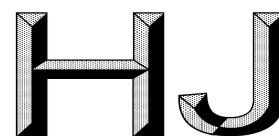


附件 6



中华人民共和国国家环境保护标准

HJ□□□-201□

水质 细菌总数的测定 平皿计数法

Water quality-Determination of total bacteria-Plate count method

(征求意见稿)

201□-□□-□□发布

201□-□□-□□实施

环 境 保 护 部 发布

目 次

前 言.....	ii
1 适用范围.....	1
2 术语和定义.....	1
3 方法原理.....	1
4 干扰和消除.....	1
5 试剂和材料.....	1
6 仪器和设备.....	2
7 样品.....	2
8 分析步骤.....	3
9 结果计算与表示.....	4
10 精密度和准确度.....	4
11 质量保证和质量控制.....	5
12 废物处理.....	5

前 言

为贯彻《中华人民共和国环境保护法》和《中华人民共和国水污染防治法》，保护环境，保障人体健康，规范水中细菌总数的测定方法，制定本标准。

本标准规定了测定地表水、地下水和废水中细菌总数的平皿计数法。

本标准首次发布。

本标准由环境保护部环境监测司、科技标准司组织制订。

本标准主要起草单位：辽宁省环境监测实验中心。

本标准验证单位：大连市环境监测中心、丹东市环境监测中心站、锦州市环境监测中心站、辽阳市环境监测站、沈阳市疾病预防控制中心、辽宁北方环境检测技术有限公司。

本标准环境保护部 201□年□□月□□日批准。

本标准自 201□年□□月□□日起实施。

本标准由环境保护部解释。

水质 细菌总数的测定 平皿计数法

1 适用范围

本标准规定了测定水中细菌总数的平皿计数法。

本标准适用于地表水、地下水和废水中细菌总数的测定。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

2.1

细菌总数 total bacteria

36℃培养 48 h, 1 ml 水样在营养琼脂上所生长的需氧菌、兼性厌氧菌和异养菌菌落总数。

2.2

菌落形成单位 Colony-Forming Units, CFU

单位体积中的细菌群落总数。

3 方法原理

细菌能以单独个体、成双成对、链状、成簇等形式存在，而且没有任何一种培养基能够满足一个水样中所有细菌的生理要求。据此特性，通过将水样接种于营养琼脂培养基中，在特定的物理条件下（36℃培养 48 h）所生长的细菌菌落的总数作为测定水中需氧菌、兼性厌氧菌和异养菌等细菌总数。

4 干扰和消除

氯具有氧化性，较高浓度的重金属离子具有毒性，它们都能破坏微生物细胞内酶的活性，最终导致细胞死亡。可分别加入硫代硫酸钠和乙二胺四乙酸二钠排除氯或重金属的干扰。

5 试剂和材料

除非另有说明，分析时均使用符合国家标准的分析纯化学试剂。

5.1 营养琼脂培养基

成分：

蛋白胨 10 g

牛肉膏	3 g
氯化钠	5 g
琼脂	15 g~20 g

制法：将上述成分或含有上述成分的市售成品溶解于1000 ml蒸馏水或去离子水中，调节pH值到7.4~7.6，分装于玻璃容器中，经121℃高压蒸汽灭菌20 min，储存于冷暗处备用。

5.2 无菌水：新制备的蒸馏水或去离子水经121℃高压蒸汽灭菌20 min，备用。

5.3 硫代硫酸钠（ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ）。

5.4 乙二胺四乙酸二钠（ $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）。

5.5 硫代硫酸钠溶液： $\rho(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 0.10 \text{ g/ml}$

称取硫代硫酸钠10g，溶于适量蒸馏水或去离子水中，定容至100 ml，现配。

5.6 乙二胺四乙酸二钠溶液： $\rho(\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = 0.15 \text{ g/ml}$

称取乙二胺四乙酸二钠15 g，溶于适量蒸馏水或去离子水中，定容至100 ml，此溶液保质期为30 d。

5.7 玻璃珠：直径3~8 mm。

6 仪器和设备

6.1 采样瓶：250 ml 带螺旋帽或磨口塞的广口玻璃瓶。

6.2 高压蒸汽灭菌器：121℃、101.3 kpa。

6.3 恒温培养箱：温度偏差±2℃。

6.4 pH计：准确到0.1 pH单位。

6.5 放大镜或菌落计数器。

6.6 一般实验室常用仪器和设备。

注：玻璃器皿及采样器具试验前要按无菌操作要求包扎，121℃高压蒸汽灭菌20 min备用。

7 样品

7.1 样品采集

与其他项目一同采样时，先单独采集微生物水样。采样瓶不得用水样洗涤，按无菌操作要求采集水样约200 ml于灭菌的采样瓶中。

采集江、河、湖、库等地表水水样时，可握住瓶子下部直接将带塞采样瓶插入水中，距水面10~15 cm处，瓶口朝水流方向，拔瓶塞，使水样灌入瓶内然后盖上瓶塞，将采样瓶从水中取出。如果没有水流，可握住瓶子水平前推。水样采好后，迅速扎上无菌包装纸。

从水龙头采集样品时，不要选用漏水的龙头，采水前可先将水龙头打开至最大，放水3~5 min，然后将水龙头关闭，用火焰灼烧约3 min灭菌，开足龙头，再放水1 min，以充分除去水管中的滞留杂质。采样时控制水流速度，小心接入瓶内。

采集地表水、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。

如果采集的是含有余氯或经过加氯处理的水样，需在采样瓶灭菌前加入硫代硫酸钠溶液（5.5），以除去余氯对细菌的抑制作用（每 125 ml 容积加入 0.1 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，则在采样瓶灭菌前加入乙二胺四乙酸二钠溶液（5.6），以消除干扰（每 125 ml 容积加入 0.3 ml 乙二胺四乙酸二钠溶液）。

注：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。

7.2 样品保存

采样后 2 h 内检测，否则，需 10℃ 以下冷藏并不得超过 6 h。实验室接样后，不能立即开展检测的，应将样品放入 0~4℃ 冰箱并 2 h 内测定。

8 分析步骤

8.1 样品稀释

将采集的水样加入适量无菌玻璃珠（5.7），用力振摇 20~25 次，使可能存在的细菌凝团成分散状。根据水样污染程度确定稀释度。以无菌操作方式吸取 1 ml 充分混匀的水样，注入盛有 9 ml 无菌水的试管中，混匀成 1:10 稀释样品。吸取 1:10 的稀释样品 1 ml 注入盛有 9 ml 无菌水的试管中，混匀成 1:100 稀释样品。按同法依次稀释成 1:1000、1:10000 稀释样品。每个水样至少应稀释 3 个适宜浓度。

8.2 接种

以无菌操作方式用 1 ml 灭菌的移液管吸取充分混匀的水样或稀释水样 1 ml，注入灭菌平皿中，倾注 15~20 ml 冷却到 44~47℃ 的营养琼脂培养基，并立即旋摇平皿，使水样与培养基充分混匀。每个水样或稀释样品倾注 2 个平皿。

8.3 培养

待平皿内的营养琼脂培养基冷却凝固后，翻转平皿，使底面向上（避免因表面水分凝结而影响细菌均匀生长），在 36±2℃ 条件下，恒温培养箱内培养 48±2 h 后观察结果。

8.4 结果判读

平皿上有较大片状菌落生长时，则不能使用。

片状菌落不到平皿的一半，而其余一半菌落分布又很均匀时，将此分布均匀的菌落计数，并乘以 2 代表全皿菌落总数。

外观（形态或颜色）相似，距离相近却不相触的菌落，只要它们之间的距离不小于最小菌落的直径，予以计数。紧密接触而外观相异的菌落，予以计数。

9 结果计算与表示

9.1 结果计算

以每个平皿菌落的总数或平均数（同一稀释度两个重复平皿的平均数）乘以稀释倍数来计算 1 ml 水样中的细菌总数。各种不同情况的计算方法如下：

选择平均菌落数在 30~300 之间者进行计数，当只有一个稀释度的平均菌落数符合此范围时，以该平均菌落数乘以其稀释倍数为细菌总数测定值（见表 1 例 1）。

若有两个稀释度平均菌落数均在 30~300 之间，计数则按二者之比值（二者分别乘以其稀释倍数后，较大值与较小值之比）来决定。若其比值小于 2，以两者的平均数为细菌总数测定值；若大于 2 则以稀释度较小的菌落总数为细菌总数测定值；若等于 2 亦以稀释度较小的菌落总数为细菌总数测定值（见表 1 例 2、例 3、例 4）。

若所有稀释度的平均菌落数均大于 300，则以稀释度最大的平均菌落数乘以稀释倍数为细菌总数测定值（见表 1 例 5）。

若所有稀释度的平均菌落数均小于 30，则以稀释度最小的平均菌落数乘以稀释倍数为细菌总数测定值（见表 1 例 6）。

若所有稀释度的平均菌落数均不在 30~300 之间，则以最接近 300 或 30 的平均菌落数乘以稀释倍数为细菌总数测定值（见表 1 例 7）。

表 1 稀释度选择及菌落总数测定值

示例	不同稀释度的平均菌落数			两个稀释度 菌落数之比	菌落总数 (CFU/ml)
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³		
1	1365	164	20	—	16400
2	2760	295	46	1.6	37750
3	2890	271	60	2.2	27100
4	150	30	8	2	1500
5	无法计数	1650	513	—	513000
6	27	11	5	—	270
7	无法计数	305	12	—	30500

9.2 结果表示：

测定结果保留两位有效数字，大于等于 100 时以科学计数法表示，结果的单位为 CFU/ml。平均值以几何平均计算。若所有稀释度的平皿上均无菌落生长，则以“未检出”表示。

10 精密度和准确度

10.1 精密度

6个实验室分别对低浓度（约 50 CFU/ml）、中浓度（约 3.2×10^3 CFU/ml）和高浓度（约 1.5×10^5 CFU/ml）三个不同浓度细菌总数的样品及有证标准样品（浓度为 95 MPN/ml，可接受范围为 22~168 MPN/ml）进行了测定，实验室内相对标准偏差范围分别为 2.4%~6.2%、0.59%~1.8%、0.29%~1.3%和 1.7%~5.6%；实验室间相对标准偏差分别为 18%、4.7%、2.4%和 3.7%；实验室间 95%置信区间见表 2。

表 2 实验室间 95%置信区间

低浓度（CFU/ml）		中浓度（CFU/ml）		高浓度（CFU/ml）		有证标准样品（CFU/ml）	
均值	95%置信区间	均值	95%置信区间	均值	95%置信区间	均值	95%置信区间
39	31~50	2.5×10^3	$1.7 \times 10^3 \sim 3.6 \times 10^3$	1.3×10^5	$9.8 \times 10^4 \sim 1.8 \times 10^5$	65	55~76

10.2 准确度

6个实验室对有证标准样品（浓度为 95 MPN/ml，可接受范围为 22~168 MPN/ml）进行测定，实验室内相对误差范围为-13%~-4.6%；相对误差的最终值为-8.7%±6.5%。

注：微生物检测数据为偏态分布，其测定结果全部经以 10 为底对数转换后进行计算。

11 质量保证和质量控制

11.1 培养基检验

更换不同批次培养基时要进行阳性菌株检验，以确保其符合要求。

11.2 培养基保存

配置好的培养基不易保存过久，不能进行多次融化操作，以少量勤配为宜。存放时应避免阳光直射，并且要避免杂菌侵入和水分蒸发。当培养基颜色变化或脱水明显时应废弃不用。

11.3 空白试验

每次试验都要用无菌水做实验室空白测定，培养后平皿上不得有菌落生长。否则，该次样品测定结果无效，应查明原因后重新测定。

12 废物处理

使用后的器皿及废弃物须经 121℃ 高压蒸汽灭菌 20 min 后，器皿方可清洗，废弃物作为一般废物处置。