

附件7

《水质（粪）大肠菌群的测定 纸片快速法》

（征求意见稿）编制说明

《水质（粪）大肠菌群的测定 纸片快速法》编制组

二〇一三年五月

项目名称：水质（粪）大肠菌群的测定 纸片快速法

项目统一编号：987

承担单位：常州市环境监测中心、环境保护部环境标准研究所

编制组主要成员：丁程成、章建宁、徐东炯、沈丽娟、张翔、汤云、
张小琼、陈桥

标准所技术管理负责人：宫玥、周羽化

标准处项目负责人：雷晶

目 录

1 项目背景.....	4
1.1 任务来源.....	4
1.2 工作过程.....	4
2 标准制订的必要性分析.....	5
2.1 （粪）大肠菌群的环境危害.....	5
2.2 相关环保标准和环保工作的需要.....	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
4 标准制修订的基本原则和技术路线.....	8
4.1 标准制修订的基本原则.....	9
4.2 标准制修订的技术路线.....	9
5 方法研究报告.....	10
5.1 方法研究的目标.....	10
5.2 方法原理.....	10
5.3 试剂和材料.....	10
5.4 仪器和设备.....	11
5.5 样品.....	11
5.6 分析步骤.....	11
5.7 结果计算与表示.....	18
5.8 质量保证和质量控制.....	18
5.9 废物处理.....	18
6 方法验证.....	18
6.1 方法验证方案.....	18
6.2 方法验证过程.....	19
7 参考文献.....	19
附一 方法验证报告.....	21

《水质（粪）大肠菌群的测定 纸片快速法》编制说明

1 项目背景

1.1 任务来源

(1) 2009年5月,国家环境保护部公布了《关于开展2009年度国家环境保护标准制修订项目工作的通知》(环办函[2009]221号),科技标准司向常州市环境监测中心下达了标准编制任务,由江苏省常州市环境监测中心承担《水质(粪)大肠菌群的测定 纸片快速法》,该标准制订任务列入2009年度国家环境保护标准制修订项目计划,项目统一编号为:987。

(2) 本标准制订任务的承担单位为江苏省常州市环境监测中心,参加单位有:江苏省环境监测中心、江苏省南京市环境监测中心站、常州邦达诚科技有限公司。

1.2 工作过程

(1) 成立标准编制组

2009年5月,常州市环境监测中心接到制订《水质(粪)大肠菌群的测定 纸片快速法》的任务后,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) 查询国内外相关标准和文献资料

2009年6月-11月,本标准编制组成员根据国家环境保护标准制修订管理办法的相关规定,检索和收集了国内外相关标准和文献资料,了解国内外相关分析方法进展和我国相关质量标准及排放标准。同时,着手标准方法的研究及起草标准方法草案。

(3) 召开专家研讨会,研究建立标准方法,开展方法试验

2009年12月,按照制订标准的要求,参照国内外相关方法和文献,并邀请专家就标准编制的重点、难点进行研讨,确定了实验方案。2010年1月-10月进行标准方法研究及试验。编写《水质(粪)大肠菌群的测定 纸片快速法》的标准草案和开题论证报告。

(4) 组织专家论证,确定标准制订的技术路线和原则

2010年11月,标准开题论证报告和标准草案通过了环保部科技标准司组织的专家论证,论证委员会建议将本标准定位为一种快速筛查方法,并提出了修改建议。根据与会专家的具体意见和建议,明确了下一步的工作方向:进一步明确标准的适用范围;补充纸片的技术规格要求和检查程序;在结果判定中补充图片(作为附录);明确测定范围;“分析步骤”中定量化描述稀释度。

(5) 落实专家意见,深入开展方法试验研究

2010年12月-2011年8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》(HJ 168-2010)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)等文件的要求开展《水质(粪)大肠菌群的测定 纸片快速法》的相关试验。并准备实验室方法验证工作,着手编写《水质(粪)大肠菌群的测定 纸片快速法》

标准征求意见稿及方法验证方案。

(6) 方法验证工作

2011年9月-12月,组织了6家有资质的实验室进行方法验证,于2012年1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(粪)大肠菌群的测定 纸片快速法》验证报告。同时完善《水质(粪)大肠菌群的测定 纸片快速法》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

2012年2月,完成《水质(粪)大肠菌群的测定 纸片快速法》的标准征求意见稿及编制说明的编写。

2 标准制订的必要性分析

2.1 (粪)大肠菌群的环境危害

本标准中(粪)大肠菌群测定是指总大肠菌群和粪大肠菌群的测定,总大肠菌群和粪大肠菌群并非细菌学分类命名,而是卫生学用语,它们指的不是某一种或某一属细菌,而是具有某些特性且与粪便污染有关的一组细菌。它们分布广泛,见于人和动物的粪便、土壤、水和食品中。

总大肠菌群是指一类在37℃下24小时内发酵乳糖产酸产气、需氧及兼性厌氧的革兰氏阴性的无芽孢杆菌,包括埃希氏菌属、柠檬酸菌属、克雷伯菌属、肠杆菌属等细菌,其在营养琼脂上的菌落一般表现为光滑、低凸、湿润、表面有光泽、边缘整齐等特点,它们来自人畜粪便及自然环境,能间接指示粪便污染。粪大肠菌群(耐热大肠菌群)是总大肠菌群的一部分,在44.5℃下能生长并发酵乳糖产酸产气,主要包括埃希氏菌属和耐热的克雷伯菌属细菌,它主要来自粪便,可以指示粪便污染,由于在自然界中易死亡,其存在可反映受到了比较近期的粪便污染。

总大肠菌群和粪大肠菌群指标的高低反映粪便污染的程度,进而指示肠道致病菌污染危害人体健康的风险。此外,它们还可以直接成为病原体,埃希氏菌属、柠檬酸菌属、克雷伯菌属、肠杆菌属细菌均为条件致病菌,可引起泌尿道、呼吸道、伤口和中枢神经系统的感染,还可引起各种急、慢性肠道感染、食物中毒、旅行者腹泻及肠热症等。此外,大肠埃希菌部分血清型菌株与某些人畜肠道传染病密切相关,例如,肠出血性大肠埃希菌O-157:H7,引起人出血性腹泻和肠炎且并发溶血性尿毒综合症等。

2.2 相关环保标准和环保工作的需要

总大肠菌群和粪大肠菌群是世界各国环境管理中最具代表性的卫生学指标,美国、欧盟、法国、德国、意大利、英国及俄罗斯等均以太大肠菌群、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。

我国《地表水环境质量标准》(GB3838-2002)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、40000个/L。此外,《生活饮用水卫生标准》(GB5749-2006)、《海水水质标准》(GB3097-1997)、《农田灌溉水质标准》(GB5084-2005)、《渔业水质标准》(GB11607-1989)、《地下水质量标准》(GB/T14848-1993)等都对总大肠菌群或粪大肠菌群限值做了明确规定。

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》(GB18466-2005)、《生活垃圾填埋场污染控制标准》(GB16889-2008)、《畜禽养殖业污染物排放标准》(GB18596-2001)、《生物工程类制药工业水污染物排放标准》(GB21907-2008)、《城镇污水处理厂污染物排放标准》(GB18918-2002)、《肉类加工工业水污染物排放标准》(GB13457-1992)等排放标准都规定了总大肠菌群或粪大肠菌群的排放限值。随着国家对环保监督力度的加大,迫切需要对水体总大肠菌群和粪大肠菌群进行快速测定,以提高工作效率,加大对重点污染源的监督力度。

当前,这些标准使用的监测方法主要为多管发酵法和滤膜法(见表1),缺少方便快捷的检测方法,本标准的制订在一定程度上满足了当前环境管理时效性的迫切需求,将对饮用水水质保障、农产品及渔产品食品安全、医院及畜禽养殖业污水监管等环境保护重点工作起到积极的支撑作用。

表1: 环境质量标准与污染物排放(控制)标准的(粪)大肠菌群监测方法

标准类型	标准名称	排放限值	监测方法
环境质量标准	地表水环境质量标准(GB3838-2002)	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	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)
	海水水质标准(GB3097-1997)	I类、II类和III类海水总大肠菌群限值 10000个/L; 粪大肠菌群限值 2000个/L	海洋监测规范 第7部分: 近海污染生态调查和生物监测(GB 17378.7-2007)/ 发酵法、滤膜法
	地下水质量标准(GB/T14848-93)	总大肠菌群的限值为: I、II和III类 3.0个/L; IV类为 100	生活饮用水标准检验方法(GB5750-2006)/ 多管发酵法、滤膜法
	农田灌溉水质标准(GB5084-2005)	粪大肠菌群的限值,水作,旱作和蔬菜均为 10000个/L	
	渔业水质标准(GB11607-89)	总大肠菌群限值,贝类养殖为 500个/L,其它为 5000个/L	
污染物排放标准	生活垃圾填埋场污染控制标准(GB16889-2008)	粪大肠菌群排放限值 10000个/L	
	生物工程类制药工业水污染物排放标准(GB21907-2008)	粪大肠菌群排放限值 500个/L; 特别排放限值为 100个/L	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)
	城镇污水处理厂污染物排放标准(GB18918-2002)	粪大肠菌群排放限值 10^3 个/L 一级标准 A 标准; 10^4 个/L 一级标准 B 标准; 10^4 个/L 二级标准	
	畜禽养殖业污染物排放标准(GB18596-2001)	粪大肠菌群日均最高浓度 10000个/L	生活饮用水标准检验方法(GB5750-2006)/ 多管发酵法
	肉类加工工业水污染物排放标准(GB 13457-92)	总大肠菌群限值一级标准 5000个/L, 92后建成的的二级标准为 10000个/L	
	医疗机构水污染物排放	传染病医院粪大肠菌群排放限	该标准附录 A 医疗机

标准（GB18466-2005）	值 100 个/L；综合医院及其他医院排放限值 500 个/L	构污水和污泥中粪大肠菌群的检验方法 / 多管发酵法
------------------	---------------------------------	---------------------------

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

3.1.1 国外标准分析方法的特点、应用情况

在国际上，总大肠菌群及粪大肠菌群检测，多管发酵法是经典方法，而滤膜法是目前采用广泛的方法，它们共同成为上述两项指标检测的主流方法。数十年来，滤膜法以检测结果的高度再现性，精密性广泛应用在水质细菌学检测上，更适用于较清洁的水样。

欧美滤膜法主要差异在于培养基成分的不同，首先，在总大肠菌群的检测中，美国 EPA（Environmental Protection Agency，美国环保署）方法 1604 中使用的是 MI 培养基，可同时检测总大肠菌群和大肠埃希氏菌，适用于饮用水源、饮用水、包装饮用水、地表水、海水、地下水、工业污水、食品、医药品、医院样品或其他环境样品中总大肠菌群的检测。APHA（American Public Health Association，美国公共卫生协会）出版的《水和废水标准监测方法》（21 版）中使用的是 m-T7 培养基或远藤氏培养基，适用于检测饮用水、工业废水、海水等水样中的总大肠菌群。欧盟各国主要采用 ISO（International Organization for Standardization，国际标准化组织）方法标准“Water quality — Detection and enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria — Part 1: Membrane filtration method（ISO 9308-1:2000）”进行总（粪）大肠菌群检测，其滤膜法使用的培养基是 Tergitol 7 培养基，适用于用于饮用水（源）等常规水质分析。其次，在粪大肠菌群的检测中，EPA、APHA 用的是 M-FC 培养基，适用于检测海水、饮用水（源）、地表水、污水等。ISO 滤膜法中使用的培养基是 Tergitol 7 培养基，适用于一般水样的分析。Tergitol 7 培养基以 TTC 作为（粪）大肠菌群生长（产气）的指示剂，以溴百里酚兰作为酸碱（产酸）指示剂。该培养基是 Chapman 在 1947 年发明，并于 1951 年加入 TTC 进行改进，形成当前欧盟各国广泛使用的 Tergitol 7 培养基。

纸片法的总大肠菌群及粪大肠菌群检测在西方发达国家采用较少，一般在第三世界国家采用较多，如 WHO（世界卫生组织）推荐、印度等国采用的 H₂S 纸片法，该方法快速、便捷、廉价，适用于乡村及边远地区饮用水、地表水等水样的快速检测，对我们编制本标准有一定借鉴意义。

3.1.2 国外（粪）大肠菌群检测方法的发展趋势

在总大肠菌群及粪大肠菌群检测的新方法研究中，现代分子生物学方法的应用是一大特点，例如聚合酶链式反应（PCR）技术、荧光原位杂交（FISH）技术、免疫荧光技术、生物芯片技术等等，目前，这些方法多处于研究阶段，真正形成标准分析方法的不多。

总大肠菌群及粪大肠菌群检测技术的又一个发展方向是在线检测，其原理多样，如酶底物法、膜荧光法等等，已有一些商业化产品的应用，实现了饮用水源等重点场所的实时连续监控。

研发快速、简便的检测方法是总大肠菌群及粪大肠菌群检测技术发展的第三个特点，已出现了 7 小时粪大肠菌群检测、生物发光检测及 ¹⁴C 放射性检测等快速检测方法，¹⁴C 放射

性检测可将（粪）大肠菌群的检测时间缩至 5 小时，而生物发光检测更可将检测时间缩至 1 小时。

3.1.3 与本方法标准的关系

本方法标准与 ISO 9308-1:2000 中滤膜法的原理是一致的，二者均采用 TTC 作为（粪）大肠菌群生长的指示剂；与 WHO 推荐的纸片法在试验载体上是相同的，均为普通滤纸；与经典的多管发酵法在统计设计上是相同的，均采用最可能数法（MPN）进行结果计算和表达。

3.2 国内相关分析方法研究

3.2.1 说明国内相关分析方法的特点、应用情况

在我国，多管发酵法是各级环境监测部门普遍采用的经典方法，随着技术发展及管理要求的提高，滤膜法、酶底物法等方法也开始得到应用，纸片法以其快速、简便、廉价的特点越来越得到人们的重视。1955 年，Foerg 建立了纸片法[Laboratory Practice (1956) 5 (12) 439]，并在欧洲奶制品检测方面得到应用。而后，纸片法传入国内，该方法在操作时间上较现行的多管发酵法有所减少，培养时间减为 18-24 小时，携带方便，操作简单，便于掌握，不需要进行复发酵试验，已用于水质、食品及饮餐具卫生学检测。

当前，纸片法是我国《食（饮）具消毒卫生标准》（GB14934-94）和《公共场所茶具微生物检验方法》（GB/T18204.3-2000）的标准检验方法，用于定性检测（茶）餐具的消毒效果，在各级疾病控制部门得到广泛应用。此外，它也是我国《水和废水监测分析方法（第四版）》中的推荐方法（C 类方法），在实际水质监测工作中，纸片法的应用正逐年增多。

方东（1996）利用纸片法对南京市饮用水源水和地表水中总大肠菌群进行检测，并通过 12 个实验室进行验证，结果表明纸片法与多管发酵法的测定结果基本一致。朱健文（2000）利用纸片法对灌南县饮用水源水和地表水中总大肠菌群进行检测，并通过 6 个实验室的验证，表明纸片法与多管发酵法的测定结果基本一致。韩桂春（2003）使用纸片法对抚顺市生活污水处理厂加氯消毒排放污水进行粪大肠菌群检测，并与发酵法对照，结果表明纸片法与发酵法获得结果基本一致，纸片法可以替代发酵法检测生活污水中粪大肠菌群。赵凌宇（2007）用纸片法对苏州的阳澄湖、太湖、京杭运河苏州段的粪大肠菌群进行检测，结果表明纸片法与多管发酵法无显著性差异。马乐好等（2007）利用纸片法对自来水、地表水、桶装饮用水、污水等进行总大肠菌群的检测，结果表明纸片法与试管发酵法阳性符合率为 97.1%。王萍等（2009）也指出，通过对培养基进行改良，加入一定浓度的革兰氏阳性抑菌剂（去氧胆酸钠）和显色剂（TTC），可一步完成总大肠菌群的检测，并使用标准菌株做了对比实验，结果证明，纸片法准确性较好，与多管发酵法无显著性差异。

3.2.2 与本方法标准的关系

本标准的制订主要参照《水和废水监测分析方法（第四版）》中纸片法进行，同时结合前人的研究成果，根据当前我国环境监测技术的发展方向和环境监测部门的技术装备水平，制订出符合我国环境保护工作要求的标准分析方法。

4 标准制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) 等文件的要求, 以国内外方法标准及文献为基础而编制。

- (1) 方法的检出限和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装备, 具备(粪) 大肠菌群检测能力。

纸片快速法实现了(粪) 大肠菌群的一步检测, 价格低廉。在仪器设备上, 与经典的多管发酵法基本一致, 但纸片法将检测时间压缩到 24 小时以内, 且不需要前期繁杂的培养基准备, 采样即可分析, 后期只需灭菌处理, 无需大量洗涤工作。因此, 纸片快速法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。

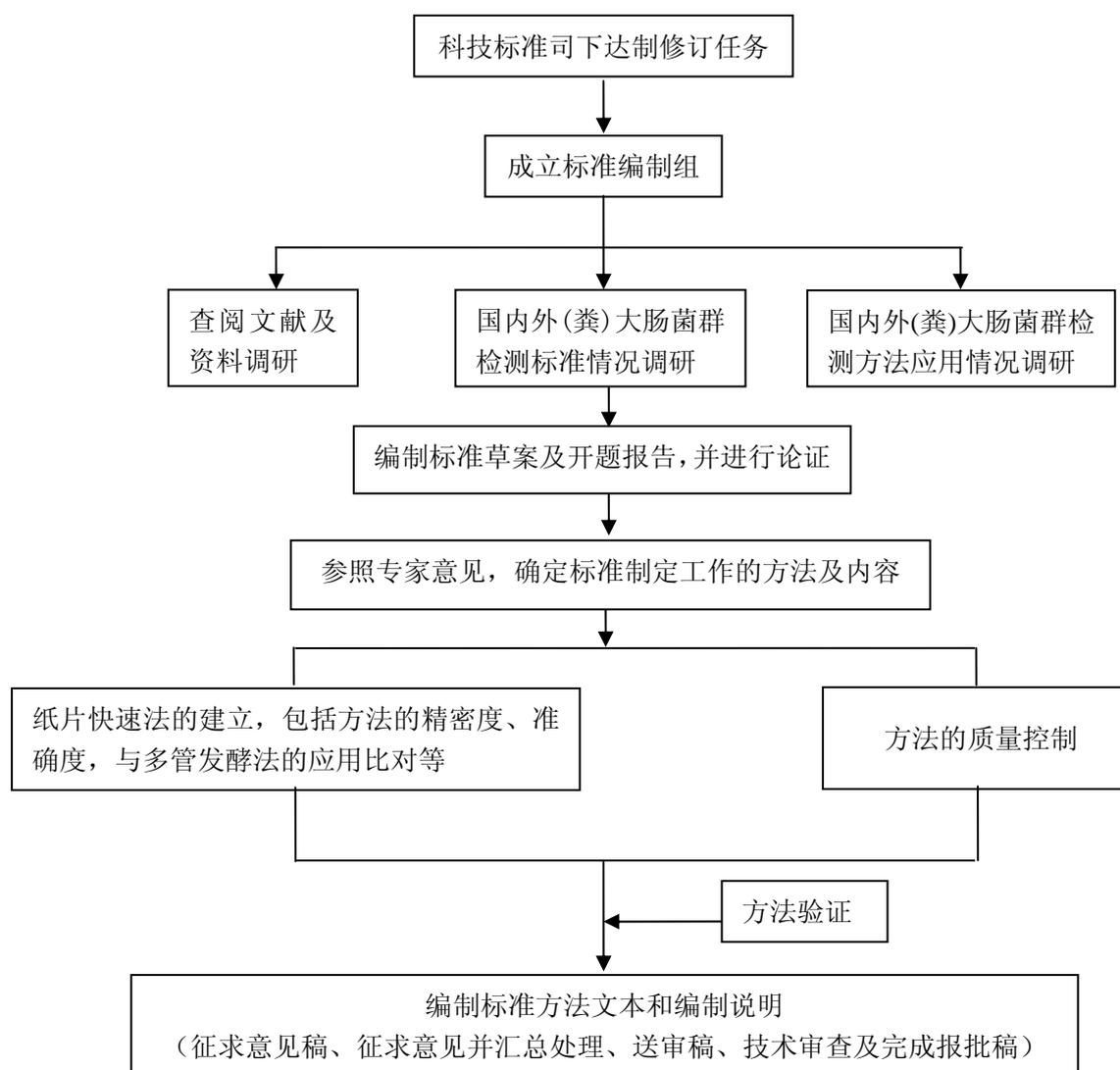


图 1: 纸片快速法标准编制的技术路线图

5 方法研究报告

5.1 方法研究的目标

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

通过实验和验证确定方法的可行性和适用性。

本标准的检出限为 20 MPN/L。本方法是以最可能数 (most probable number, 简称 MPN) 来表示检测结果的, 这与经典的多管发酵法是一致的, 所以本标准的检出限与多管发酵法相同, 为一个定值。

5.2 方法原理

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

5.3 试剂和材料

除非另有说明, 分析时均使用符合国家标准分析纯化学试剂。

(1) 市售水质总大肠菌群、粪大肠菌群测试纸片: 10ml 水样量纸片、1ml 水样量纸片。对纸片的技术规格和质量鉴定制订了相应的鉴定标准, 内容如下:

- ① 外层铝箔包装袋应密封完好, 内包装聚丙烯塑膜袋无破损。
- ② 感官上, 纸片外观应整洁无毛边, 无损坏, 呈均匀淡青色, 加去离子水或蒸馏水后呈紫色, 无论加水与否, 应无杂色斑点, 无明显变形, 表面平整。
- ③ 纸片加入相应水样, 充分浸润、吸收后, 将内包装聚丙烯塑膜袋倒置, 袋口应无水滴悬挂。
- ④ 纸片以去离子水或蒸馏水充分润湿后, 其 pH 值应在 7.0~7.4 范围内。
- ⑤ 纸片和内包装聚丙烯塑膜袋应无菌, 加入相应水量的无菌水, 37°C±1°C 培养 24h 后, 纸片应无微生物生长, 其紫色保持不变, 且无红斑出现。
- ⑥ 使用有证标准菌株进行阳性、阴性质量检验, 其中, 总大肠菌群测定的阳性菌株为大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*), 阴性菌株为金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*), 培养温度为 37°C±1°C; 粪大肠菌群测定的阳性菌株为大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*), 阴性菌株为产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*), 培养温度为 44.5°C±0.5°C。上述标准菌株均制成浓度为 300~3000 个/ml 的菌悬液, 取相应水量的菌悬液接种纸片, 分别在上述不同温度条件下培养 18-24h 后观察结果, 大肠埃希氏菌应呈现阳性反应, 金黄色葡萄球菌及产气肠杆菌应呈现阴性反应。

(2) 无菌水: 用新制备的去离子水或蒸馏水, 按无菌操作要求, 121°C 高压蒸汽灭菌 20min, 备用。

(3) 硫代硫酸钠溶液: $\rho(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)=0.10\text{g/ml}$, 称取硫代硫酸钠 10g。溶于适量蒸馏水 (或去离子水) 中, 稀释至 100ml, 现配。

(4) 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA-Na₂) 溶液: ρ (C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂·2H₂O)=0.15g/ml。称取 EDTA-Na₂ 15g, 溶于适量蒸馏水 (或去离子水) 中, 稀释至 100ml, 此溶液保质期为 30d。

5.4 仪器和设备

- (1) 恒温培养箱: 37°C±1°C。
- (2) 恒温培养箱: 44.5°C±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) 冰箱: 0°C-4°C
- (5) 试管: ϕ 15mm×150mm
- (6) 移液管: 1±0.01ml、10±0.1ml
- (7) 采样瓶: 500ml
- (8) 移液管、试管、采样瓶等玻璃器皿试验前按无菌操作要求包扎, 121°C 高压蒸汽灭菌 20min, 烘干, 备用。

5.5 样品

(1) 用灭菌器具, 按照 HJ/T91 的规定及无菌操作的要求, 采集水样 400ml 放入灭菌的采样瓶中。如果是经加氯处理的废水, 需在采样瓶灭菌前加入硫代硫酸钠溶液 (5.3) 0.4ml (10mg 硫代硫酸钠可保证去除水样中 1.5mg 余氯, 硫代硫酸钠用量可根据水样实际余氯量调整); 如果是重金属离子含量较高的废水, 则在采样瓶灭菌前加入乙二胺四乙酸二钠 (EDTA-Na₂) 溶液 (5.3) 1.2ml, 以消除干扰。酸性样品, 需调节样品的 pH 值至 7.0-8.0。

以上采样方法根据美国《standard methods for the examination of water & wastewater 21st edition (水与废水标准检验方法 21 版)》微生物检验部分的内容制定, ①为便于样品充分混合, 水样采集体积应略小于采样瓶体积, 120ml 瓶采集水样 100ml、则 500ml 瓶采集水样 400ml; ②100ml 水样加入硫代硫酸钠溶液 (ρ (Na₂S₂O₃)=0.10g/ml) 0.1ml 去除水样中余氯, 以排除干扰, 因此, 400ml 水样应加入该硫代硫酸钠溶液 0.4ml, 该文献还指出 10mg 硫代硫酸钠可保证去除水样中 1.5mg 余氯, 所以, 硫代硫酸钠用量可根据水样实际余氯量调整; ③ 100ml 水样加入乙二胺四乙酸二钠 (EDTA-Na₂) 溶液 (ρ (C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂·2H₂O)=0.15g/ml) 0.3ml 去除水样中重金属离子的干扰, 因此, 400ml 水样应加入该乙二胺四乙酸二钠溶液 1.2ml。

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

5.6 分析步骤

5.6.1 接种量

- (1) 每个样品按三个不同的接种量接种, 每个接种量分别接种 5 张纸片, 共接种 15 张纸片。
- (2) 根据水样的污染程度确定接种量, 应尽可能使 5 个接种量最大的纸片为阳性、5 个接种量最小的纸片为阴性。清洁的水样的参考接种量可分别为 10ml、1ml、0.1ml, 受污染水样参考接种量根据污染程度可接种 1ml、0.1ml、0.01ml 或 0.1ml、0.01ml、0.001ml 等, 见下表 2。

表 2 水样接种量参考表

水样类型	接种量 (ml)							
	10	1	0.1	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
湖水、水源水	▲	▲	▲					
河水			▲	▲	▲			
生活污水					▲	▲	▲	
医疗机构排放污水（处理后）		▲	▲	▲				
禽畜养殖业等排放废水						▲	▲	▲

(3) 接种量小于 1ml 时，水样应制成稀释样品后使用。接种量为 0.1ml、0.01ml 时，分别制成 1:10 稀释样品、1:100 稀释样品，其他接种量的稀释样品依次类推。1:10 稀释样品的制作方法为：吸取 1ml 水样，注入盛有 9ml 无菌水的试管中，混匀，制成 1:10 稀释样品，其他稀释度的稀释样品同法制作。

5.6.2 接种、培养

(1) 水样充分混匀，按无菌操作制作稀释水样及接种水样。

(2) 清洁水样，接种水样总量为 55.5ml，10ml 水样量纸片 5 张，每张接种水样 10ml，1ml 水样量纸片 10 张，其中 5 张各接种水样 1ml，另 5 张各接种 1:10 的稀释水样 1ml。

(3) 受污染水样，接种 3 个不同稀释度的 1ml 稀释水样各 5 张。

(4) 纸片充分浸润、吸收水样，用手轻轻压平，做好标记。若纸片加入水样后，短时间内变黄或褪色，表明水样存在酸性物质或氧化剂干扰，需按“5.5 样品”一节方法去除相应干扰。

(5) 测总大肠菌群时 37℃±1℃培养 18-24h 后观察结果，测粪大肠菌群时 44.5℃±0.5℃培养 18-24h 后观察结果。检测粪大肠菌群时，纸片接种后，应立即置 44.5℃±0.5℃恒温培养箱培养，在常温下放置过久将影响检测结果的准确性。

5.6.3 结果判读

(1) 纸片上出现红斑或红晕且周围变黄，为阳性。

(2) 纸片全片变黄，无红斑或红晕，为阳性。

(3) 纸片部分变黄，无红斑或红晕，为阴性。

(4) 纸片的紫色背景上，出现红斑或红晕，而周围不变黄，为阴性。

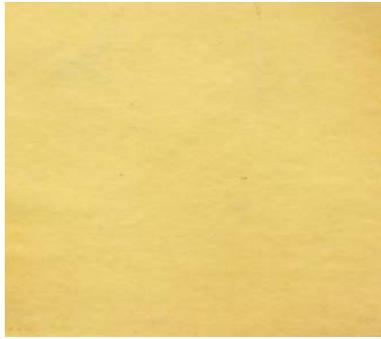
(5) 纸片无变化者为阴性。

结果判定参考图片如下：



阳 性

阴 性



阳 性

阴 性



阴 性

5.6.4 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，再进行精密度与准确度的统计分析。

5.6.4.1 精密度的测定

6 家验证单位对纸片法的精密度进行验证，6 家实验室对标准样品以及 3 种浓度的实际水样进行测定，每个样品平行测定 8 次。总大肠菌群结果见表 3，粪大肠菌群见表 4。

表 3：总大肠菌群精密度测定

实验 室号	低浓度 (4.0×10^2 MPN/L)			中浓度 (1.0×10^4 MPN/L)			高浓度 (8.0×10^4 MPN/L)			标准样品 (1.56×10^4 MPN/L)		
	\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)	\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)	\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)	\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)
1	8.5×10^2	0.19	6.4	7.6×10^3	0.22	5.6	7.4×10^4	0.14	2.8	7.7×10^3	0.29	7.4

2	4.0×10^2	0.09	3.5	8.8×10^3	0.23	5.8	1.0×10^5	0.23	4.5	7.5×10^3	0.18	4.6
3	7.2×10^2	0.36	12.4	2.3×10^4	0.27	6.1	9.4×10^4	0.24	4.9	9.2×10^3	0.18	4.6
4	1.3×10^2	0.15	7.1	7.5×10^3	0.17	4.5	6.6×10^4	0.24	4.9	4.6×10^3	0.17	4.5
5	7.8×10^2	0.22	7.6	1.2×10^4	0.28	6.9	1.0×10^5	0.29	5.8	4.8×10^3	0.28	7.5
6	2.3×10^2	0.21	8.7	9.5×10^3	0.25	6.2	7.4×10^4	0.26	5.3	7.7×10^3	0.24	6.2
$\bar{\bar{x}}_i$	4.3×10^2			1.0×10^4			8.4×10^4			6.7×10^3		
S'	0.33			0.18			0.08			0.13		
RSD'	12.6			4.6			1.6			3.3		
r	0.61			0.67			0.67			0.64		
R	1.09			0.81			0.66			0.69		

注： $\bar{\bar{x}}_i$ 、 \bar{x}_i 为几何平均值(MPN/L)， S_i 、 RSD_i 、 S' 、 RSD' 、 r 、 R 都是原始数据以10为底对数转化后计算所得（下同）

表 4：粪大肠菌群精密度测定

实验室号	低浓度 (1.0×10^2 MPN/L)			中浓度 (4.0×10^3 MPN/L)			高浓度 (5.0×10^4 MPN/L)			标准样品 (1.21×10^4 MPN/L)		
	\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)	\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)	\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)	\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)
1	1.5×10^2	0.26	12.2	3.6×10^3	0.21	5.8	6.7×10^4	0.25	5.2	4.3×10^3	0.41	11.3
2	1.5×10^2	0.25	11.4	7.5×10^3	0.19	5.0	1.1×10^5	0.30	5.9	2.7×10^3	0.30	8.6
3	45	0.36	21.6	7.4×10^3	0.11	2.8	6.8×10^4	0.22	4.6	6.3×10^3	0.19	4.9
4	2.0×10^2	0.31	13.6	6.8×10^3	0.22	5.6	6.3×10^4	0.19	3.9	5.1×10^3	0.29	7.9
5	31	0.47	31.3	5.9×10^2	0.60	21.5	8.6×10^3	0.52	13.2	3.0×10^3	0.20	5.9
6	1.4×10^2	0.30	14.1	6.4×10^3	0.18	4.7	6.6×10^4	0.20	4.2	8.5×10^3	0.18	4.5
$\bar{\bar{x}}_i$	97			4.1×10^3			5.1×10^4			4.6×10^3		
S'	0.30			0.43			0.39			0.19		
RSD'	14.8			11.9			8.2			5.2		
r	0.93			0.83			0.85			0.77		
R	1.28			1.44			1.35			0.89		

5.6.4.2 准确度的测定

6家验证单位对纸片法的准确度进行验证，使用有证标准样品进行测定，平行测定8次。总大肠菌群结果见表5，粪大肠菌群见表6。

表 5：总大肠菌群标准样品测试数据汇总表

实验室号	标准样品 (15600 MPN/L)	
	\bar{x}_i	RE _i %
1	7.7×10^3	-7.3
2	7.5×10^3	-7.6
3	9.2×10^3	-5.5
4	4.5×10^3	-12.8
5	4.8×10^3	-12.3
6	7.7×10^3	-7.4

$\overline{RE\%}$	-8.8
$S_{\overline{RE}}$	3.0

注: $\overline{x_i}$ 为几何平均值, $RE_i\%$ 、 $\overline{RE\%}$ 、 $S_{\overline{RE}}$ 为原始数据以 10 为底, 对数转化后计算所得 (下同)

表 6: 粪大肠菌群标准样品测试数据汇总表

实验室号	标准样品 (12100 MPN/L)	
	$\overline{x_i}$	$RE_i\%$
1	4.3×10^3	-11.1
2	2.7×10^3	-16.0
3	6.3×10^3	-7.0
4	5.1×10^3	-9.3
5	3.0×10^3	-14.8
6	8.5×10^3	-3.8
$\overline{RE\%}$		-10.3
$S_{\overline{RE}}$		4.6

5.6.5 与多管发酵法的比对

采用与经典的多管发酵法比对来说明该方法的可靠性。

5.6.5.1 标准菌株模拟样品

将标准菌株培养 24h, 以无菌去离子水做 10 倍系列稀释, 取合适稀释度 ($10^{-4} \sim 10^{-9}$) 进行检测。采用的标准菌株有大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*, ATCC25922)、产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes* CCTCC AB200052)、伤寒沙门氏菌 (*Salmonella enterica*, CCTCC AB94010)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, CGMCC 1.2386)、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae* CGMCC 1.1736)、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*, CGMCC 1.2017)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, CGMCC 1.2387)、弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*, CGMCC 1.1732)。

将多管发酵法和纸片法的检测结果进行配对卡方检验, 在总大肠菌群的检测上, 纸片法和多管发酵法的结果没有差异 ($P=0.453$);

表 7: 标准菌株总大肠菌群配对卡方检验数据

		发酵法	
		阳性	阴性
纸片法	阳性	62	2
	阴性	5	38

在粪大肠菌群的检测上, 纸片法和多管发酵法的检出结果也没有差异 ($P=0.125$)。

表 8: 标准菌株粪大肠菌群配对卡方检验数据

		发酵法	
		阳性	阴性
纸片法	阳性	30	4

阴性

0

71

5.6.5.2 实际水样

根据本标准中纸片法的适用范围，选择水库、湖泊、溪流、河流、污水处理厂废水、医院废水以及禽畜养殖业废水等多种实际水样进行纸片法与多管发酵法的比对检测，包括总大肠菌群和粪大肠菌群 2 个项目的检测。

用纸片法和多管发酵法对 86 个实际水样的总大肠菌群进行比对检测，结果如图 2。

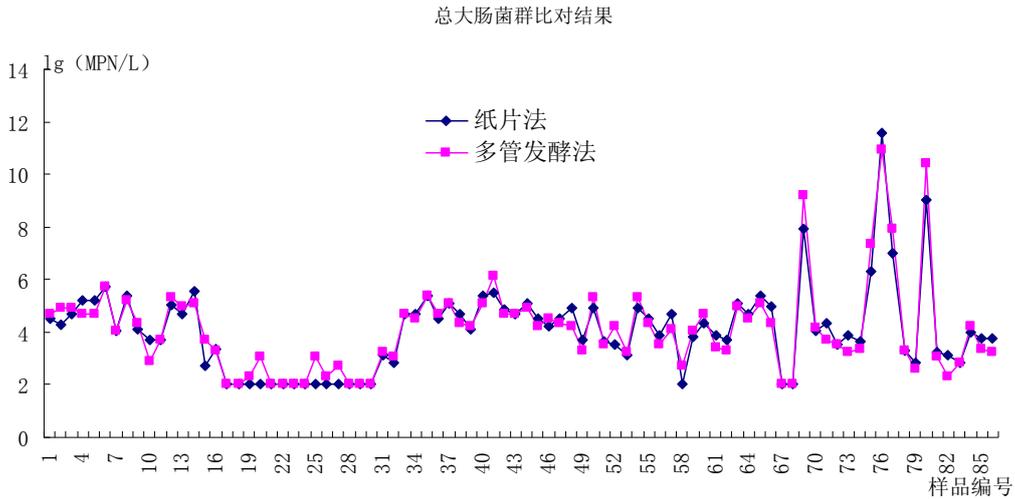


图 2：纸片法与多管发酵法比对（总大肠菌群）

对两种方法检测的总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，结果见表 9。

表 9：总大肠菌群配对 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				
纸片法- 多管发酵法	-.0314	.467	.0504	-.132	.069	-.623	85	.535	

由表 9 可见，多管发酵法与纸片法在总大肠菌群的检测结果上没有统计学意义上的差别（ $P=0.535$ ）。

用纸片法和多管发酵法对 72 个实际水样的粪大肠菌群进行比对检测，结果如图 3。

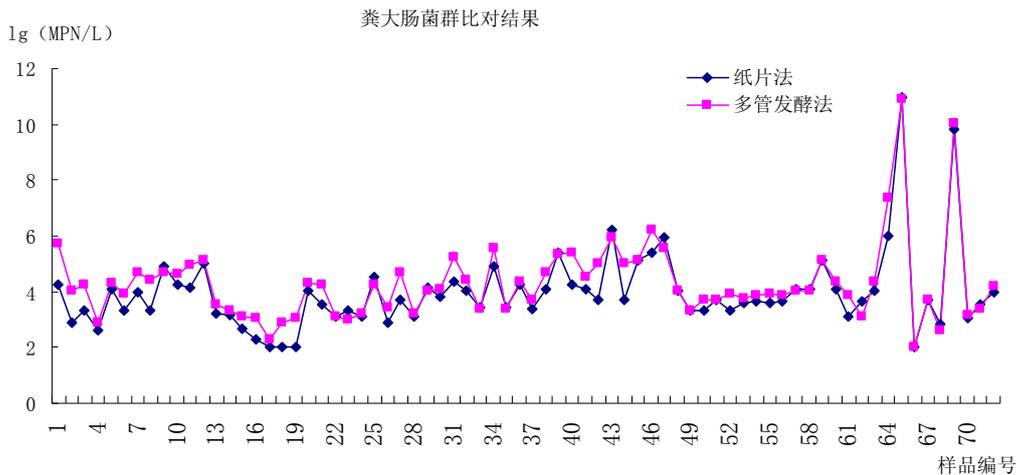


图 3: 纸片法与多管发酵法比对结果 (粪大肠菌群)

为了使两组数据呈正态分布, 先对数据进行对数处理后进行 t 检验。对两种方法检测的粪大肠菌群结果进行配对 t 检验, 结果见表 10。

表 10: 粪大肠菌群配对 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			
纸片法- 多管发酵法	-.0347	.467	.055	-.456	-.237	-6.29	71	.000

表 10 表明, 在粪大肠菌群的检测上, 纸片法与多管发酵法有显著性差异 (P=0.000)。

表 11: 纸片法与多管发酵法结果的线性回归分析 (粪大肠菌群)

	非标准化相关系数		标准化相关系数	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
(Constant)	-.116	.176		-.658	.513
变量	.946	.039	.946	24.335	.000

对两种方法粪大肠菌群检测结果进行线性回归分析 (表 11), 纸片法和多管发酵法的检测结果的线性关系为: $\lg \text{纸片法} = -0.116 + 0.946 \lg \text{发酵法}$ ($R^2=0.894$)。回归分析结果表明: 回归系数 (B) 为 0.946, 标准化回归系数 (Beta) 为 0.946, 回归系数 t 检验 $t=24.33$, $P=0.000 < 0.05$, 可认为纸片法检测结果与多管发酵法结果之间有显著的相关关系。

虽然在粪大肠菌群项目的测定上, 纸片法检测结果略低于经典的多管发酵法, 但两者间显著的相关关系且有证标样的实验室间准确度验证结果满足相关环境标准和环保工作的要求, 因此, 本方法标准可实际应用于环境管理。

5.6.5.3 精密度、准确度

用纸片法和多管发酵法对有证标准样品进行比对试验, 对 2 种方法的精密度和准确度进行 t 检验。结果表明: 在总大肠菌群和粪大肠菌群的检测上, 纸片法和多管发酵法的精密度、准确度均无显著性差异 ($p > 0.05$)。

表 12: 纸片法与多管发酵法精密度、准确度比对结果

	总大肠菌群		粪大肠菌群	
	t	Sig	t	Sig
精密度	1.063	.329	1.256	.256
准确度	-2.02	.090	-2.527	.071

5.7 结果计算与表示

5.7.1 结果计算

根据不同接种量的阳性纸片数量, 查 MPN 值表, 经下面的公式换算报告 1L 水中总大肠菌群或粪大肠菌群数:

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

5.7.2 结果表示

测定结果保留二位有效数字, 大于 100 时以科学计数法表示, 结果的单位为 MPN/L。平均值以几何平均计算。

5.8 质量保证和质量控制

(1) 必须使用质量鉴定合格的纸片。

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

(3) 每批样品使用有证标准菌株进行阳性、阴性对照试验, 其中, 总大肠菌群测定的阳性菌株为大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*), 阴性菌株为金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*), 培养温度为 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; 粪大肠菌群测定的阳性菌株为大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*), 阴性菌株为产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*), 培养温度为 $44.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。上述标准菌株均制成浓度为 300~3000 个/ml 的菌悬液, 取相应水量的菌悬液接种纸片, 分别在上述不同温度条件下培养 18-24h 后观察结果, 大肠埃希氏菌应呈现阳性反应, 金黄色葡萄球菌及产气肠杆菌应呈现阴性反应。否则, 该次样品测定结果无效, 应查明原因后重新测定。

5.9 废物处理

使用后的器皿及废弃物在 121°C 高压蒸汽灭菌 20min 后, 器皿方可清洗, 废弃物作为普通垃圾处置。

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 13。

表 13: 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
汤琳	高级工程师	11	上海市环境监测中心
李备军	高级工程师	22	上海市环境监测中心
沈燕飞	工程师	8	江苏省环境监测中心
厉以强	教授级高工	25	江苏省环境监测中心
李娣	工程师	4	江苏省环境监测中心
陈明	工程师	4	南京市环境监测中心站
李敏	工程师	6	南京市环境监测中心站
孙洁梅	工程师	10	南京市环境监测中心站
赵宏飞	技术员	3	南京市环境监测中心站
徐恒省	高级工程师	10	苏州市环境监测中心站
何苏青	工程师	10	苏州市环境监测中心站
李继影	工程师	5	苏州市环境监测中心站
张宗祥	高级工程师	11	泰州市环境监测中心站
朱宇芳	工程师	17	泰州市环境监测中心站
顾卿	工程师	4	浙江省环境监测中心

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》（HJ168-2010）的规定，组织 6 家以上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、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）进行总大肠菌群、粪大肠菌群的检测，每个样品平行测定 8 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，各验证实验室进行总大肠菌群、粪大肠菌群的检测，每个样品平行测定 8 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) 《方法验证报告》见附一。

7 参考文献

- [1] 金相灿等. 中国湖泊环境(第三册). 北京: 海洋出版社, 1995 304-317.
- [2] 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): 39-42.
- [3] 方东, 陆贞芝, 王国祥. 纸片法快速测定水质总大肠菌群, 环境监测管理与技术, 1996, 8 (4): 32-33.
- [4] 朱健文 王祥生. 纸片法快速测定水质总大肠菌群, 干旱环境监测, 2000, 14(4): 241-243.
- [5] 卢崇南. 纸片法检测大肠菌群测定结果的实验研究, 热带医学杂志, 2005, 5 (1): 98-99.

- [6] 韩桂春. 生活污水中粪大肠菌群快速监测方法-纸片法, 中国卫生检验杂志, 2003, 13(4): 475-476.
- [7] 赵凌宇. 粪大肠菌群快速测定-纸片法的应用, 环境监测管理与技术, 2007, 19(4): 18-20.
- [8] 朱小慧, 李占裕, 何平原. 纸片法与培养发酵法检测大肠菌群结果对比分析, 中国热带医学, 2005, 5(8): 1700-1701
- [9] Walter L. Kulp, Carmine Mascoli, Ohsana Tavshanjian. Use of Tergitol-7 Triphenyl Tetrazolium Chloride Agar as the Coliform Confirmatory Medium in Routine Sanitary water Analysis, American J, Public Health, 1953, 43:1111-1113.
- [10] Pierre Servais, Tamara Garcia Armisen. An early method to detect faecal contamination of river waters. Annals of Microbiology, 2005,55(2):151-156.
- [11] EPA Method 1604: total coliforms and Escherichia coli in water by Membrane Filtration using a simultaneous detection technique (MI Medium).
- [12] ISO 9308-1: 2000 Water quality-Detection and enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria- Part 1: Membrane filtration method.
- [13] L.Bonadonna, C,Cataldo, M.Semproni. Comparison of methods and confirmation tests for the recovery Escherichia coli in water. Desalination, 2007,213: 18-23.
- [14] Tamara Garcia-Armisen, Josue Prats, Pierre Servais. Comparison of culturable fecal coliforms and Escherichia coli enumeration in freshwaters. Can. J. Microbiol 2007, 53: 798-801.
- [15] APHA (American Public Health Association), 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st ed. Washington DC: American Public Health Association.
- [16] 余淑冰, 梁景涛, 陈淑玲. 检测大肠菌群纸片可疑结果的实验研究, 中国热带医学, 2004, 4(8): 618-619.
- [17] 任泽萍. 大肠菌群检测纸片制备质量控制要点, 中国卫生检验杂志, 2000, 10(4): 243-244.
- [18] 潘慧华, 李晶晶, 刘坚真. 大肠菌群一步发酵法检测的研究, 食品科学, 2006, 27(12): 637-641
- [19] 王萍, 梁霞, 张豫川. 快速测定水中大肠菌群的方法研究, 环境科学与技术, 2009, 32(4): 124-128.
- [20] 马乐好, 阚方琦. 水中大肠菌群快检纸片的研究与应用效果观察, 中国卫生检验杂志, 2007, 17(2): 287-289.
- [21] 《水与废水监测标准方法》(21st) USA
- [22] 《地表水环境质量标准》(GB3838-2002)
- [23] 《海水水质标准》(GB3097-1997)
- [24] 《农田灌溉水质标准》(GB5084-2005)
- [25] 《医疗机构水污染物排放标准》(GB18466-2005)
- [26] 《生活垃圾填埋场污染控制标准》(GB16889-2008)
- [27] 《畜禽养殖业污染物排放标准》(GB18596-2001)
- [28] 《生物工程类制药工业水污染物排放标准》(GB21907-2008)
- [29] 《城镇污水处理厂污染物排放标准》(GB18918-2002)

附一 方法验证报告

方法验证报告

方法名称：水质（粪）大肠菌群的测定 纸片快速法

项目主编单位：常州市环境监测中心

验证单位：上海市环境监测中心、江苏省环境监测中心、浙江省

环境监测中心、苏州市环境监测中心、南京市环境监测中心站、

泰州市环境监测中心站

项目负责人及职称：丁程成 高级工程师

通讯地址：常州市浦前张家村 149 号 电话：0519-86908336

报告编写人及职称：丁程成 高级工程师

报告日期：2012 年 2 月 10 日

本方法的 6 家验证实验室分别为：(1) 上海市环境监测中心，(2) 江苏省环境监测中心，(3) 浙江省环境监测中心，(4) 苏州市环境监测中心，(5) 南京市环境监测中心站，(6) 泰州市环境监测中心站。编制组将《水质（粪）大肠菌群的测定 纸片快速法》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	从事工作年限（年）	单位名称
汤琳	高级工程师	11	上海市环境监测中心
李备军	高级工程师	22	上海市环境监测中心
沈燕飞	工程师	8	江苏省环境监测中心
厉以强	教授级高工	25	江苏省环境监测中心
李娣	工程师	4	江苏省环境监测中心
陈明	工程师	4	南京市环境监测中心站
李敏	工程师	6	南京市环境监测中心站
孙洁梅	工程师	10	南京市环境监测中心站
赵宏飞	技术员	3	南京市环境监测中心站
徐恒省	高级工程师	10	苏州市环境监测中心站
何苏青	工程师	10	苏州市环境监测中心站
李继影	工程师	5	苏州市环境监测中心站
张宗祥	高级工程师	11	泰州市环境监测中心站
朱宇芳	工程师	17	泰州市环境监测中心站
顾卿	工程师	4	浙江省环境监测中心

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	性能状况
上海市环境监测中心	生化培养箱	LRH-250	正常
上海市环境监测中心	生化培养箱	LRH-250-II	正常
江苏省环境监测中心	振荡培养箱	HZQ-F160	正常
江苏省环境监测中心	恒温振荡培养箱	LRH-250Z	正常
南京市环境监测中心站	隔水培养箱	GHP-9270	正常
南京市环境监测中心站	生化培养箱	LRH-250-II	正常
苏州市环境监测中心站	生化培养箱	WMZK-1	正常
苏州市环境监测中心站	隔水式电热恒温培养箱	PYX-DHS-50	正常
泰州市环境监测中心站	隔水式恒温培养箱	GSP-9160MBE	正常
泰州市环境监测中心站	霉菌培养箱	MJX-160B-Z	正常
浙江省环境监测中心	恒温培养箱	DHP 9162	正常
浙江省环境监测中心	恒温培养箱	DHP 9162	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 3~10。

1.2.1 总大肠菌群的精密度验证数据

附表3 标准样品精密度测试数据汇总表（总大肠菌群）

(单位: MPN/L)

实验 室号	测定值								\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	x_7	x_8			
1	7.0×10^3	1.1×10^4	1.3×10^4	4.9×10^3	3.3×10^3	1.7×10^4	3.3×10^3	1.4×10^4	7.7×10^3	0.29	7.4
2	1.3×10^4	4.9×10^3	7.9×10^3	1.3×10^4	4.9×10^3	7.9×10^3	7.9×10^3	4.9×10^3	7.5×10^3	0.17	4.6
3	7.9×10^3	9.4×10^3	4.9×10^3	7.9×10^3	1.7×10^4	1.7×10^4	7.9×10^3	7.9×10^3	9.2×10^3	0.18	4.6
4	4.9×10^3	7.0×10^3	2.6×10^3	3.3×10^3	3.3×10^3	4.9×10^3	4.9×10^3	7.9×10^3	4.6×10^3	0.17	4.5
5	4.9×10^3	7.9×10^3	1.7×10^4	2.3×10^3	4.9×10^3	3.3×10^3	3.3×10^3	3.3×10^3	4.8×10^3	0.28	7.5
6	3.3×10^3	1.1×10^4	7.9×10^3	4.9×10^3	1.7×10^4	1.3×10^4	4.9×10^3	7.9×10^3	7.7×10^3	0.24	6.2

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 低浓度样品精密度测试数据汇总表（总大肠菌群）

(单位: MPN/L)

实验 室号	测定值								\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	x_7	x_8			
1	7.9×10^2	4.9×10^2	4.6×10^2	1.3×10^3	1.3×10^3	7.9×10^2	1.4×10^3	7.9×10^2	8.5×10^2	0.19	6.4
2	4.9×10^2	3.3×10^2	4.9×10^2	3.3×10^2	3.3×10^2	3.3×10^2	4.9×10^2	4.9×10^2	4.0×10^2	0.09	3.5
3	4.9×10^2	9.4×10^2	1.4×10^3	4.9×10^2	2.7×10^2	2.4×10^3	1.4×10^3	2.6×10^2	7.2×10^2	0.36	12.4
4	1.7×10^2	1.3×10^2	2.1×10^2	80	80	1.3×10^2	1.3×10^2	1.7×10^2	1.3×10^2	0.15	7.1
5	3.3×10^2	7.0×10^2	4.9×10^2	7.9×10^2	1.2×10^3	9.4×10^2	1.7×10^3	7.9×10^2	7.8×10^2	0.22	7.6
6	1.1×10^2	3.4×10^2	4.9×10^2	3.3×10^2	2.3×10^2	2.2×10^2	1.7×10^2	1.7×10^2	2.3×10^2	0.21	8.7

附表5 中浓度样品精密度测试数据汇总表（总大肠菌群）

(单位: MPN/L)

实验 室号	测定值								\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	x_7	x_8			
1	1.1×10^4	4.9×10^3	7.9×10^3	1.1×10^4	4.9×10^3	1.1×10^4	3.3×10^3	1.3×10^4	7.6×10^3	0.22	5.6
2	7.9×10^3	1.3×10^4	1.3×10^4	4.9×10^3	4.9×10^3	1.7×10^4	1.3×10^4	4.9×10^3	8.8×10^3	0.23	5.8
3	2.2×10^4	1.8×10^4	1.7×10^4	9.2×10^4	1.7×10^4	1.7×10^4	1.4×10^4	3.5×10^4	2.3×10^4	0.27	6.1
4	7.0×10^3	7.9×10^3	7.9×10^3	1.3×10^4	7.0×10^3	1.1×10^4	3.3×10^3	7.0×10^3	7.5×10^3	0.18	4.5
5	1.7×10^4	7.9×10^3	1.7×10^4	7.0×10^3	4.9×10^3	7.9×10^3	3.5×10^4	1.7×10^4	1.2×10^4	0.28	6.9
6	7.9×10^3	4.9×10^3	7.9×10^3	1.1×10^4	3.5×10^4	9.4×10^3	7.9×10^3	7.9×10^3	9.5×10^3	0.25	6.2

附表6 高浓度样品精密度测试数据汇总表（总大肠菌群）

(单位: MPN/L)

实验 室号	测定值									RSD _i	
	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	x ₅	x ₆	x ₇	x ₈	\bar{x}_i	S _i	(%)
1	1.3×10 ⁵	7.9×10 ⁴	7.9×10 ⁴	7.9×10 ⁴	7.9×10 ⁴	4.6×10 ⁴	7.9×10 ⁴	4.9×10 ⁴	7.4×10 ⁴	0.14	2.8
2	1.3×10 ⁵	1.3×10 ⁵	1.3×10 ⁵	7.9×10 ⁴	1.3×10 ⁵	7.9×10 ⁴	3.3×10 ⁴	1.7×10 ⁵	1.0×10 ⁵	0.23	4.5
3	4.9×10 ⁴	4.9×10 ⁴	1.3×10 ⁵	1.7×10 ⁵	1.1×10 ⁵	1.3×10 ⁵	4.9×10 ⁴	1.7×10 ⁵	9.4×10 ⁴	0.24	4.9
4	1.1×10 ⁵	7.9×10 ⁴	4.9×10 ⁴	7.9×10 ⁴	4.9×10 ⁴	2.3×10 ⁴	1.3×10 ⁵	7.0×10 ⁴	6.6×10 ⁴	0.24	4.9
5	7.9×10 ⁴	7.9×10 ⁴	1.3×10 ⁵	3.5×10 ⁵	1.1×10 ⁵	7.9×10 ⁴	1.3×10 ⁵	3.3×10 ⁴	1.0×10 ⁵	0.29	5.8
6	1.7×10 ⁵	1.3×10 ⁵	4.9×10 ⁴	1.3×10 ⁵	4.9×10 ⁴	3.3×10 ⁴	4.9×10 ⁴	7.9×10 ⁴	7.4×10 ⁴	0.26	5.3

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 室号	测定值									RSD _i	
	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	x ₅	x ₆	x ₇	x ₈	\bar{x}_i	S _i	(%)
1	2.3×10 ³	2.2×10 ⁴	3.4×10 ³	1.3×10 ⁴	3.3×10 ³	4.9×10 ³	1.3×10 ³	2.3×10 ³	4.3×10 ³	0.41	11.3
2	1.1×10 ⁴	4.9×10 ³	2.2×10 ³	1.7×10 ³	2.2×10 ³	2.1×10 ³	1.3×10 ³	2.3×10 ³	2.7×10 ³	0.30	8.6
3	3.4×10 ³	7.9×10 ³	4.9×10 ³	7.9×10 ³	4.6×10 ³	7.9×10 ³	4.9×10 ³	1.3×10 ⁴	6.3×10 ³	0.18	4.9
4	7.9×10 ³	1.3×10 ⁴	4.9×10 ³	3.2×10 ³	1.4×10 ³	4.9×10 ³	4.9×10 ³	7.9×10 ³	5.1×10 ³	0.29	7.9
5	2.6×10 ³	3.3×10 ³	4.9×10 ³	3.3×10 ³	2.7×10 ³	3.4×10 ³	4.9×10 ³	1.1×10 ³	3.0×10 ³	0.21	5.9
6	7.9×10 ³	1.3×10 ⁴	1.3×10 ⁴	1.3×10 ⁴	4.9×10 ³	7.9×10 ³	4.9×10 ³	7.9×10 ³	8.5×10 ³	0.18	4.5

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 室号	测定值									RSD _i	
	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	x ₅	x ₆	x ₇	x ₈	\bar{x}_i	S _i	(%)
1	1.4×10 ²	80	1.1×10 ²	2.3×10 ²	1.1×10 ²	80	4.9×10 ²	1.7×10 ²	1.5×10 ²	0.26	12.2
2	1.7×10 ²	50	1.3×10 ²	1.3×10 ²	1.1×10 ²	2.2×10 ²	3.3×10 ²	2.3×10 ²	1.5×10 ²	0.25	11.4
3	1.1×10 ²	70	1.1×10 ²	20	10	50	40	50	45	0.36	21.6
4	3.1×10 ²	2.6×10 ²	1.3×10 ²	80	3.1×10 ²	6.3×10 ²	2.3×10 ²	80	2.0×10 ²	0.31	13.6
5	1.3×10 ²	80	20	10	80	10	50	10	31	0.47	31.3
6	4.9×10 ²	50	80	1.3×10 ²	1.1×10 ²	2.3×10 ²	1.7×10 ²	1.1×10 ²	1.4×10 ²	0.30	14.1

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 室号	测定值									RSD _i	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	\bar{x}_i	S _i	(%)
1	3.2×10 ³	1.7×10 ³	7.9×10 ³	4.9×10 ³	2.3×10 ³	3.3×10 ³	3.3×10 ³	4.9×10 ³	3.6×10 ³	0.21	5.8
2	4.9×10 ³	7.0×10 ³	1.7×10 ⁴	4.9×10 ³	1.1×10 ⁴	7.9×10 ³	7.9×10 ³	4.9×10 ³	7.5×10 ³	0.19	5.0
3	6.3×10 ³	7.9×10 ³	7.0×10 ³	7.0×10 ³	7.9×10 ³	7.9×10 ³	1.2×10 ⁴	4.9×10 ³	7.4×10 ³	0.11	2.8
4	4.9×10 ³	1.1×10 ⁴	3.3×10 ³	4.9×10 ³	1.1×10 ⁴	7.9×10 ³	1.3×10 ⁴	4.9×10 ³	6.8×10 ³	0.22	5.6
5	7.0×10 ²	2.0×10 ²	1.0×10 ²	2.3×10 ³	8.0×10 ²	2.3×10 ³	2.3×10 ³	1.0×10 ²	5.9×10 ²	0.59	21.5
6	7.0×10 ³	4.9×10 ³	4.9×10 ³	1.1×10 ⁴	7.0×10 ³	3.3×10 ³	6.3×10 ³	1.1×10 ⁴	6.4×10 ³	0.18	4.7

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 室号	测定值									RSD _i	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	\bar{x}_i	S _i	(%)
1	4.9×10 ⁴	4.6×10 ⁴	7.0×10 ⁴	3.3×10 ⁴	7.0×10 ⁴	2.4×10 ⁵	7.0×10 ⁴	7.0×10 ⁴	6.7×10 ⁴	0.25	5.2
2	1.1×10 ⁵	2.4×10 ⁵	7.9×10 ⁴	7.0×10 ⁴	1.3×10 ⁵	6.3×10 ⁴	4.9×10 ⁴	3.5×10 ⁵	1.1×10 ⁵	0.30	5.9
3	7.9×10 ⁴	7.9×10 ⁴	7.9×10 ⁴	1.3×10 ⁵	4.9×10 ⁴	9.4×10 ⁴	2.3×10 ⁴	7.0×10 ⁴	6.8×10 ⁴	0.22	4.6
4	7.9×10 ⁴	7.9×10 ⁴	4.6×10 ⁴	7.9×10 ⁴	3.3×10 ⁴	1.3×10 ⁵	4.9×10 ⁴	4.9×10 ⁴	6.3×10 ⁴	0.19	3.9
5	4.0×10 ³	5.0×10 ³	3.3×10 ⁴	2.3×10 ⁴	1.7×10 ⁴	5.0×10 ³	2.3×10 ⁴	1.0×10 ³	8.6×10 ³	0.52	13.2
6	4.9×10 ⁴	1.1×10 ⁵	3.3×10 ⁴	4.9×10 ⁴	7.9×10 ⁴	7.9×10 ⁴	1.3×10 ⁵	4.9×10 ⁴	6.6×10 ⁴	0.20	4.2

1.3 方法准确度的测试数据

6 家实验室对有证标准样品的总大肠菌群、粪大肠菌群的验证测试数据见附表 11~12.。

1.3.1 总大肠菌群的测试数据

附表 11 有证标准物质测试数据

实验 室号	测定值(MPN/L)									有证标 准物质 μ (MPN/L)	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	\bar{x}_i		RE _i %
1	7.0×10 ³	1.1×10 ⁴	1.3×10 ⁴	4.9×10 ³	3.3×10 ³	1.7×10 ⁴	3.3×10 ³	1.4×10 ⁴	7.7×10 ³	-7.3	15600
2	1.3×10 ⁴	4.9×10 ³	7.9×10 ³	1.3×10 ⁴	4.9×10 ³	7.9×10 ³	7.9×10 ³	4.9×10 ³	7.5×10 ³	-7.6	
3	7.9×10 ³	9.4×10 ³	4.9×10 ³	7.9×10 ³	1.7×10 ⁴	1.7×10 ⁴	7.9×10 ³	7.9×10 ³	9.2×10 ³	-5.5	
4	4.9×10 ³	7.0×10 ³	2.6×10 ³	3.3×10 ³	3.3×10 ³	4.9×10 ³	4.9×10 ³	7.9×10 ³	4.6×10 ³	-12.8	
5	4.9×10 ³	7.9×10 ³	1.7×10 ⁴	2.3×10 ³	4.9×10 ³	3.3×10 ³	3.3×10 ³	3.3×10 ³	4.8×10 ³	-12.3	
6	3.3×10 ³	1.1×10 ⁴	7.9×10 ³	4.9×10 ³	1.7×10 ⁴	1.3×10 ⁴	4.9×10 ³	7.9×10 ³	7.7×10 ³	-7.4	

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

1.3.2 粪大肠菌群的测试数据

附表 12 有证标准物质测试数据

实验 室号	测定值									RE _i %	有证标 准物质 μ (MPN/L)
	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	x ₅	x ₆	x ₇	x ₈	\bar{x}_i		
1	2.3×10 ³	2.2×10 ⁴	3.4×10 ³	1.3×10 ⁴	3.3×10 ³	4.9×10 ³	1.3×10 ³	2.3×10 ³	4.3×10 ³	-11.1	12100
2	1.1×10 ⁴	4.9×10 ³	2.2×10 ³	1.7×10 ³	2.2×10 ³	2.1×10 ³	1.3×10 ³	2.3×10 ³	2.7×10 ³	-16.0	
3	3.4×10 ³	7.9×10 ³	4.9×10 ³	7.9×10 ³	4.6×10 ³	7.9×10 ³	4.9×10 ³	1.3×10 ⁴	6.3×10 ³	-7.0	
4	7.9×10 ³	1.3×10 ⁴	4.9×10 ³	3.2×10 ³	1.4×10 ³	4.9×10 ³	4.9×10 ³	7.9×10 ³	5.1×10 ³	-9.3	
5	2.6×10 ³	3.3×10 ³	4.9×10 ³	3.3×10 ³	2.7×10 ³	3.4×10 ³	4.9×10 ³	1.1×10 ³	3.0×10 ³	-14.8	
6	7.9×10 ³	1.3×10 ⁴	1.3×10 ⁴	1.3×10 ⁴	4.9×10 ³	7.9×10 ³	4.9×10 ³	7.9×10 ³	8.5×10 ³	-3.8	

2 方法验证数据汇总

2.1 方法精密度数据汇总

附表 13 是 6 家实验室方法验证结果中总大肠菌群的精密度测试结果的统计分析。

附表 13 总大肠菌群精密度测试数据汇总表

实验 室号	低浓度			中浓度			高浓度			标准样品		
	\bar{x}_i	S _i	RSD _i (%)									
1	8.5×10 ²	0.19	6.4	7.6×10 ³	0.22	5.6	7.4×10 ⁴	0.14	2.8	7.7×10 ³	0.29	7.4
2	4.0×10 ²	0.09	3.5	8.8×10 ³	0.23	5.8	1.0×10 ⁵	0.23	4.5	7.5×10 ³	0.18	4.6
3	7.2×10 ²	0.36	12.4	2.3×10 ⁴	0.27	6.1	9.4×10 ⁴	0.24	4.9	9.2×10 ³	0.18	4.6
4	1.3×10 ²	0.15	7.1	7.5×10 ³	0.17	4.5	6.6×10 ⁴	0.24	4.9	4.6×10 ³	0.17	4.5
5	7.8×10 ²	0.22	7.6	1.2×10 ⁴	0.28	6.9	1.0×10 ⁵	0.29	5.8	4.8×10 ³	0.28	7.5
6	2.3×10 ²	0.21	8.7	9.5×10 ³	0.25	6.2	7.4×10 ⁴	0.26	5.3	7.7×10 ³	0.24	6.2
$\bar{\bar{x}}_i$	4.3×10 ²			1.0×10 ⁴			8.4×10 ⁴			6.7×10 ³		
S'	0.33			0.18			0.08			0.13		
RSD'	12.6			4.6			1.6			3.3		
r	0.61			0.67			0.67			0.64		
R	1.09			0.81			0.66			0.69		

注： \bar{x}_i 、 $\bar{\bar{x}}_i$ 为几何平均值(MPN/L)，S_i、RSD_i(%)、S'、RSD'、r、R 都是原始数据以 10 为底，对数转化后计算所得（下同）

附表 14 是 6 家实验室方法验证结果中粪大肠菌群的精密度测试结果的统计分析。

附表 14 粪大肠菌群精密度测试数据汇总表

实验 室号	低浓度			中浓度			高浓度			标准样品		
	\bar{x}_i	S _i	RSD _i (%)									
1	1.5×10 ²	0.26	12.2	3.6×10 ³	0.21	5.8	6.7×10 ⁴	0.25	5.2	4.3×10 ³	0.41	11.3

2	1.5×10^2	0.25	11.4	7.5×10^3	0.19	5.0	1.1×10^5	0.30	5.9	2.7×10^3	0.30	8.6
3	45	0.36	21.6	7.4×10^3	0.11	2.8	6.8×10^4	0.22	4.6	6.3×10^3	0.19	4.9
4	2.0×10^2	0.31	13.6	6.8×10^3	0.22	5.6	6.3×10^4	0.19	3.9	5.1×10^3	0.29	7.9
5	31	0.47	31.3	5.9×10^2	0.60	21.5	8.6×10^3	0.52	13.2	3.0×10^3	0.20	5.9
6	1.4×10^2	0.30	14.1	6.4×10^3	0.18	4.7	6.6×10^4	0.20	4.2	8.5×10^3	0.18	4.5
$\bar{\bar{x}}_i$	97			4.1×10^3			5.1×10^4			4.6×10^3		
S'	0.30			0.43			0.39			0.19		
RSD'	14.8			11.9			8.2			5.2		
r	0.93			0.83			0.85			0.77		
R	1.28			1.44			1.35			0.89		

2.2 方法准确度数据汇总

附表 15 和附表 16 是 6 家实验室方法验证中总大肠菌群、粪大肠菌群的准确度测试结果的统计分析。

附表 15 总大肠菌群标准样品测试数据汇总表

实验室号	标准样品 (15600 MPN/L)	
	\bar{x}_i	RE _i %
1	7.7×10^3	-7.3
2	7.5×10^3	-7.6
3	9.2×10^3	-5.5
4	4.6×10^3	-12.8
5	4.8×10^3	-12.3
6	7.7×10^3	-7.4
$\overline{RE}\%$		-8.8
$S_{\overline{RE}}$		3.0

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

附表 16 粪大肠菌群标准样品测试数据汇总表

实验室号	标准样品 (12100 MPN/L)	
	\bar{x}_i	RE _i %
1	4.3×10^3	-11.1
2	2.7×10^3	-16.0
3	6.3×10^3	-7.0
4	5.1×10^3	-9.3
5	3.0×10^3	-14.8
6	8.5×10^3	-3.8
$\overline{RE}\%$		-10.3
$S_{\overline{RE}}$		4.6

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

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

3.2 准确度

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

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