

本电子版为发布稿。请以中国环境科学出版社出版的正式标准文本为准。

HJ

中华人民共和国环境保护行业标准

HJ/T 347—2007

水质 粪大肠菌群的测定 多管发酵法和滤膜法（试行）

Water quality—Determination of fecal coliform—manifold zymotechnics
and filter membrane

（发布稿）

2007-03-10 发布

2007-05-01 实施

国家环境保护总局 发布

目 次

前言	II
第一篇 多管发酵法	
1 适用范围	1
2 原理	1
3 培养基和试剂	1
4 步骤	2
5 结果的计算	2
第二篇 滤膜法	
1 适用范围	4
2 原理	4
3 培养基和试剂	4
4 步骤	5
5 结果的计算	6

前 言

为规划《地表水环境质量标准》(GB3838-2002)的实施工作,制定本试行标准。

本标准规定了地表水、地下水及废水中粪大肠菌群的多管发酵法和滤膜法。

本标准适用于地表水、地下水及废水中粪大肠菌群的测定。

本标准为首次制订。

本标准由国家环境保护总局科技标准司提出。

本标准由国家环境保护总局水和废水监测分析方法编委会组织中国环境监测总站等单位起草。

本标准国家环境保护总局 2007 年 3 月 10 日批准。

本标准自 2007 年 5 月 1 日起实施。

本标准由国家环境保护总局解释。

水质 粪大肠菌群的测定

粪大肠菌群是总大肠菌群中的一部分，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。用提高培养温度的方法，造成不利于来自自然环境的大肠菌群生长的条件，使培养出来的菌主要为来自粪便中的大肠菌群，从而更准确地反映出水质受粪便污染的情况。粪大肠菌群的测定可以用多管发酵法和滤膜法。

第一篇 多管发酵法

1 适用范围

本标准适用于地表水、地下水及废水中粪大肠菌群的测定。

2 原理

多管发酵法是以最可能数（most probable number）简称 MPN 来表示试验结果的。实际上它是根据统计学理论，估计水体中的大肠杆菌密度和卫生质量的一种方法。如果从理论上考虑，并且进行大量的重复检定，可以发现这种估计有大于实际数字的倾向。不过只要每一稀释度试管重复数目增加，这种差异便会减少，对于细菌含量的估计值，大部分取决于那些既显示阳性又显示阴性的稀释度。因此在实验设计上，水样检验所要求重复的数目，要根据所要求数据的准确度而定。

3 培养基和试剂

本标准所用试剂除另有注明外，均为符合国家标准的分析纯化学试剂；实验用水为新制备的去离子水。

3.1 单倍乳糖蛋白胨培养液：

成分：	蛋白胨	10g
	牛肉浸膏	3g
	乳糖	5g
	氯化钠	5g
	1.6%溴甲酚紫乙醇溶液	1mL
	蒸馏水	1000mL

制法：将蛋白胨、牛肉浸膏、乳糖、氯化钠加热溶解于 1000mL 蒸馏水中，调节 pH 为 7.2~7.4，再加入 1.6%溴甲酚紫乙醇溶液 1mL，充分混匀，分装于含有倒置的小玻璃管的试管中，于高压蒸汽灭菌器中，在 115℃ 灭菌 20min，贮存于暗处备用。

3.2 三倍乳糖蛋白胨培养液：按上述配方比例三倍（除蒸馏水外），配成三倍浓缩的乳糖蛋白胨培养液，制法同上。

3.3 EC 培养液:

成分:	胰胨	20g
	乳糖	5g
	胆盐三号	1.5g
	磷酸氢二钾 (K_2HPO_4)	4g
	磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)	1.5g
	氯化钠	5g
	蒸馏水	1000mL

制法: 将上述成分加热溶解, 然后分装于含有玻璃倒管的试管中。置高压蒸汽灭菌器中, 115℃灭菌 20min。灭菌后 pH 应为 6.9。

3.4 培养基的存放

在密封瓶中的脱水培养基成品要存放在大气湿度低、温度低于 30℃的暗处, 存放时应避免阳光直接照射, 并且要避免杂菌侵入和液体蒸发。当培养液颜色变化, 或体积变化明显时废弃不用。

4 步骤

4.1 水样接种量

将水样充分混匀后, 根据水样污染的程度确定水样接种量。每个样品至少用三个不同的水样量接种。同一接种水样量要有五管。

相对未受污染的水样接种量为 10mL、1mL、0.1mL。受污染水样接种量根据污染程度接种 1mL、0.1mL、0.01mL 或 0.1mL、0.01mL、0.001mL 等。使用的水样量可参考下表 1。

表 1 接种用水量参考表

水样种类	检测方法	接种量(mL)								
		100	50	10	1	0.1	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
井水	多管发酵法			×	×	×				
河水、塘水	多管发酵法				×	×	×			
湖水、塘水	多管发酵法						×	×	×	
城市原污水	多管发酵法							×	×	×

如接种体积为 10mL, 则试管内应装有三倍浓度乳糖蛋白胨培养液 5mL; 如接种量为 1mL 或少于 1mL, 则可接种于普通浓度的乳糖蛋白胨培养液 10mL 中。

4.2 初发酵试验

将水样分别接种到盛有乳糖蛋白胨培养液的发酵管中。在 37℃±0.5℃下培养 24h±2h。产酸和产气的发酵管表明试验阳性。如在倒管内产气不明显, 可轻拍试管, 有小气泡升起的为阳性。

4.3 复发酵试验

轻微振荡初发酵试验阳性结果的发酵管, 用 3mm 接种环或灭菌棒将培养物转接到 EC 培养液中。在 44.5℃±0.5℃温度下培养 24h±2h (水浴箱的水面应高于试管中培养基液面)。接种后所有发酵管必须在 30min 内放进水浴中。培养后立即观察, 发酵管产气则证实为粪大肠菌群阳性。

5 结果的计算

根据不同接种量的发酵管所出现阳性结果的数目, 从表 2 或表 3 中查得每升水样中的粪大肠菌群。接种水样为 100mL 2 份、10mL 10 份、总量 300mL 时, 查表 2 可得每升水样中的粪大肠菌群; 接种 5 份 10mL 水样、5 份 1mL 水样、5 份 0.1mL 水样时, 查表 3 求得 MPN 指数, MPN 值再乘 10, 即为 1L 水样中的粪大肠菌群。

如果接种的水样不是 10mL、1mL 和 0.1mL，而是较低的或较高的三个浓度的水样量，也可查表 3 求得 MPN 值，再经下式计算成每 100mL 的 MPN 值。

$$\text{MPN值} = \text{MPN指数} \times \frac{10(\text{mL})}{\text{接种量最大的一管(mL)}}$$

表 2 粪大肠菌群检数表
(接种水样 100mL2 份、10mL10 份、总量 300m)

10mL 水量的阳性管数	100mL 水量的阳性瓶数		
	0	1	2
	1L 水样中粪大肠菌群数	1L 水样中粪大肠菌群数	1L 水样中粪大肠菌群数
0	<3	4	11
1	3	8	18
2	7	13	27
3	11	18	38
4	14	24	52
5	18	30	70
6	22	36	92
7	27	43	120
8	31	51	161
9	36	60	230
10	40	69	>230

表 3 最可能数 (MPN) 表
(接种 5 份 10mL 水样、5 份 1mL 水样、5 份 0.1mL 水样时，不同阳性及阴性情况下 100mL 水样中细菌数的最可能数和 95%可信限值)

出现阳性份数			每 100mL 水样中细菌数的最可能数	95%置信区间		出现阳性份数			每 100mL 水样中细菌数的最可能数	95%置信区间	
10mL 管	1mL 管	0.1mL 管		下限	上限	10mL 管	1mL 管	0.1mL 管		下限	上限
0	0	0	<2			4	2	1	26	9	78
0	0	1	2	<0.5	7	4	3	0	27	9	80
0	1	0	2	<0.5	7	4	3	1	33	11	93
0	2	0	4	<0.5	11	4	4	0	34	12	93
1	0	0	2	<0.5	7	5	0	0	23	7	70
1	0	1	4	<0.5	11	5	0	1	34	11	89
1	1	0	4	<0.5	11	5	0	2	43	15	110
1	1	1	6	<0.5	15	5	1	0	33	11	93
1	2	0	6	<0.5	15	5	1	1	46	16	120
2	0	0	5	<0.5	13	5	1	2	63	21	150
2	0	1	7	1	17	5	2	0	49	17	130
2	1	0	7	1	17	5	2	1	70	23	170
2	1	1	9	2	21	5	2	2	94	28	220
2	2	0	9	2	21	5	3	0	79	25	190

2	3	0	12	3	28	5	3	1	110	31	250
3	0	0	8	1	19	5	3	2	140	37	310
3	0	1	11	2	25	5	3	3	180	44	500
3	1	0	11	2	25	5	4	0	130	35	300
3	1	1	14	4	34	5	4	1	170	43	190
3	2	0	14	4	34	5	4	2	220	57	700
3	2	1	17	5	46	5	4	3	280	90	850
3	3	0	17	5	46	5	4	4	350	120	1000
4	0	0	13	3	31	5	5	0	240	68	750
4	0	1	17	5	46	5	5	1	350	120	1000
4	1	0	17	5	46	5	5	2	540	180	1400
4	1	1	21	7	63	5	5	3	920	300	3200
4	1	2	26	9	78	5	5	4	1600	640	5800
4	2	0	22	7	67	5	5	5	≥2400		

第二篇 滤膜法

1 适用范围

本标准适用于一般地表水、地下水及废水中粪大肠菌群的测定。用于检验加氯消毒后的水样时，在滤膜法之前，应先做实验，证实它所得的数据资料与多管发酵试验所得的数据资料具有可比性。

2 原理

滤膜是一种微孔性薄膜。将水样注入已灭菌的放有滤膜（孔径 0.45μm）的滤器中，经过抽滤，细菌即被截留在膜上，然后将滤膜贴于 M-FC 培养基上，44.5℃温度下进行培养，计数滤膜上生长的此特性的菌落数，计算出每 1L 水样中含有粪大肠菌群数。

3 培养基和试剂

本标准所用试剂除另有注明外，均为符合国家标准的分析纯化学试剂；实验用水为新制备的去离子水。

3.1 M-FC 培养基：

成分：	胰胨	10g
	蛋白胨	5g
	酵母浸膏	3.0g
	氯化钠	5.0g
	乳糖	12.5g
	胆盐三号	1.5g
	1%苯胺蓝水溶液	10mL
	1%玫瑰色酸溶液（溶于 0.2mol/L 氢氧化钠液中）	10mL
	蒸馏水	1000mL

制法：将上述培养基中的成分（除苯胺蓝和玫瑰色酸外），置于蒸馏水中加热溶解，调节 pH 为 7.4，

分装于小烧瓶内，每瓶 100mL，于 115℃灭菌 20min。贮于冰箱中备用。临用前，按上述配方比例，用灭菌吸管分别加入已煮沸灭菌的 1%苯胺蓝溶液 1mL 及新配制的 1%玫瑰色酸溶液（溶于 0.2mol/L 氢氧化钠液中）1mL，混合均匀。加热溶解前，加入 1.2%~1.5%琼脂可制成固体培养基。如培养物中杂菌不多，则培养基中不加玫瑰色酸亦可。

3.2 培养基的存放

在密封瓶中的脱水培养基成品要存放在大气湿度低、温度低于 30℃的暗处，存放时应避免阳光直接照射，并且要避免杂菌侵入和液体蒸发。当培养液颜色变化，或体积变化明显时废弃不用。

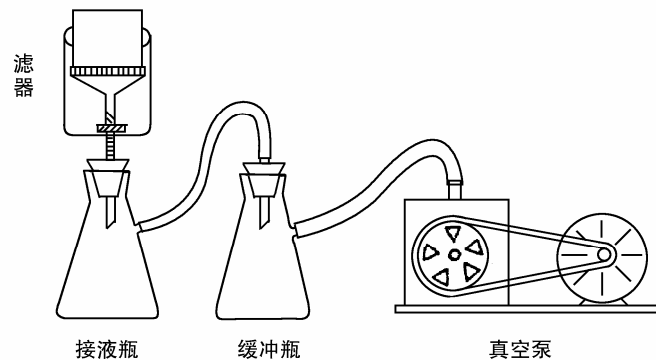
4 步骤

4.1 水样量的选择：水样量的选择根据细菌受检验的特征和水样中预测的细菌密度而定。如未知水样中粪大肠菌的密度，就应按下表所列体积过滤水样，以得知水样的粪大肠杆菌密度。先估计出适合在滤膜上计数所应使用的体积，然后再取这个体积的 1/10 和 10 倍，分别过滤。理想的水样体积是一片滤膜上生长 20~60 个粪大肠菌群菌落，总菌落数不得超过 200 个。使用的水样量可参考下表。

水样种类	检测方法	接种量(mL)								
		100	50	10	1	0.1	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
较清洁的湖水	滤膜法	×	×	×						
一般的江水	滤膜法		×	×	×					
城市内的河水	滤膜法				×	×	×			
城市原污水	滤膜法					×	×	×		

4.2 滤膜及滤器的灭菌：将滤膜放入烧杯中，加入蒸馏水，置于沸水浴中煮沸灭菌三次，每次 15min。前两次煮沸后需更换水洗涤 2~3 次，以除去残留溶剂。也可用 121℃灭菌 10min，10min 一到，迅速将蒸汽放出，这样可以尽量减少滤膜上凝集的水分。滤器、接液瓶和垫圈分别用纸包好，在使用前经 121℃高压蒸汽灭菌 30min。滤器灭菌也可用点燃的酒精棉球火焰灭菌。

4.3 过滤装置安装：以无菌操作把滤器装置依照下图装好。



4.4 过滤：用无菌镊子夹取灭菌滤膜边缘，将粗糙面向上，贴放在已灭菌的滤床上，稳妥地固定好滤器。将适量的水样注入滤器中，加盖，开动真空泵即可抽滤除菌。

3.5 培养：使用 M-FC 培养基。培养基含或不含琼脂，不含琼脂的培养基使用已用 M-FC 培养基饱和的无菌吸收垫。将滤过水样的滤膜置于琼脂或吸收垫表面。将培养皿紧密盖好后，置于能准确恒温于 44.5℃±0.5℃的恒温培养箱或恒温水浴中，经 24h±2h 培养。若用恒温水浴培养，则需用防水胶带贴封每个平皿，将培养皿成叠封入防水塑料袋或容器内，浸没在 44.5℃±0.5℃恒温水浴中。在培养时间内，装培养皿的塑料袋必须用重物坠于水面之下，以保持所需的严格温度。所有已制备的培养物都应在过滤后 30min 内浸入水浴内。

5 结果的计算

粪大肠菌群菌落在 M-FC 培养基上呈蓝色或蓝绿色，其他非粪大肠菌群菌落呈灰色、淡黄色或无色。正常情况下，由于温度和玫瑰酸盐试剂的选择性作用，在 M-FC 培养基上很少见到非粪大肠菌群菌落。必要时可将可疑菌落接种于 EC 培养液， $44.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{h} \pm 2\text{h}$ ，如产气则证实为粪大肠菌群。

计数呈蓝或蓝绿色的菌落，计算出每 1L 水样中的粪大肠菌群数。

$$\text{粪大肠菌群菌落数 (个/L)} = \frac{\text{滤膜上生长的粪大肠菌群菌落数} \times 1000}{\text{过滤水样量(ml)}}$$