性限为1.84、0.23、0.38、0.20。实验室内置信区间分别为 $7.8 \times 10^5 \sim 1.9 \times 10^7$ MPN/L、 $3.2 \times 10^4 \sim 5.4 \times 10^4$ MPN/L、 $3.5 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^3$ MPN/L、 $1.1 \times 10^3 \sim 1.8 \times 10^3$ MPN/L，实验室间置信区间分别为 $3.7 \times 10^6 \sim 4.6 \times 10^6$ MPN/L、 $3.5 \times 10^4 \sim 4.6 \times 10^4$ MPN/L、 $5.5 \times 10^2 \sim 7.4 \times 10^2$ MPN/L、 $1.8 \times 10^3 \sim 2.3 \times 10^3$ MPN/L。

6家实验室分别对高浓度（ 2.0×10^6 MPN/L）、中浓度（ 9.0×10^3 MPN/L）、低浓度（70 MPN/L）的实际样品以及有证标准品（2000 MPN/L），进行大肠埃希氏菌群的测定。实验室内的相对标准偏差范围分别为：0.69%~1.9%、0.93%~2.9%、5.4%~21%、1.8%~3.0%；实验室间的相对标准偏差为分别为9.6%、1.6%、15%、3.7%。重复性限为0.23、0.21、0.58、0.19；再现性限为1.67、0.26、0.90、0.35。实验室内置信区间分别为 $2.0 \times 10^5 \sim 5.5 \times 10^6$ MPN/L、 $5.9 \times 10^3 \sim 1.2 \times 10^4$ MPN/L、 $1.1 \times 10^1 \sim 1.4 \times 10^2$ MPN/L、 $5.5 \times 10^2 \sim 1.4 \times 10^3$ MPN/L，实验室间置信区间分别为 $1.3 \times 10^6 \sim 1.7 \times 10^6$ MPN/L、 $7.3 \times 10^3 \sim 9.8 \times 10^3$ MPN/L、 $3.9 \times 10^1 \sim 9.0 \times 10^1$ MPN/L、 $1.7 \times 10^3 \sim 2.3 \times 10^3$ MPN/L。

6家实验室分别对高浓度（ 3.0×10^6 MPN/L）、中浓度（ 1.3×10^4 MPN/L）、低浓度（ 1.0×10^2 MPN/L）的实际样品以及有证标准品（3700 MPN/L），进行粪大肠菌群的测定。实验室内的相对标准偏差范围分别为：0.40%~2.4%、1.3%~2.9%、3.4%~17%、2.4%~9.2%；实验室间的相对标准偏差为分别为：8.9%、6.4%、6.6%、6.4%。重复性限为0.22、0.26、0.58、0.55；再现性限为1.58、0.76、0.64、0.75。实验室内置信区间分别为 $3.0 \times 10^5 \sim 8.8 \times 10^6$ MPN/L、 $4.0 \times 10^3 \sim 2.3 \times 10^4$ MPN/L、 $3.7 \times 10^1 \sim 1.7 \times 10^2$ MPN/L、 $6.1 \times 10^2 \sim 5.0 \times 10^3$ MPN/L，实验室间置信区间分别为 $1.6 \times 10^6 \sim 2.1 \times 10^6$ MPN/L、 $9.5 \times 10^3 \sim 1.4 \times 10^4$ MPN/L、 $6.2 \times 10^1 \sim 1.3 \times 10^2$ MPN/L、 $2.5 \times 10^3 \sim 5.4 \times 10^3$ MPN/L。

3.2 准确度

6家合格实验室分别对总大肠菌群有证标样（2000 MPN/L）进行测定。实验室内的相

对误差范围为：-6.4%~-3.5%；相对误差的最终值为：-4.7%±1.2%。

6家合格实验室分别对大肠埃希氏菌群有证标样（2000 MPN/L）进行测定。实验室内的相对误差范围为：-15%~-6.3%；相对误差的最终值为：-13%±3.3%。

6家合格实验室分别对粪大肠菌群的有证标样（3700 MPN/L）进行测定。实验室内的相对误差范围为：-17%~-0.81%；相对误差的最终值为：-13%±6.1%。