

中华人民共和国国家环境保护标准

HJ 755-2015

水质 总大肠菌群和粪大肠菌群的测定 纸片快速法

Water quality Determination of total coliforms and fecal coliforms
Paper strip method
(发布稿)

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。

2015-10-22 发布

2015-12-01 实施

环 境 保 护 部 发 布

目 次

前 言.....	ii
1 适用范围.....	1
2 术语与定义.....	1
3 方法原理.....	1
4 试剂和材料.....	1
5 仪器和设备.....	2
6 样品.....	2
7 分析步骤.....	3
8 结果计算与表示.....	5
9 精密度和准确度.....	5
10 质量保证和质量控制.....	6
11 废物处理.....	6
附录 A（资料性附录）结果判定参考图片.....	7
附录 B（资料性附录）最大可能数（MPN）表.....	8

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，规范水中总大肠菌群和粪大肠菌群的测定方法，制定本标准。

本标准规定了地表水和废水中总大肠菌群和粪大肠菌群测定的纸片快速法。

本标准首次发布。

本标准附录 A 和附录 B 为资料性附录。

本标准由环境保护部科技标准司组织制订。

本标准主要起草单位：常州市环境监测中心、环境保护部环境标准研究所。

本标准验证单位：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站、南京市环境监测中心站和泰州市环境监测中心站。

本标准环境保护部 2015 年 10 月 22 日批准。

本标准自 2015 年 12 月 1 日起实施。

本标准由环境保护部解释。

水质 总大肠菌群和粪大肠菌群的测定 纸片快速法

1 适用范围

本标准规定了测定水中总大肠菌群和粪大肠菌群的纸片快速法。

本标准适用于地表水、废水中总大肠菌群和粪大肠菌群的快速测定。

本方法的检出限为 20 MPN/L。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

2.1 总大肠菌群 total coliforms

37℃培养，24h 内能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。

2.2 粪大肠菌群 fecal coliforms

44.5℃培养，24h 内能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。

2.3 最大可能数 most probable number, MPN

微生物检验常用发酵法，又称稀释法，是一种利用统计学原理定量检测微生物浓度的方法。它根据不同稀释度一定体积样品中被检微生物存在与否的频率，查表求得样品中微生物的浓度，与直接报告菌落数的平板计数法不同，它最终报告的是样品中最有可能存在的目标微生物浓度，这个以最大可能存在的浓度，就被称为最大可能数（most probable number，缩写为 MPN）。

3 方法原理

按 MPN 法，将一定量的水样以无菌操作的方式接种到吸附有适量指示剂（溴甲酚紫和 2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑即 TTC）以及乳糖等营养成分的无菌滤纸上，在特定的温度（37℃或 44.5℃）培养 24 h，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腓（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，从而确定是否有总大肠菌群或粪大肠菌群存在，再通过查 MPN 表就可得出相应总大肠菌群或粪大肠菌群的浓度值。

4 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。

4.1 市售水质总大肠菌群和粪大肠菌群测试纸片：10 ml 水样量纸片、1 ml 水样量纸片

按以下方法进行质量鉴定，达到要求后方可使用。

（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）纸片外观应整洁无毛边，无损坏，呈均匀淡黄绿色，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。



纸片不加水



纸片加水

(3) 纸片加入相应水样，充分浸润、吸收后，将内包装聚丙烯薄膜袋倒置，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薄膜袋应无菌，加入相应水量的无菌水， $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后，纸片应无微生物生长，其紫色保持不变，且无红斑出现。

(6) 按 7.4.2 中的方法进行总大肠菌群和粪大肠菌群阴性、阳性标准菌株检验，其特性应符合要求。

4.2 无菌水

用新制备的去离子水或蒸馏水，按无菌操作要求， $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压蒸汽灭菌 20 min，备用。

4.3 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 10 g，溶于适量蒸馏水（或去离子水）中，稀释至 100 ml，现配。

4.4 乙二胺四乙酸二钠（EDTA- Na_2 ）溶液： $\rho(\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O})=0.15\text{ g/ml}$

称取 EDTA- Na_2 15 g，溶于适量蒸馏水（或去离子水）中，稀释至 100 ml，此溶液保质期为 30 d。

5 仪器和设备

5.1 恒温培养箱： $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

5.2 恒温培养箱： $44.5\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

5.3 高压蒸汽灭菌器： $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、101.3 kpa。

5.4 冰箱： $0\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

5.5 移液管： $1\pm 0.01\text{ ml}$ 、 $10\pm 0.1\text{ ml}$ 。

5.6 试管： $\phi 15\text{ mm}\times 150\text{ mm}$ 。

5.7 采样瓶：250 ml。

注 1：移液管、试管、采样瓶等玻璃器皿及采样器具试验前要按无菌操作要求包扎， $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压蒸汽灭菌 20 min，烘干，备用。

6 样品

6.1 样品采集

与其他项目一同采样时，先单独采集微生物样品，采样瓶不得用水样洗涤，按无菌操作的要求采集水样约 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，拔玻塞，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。采好水样后，迅速扎上无菌包装纸。

从龙头装置采集样品时，不要选用漏水的龙头，采水前将龙头打开至最大，放水 3~5 min；然后将龙头关闭，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。

6.2 样品保存

采样后 2 h 内检测，否则，需 10 °C 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 °C 冰箱并 2 h 内测定。

6.3 干扰和消除

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（4.3）0.2 ml；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（EDTA-Na₂）溶液（4.4）0.6 ml，以消除干扰。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。酸性样品，需在分析前按无菌操作要求调节样品的 pH 值至 7.0~8.0。

注 2：10 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 分析步骤

以下步骤均在无菌操作的条件下进行。

7.1 接种水样的准备

当每张纸片接种水样量为 10 ml 或 1 ml 时，充分混匀水样备用即可。

当每张纸片接种水样量小于 1 ml 时，水样应制成稀释样品后使用。接种量为 0.1 ml、0.01 ml 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 1 ml 水样，注入盛有 9 ml 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。

7.2 水样接种

7.2.1 接种量

每个样品按三个 10 倍递减的不同接种量接种，每个接种量分别接种 5 张纸片，共接种 15 张纸片。

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，避免出现所有三个不同接种量共 15 张纸片全部为阳性或者全部为阴性。

清洁水样的参考接种量分别为 10 ml、1 ml、0.1 ml，受污染水样参考接种量根据污染程度可接种 1 ml、0.1 ml、0.01 ml 或 0.1 ml、0.01 ml、0.001 ml 等，见下表 1。

7.2.2 接种

清洁水样，接种水样总量为 55.5 ml，10 ml 水样量纸片 5 张，每张接种水样 10 ml，1 ml 水样量纸片 10 张，其中 5 张各接种水样 1 ml，另 5 张各接种 1:10 的稀释水样 1 ml。受污染水样，接种 3 个不同稀释度的 1 ml 稀释水样各 5 张。

接种水样应均匀滴加在纸片上，纸片充分浸润、吸收水样，用手在聚丙烯塑膜袋外侧轻轻抚平，做好标记。

注3：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“6.3 干扰和消除”去除。

表1 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						▲	▲	▲

7.3 培养

检测总大肠菌群时，在 37±1 °C 的条件下培养 18~24 h 后观察结果；检测粪大肠菌群时，在 44.5±0.5 °C 的条件下培养 18~24 h 后观察结果。

注4：检测粪大肠菌群时，纸片接种后应立即放置于 44.5±0.5 °C 的恒温培养箱中培养，在常温下放置过久将影响检测结果的准确性。

7.4 对照试验

7.4.1 空白对照

用无菌水做全程序空白测定，培养后的纸片上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。

7.4.2 阳性及阴性对照

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*）；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*）。

上述标准菌株均制成浓度为 300~3000 个/ml 的菌悬液，分别取相应水量的菌悬液接种纸片，阳性与阴性菌株各 5 张，按“7.3 培养”要求培养，大肠埃希氏菌应呈现阳性反应；金黄色葡萄球菌、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。

注5：可先制备较高浓度菌悬液，采用血球计数器在显微镜下对其浓度进行初步测定，然后根据实际情况用无菌水稀释至 300~3000 个/ml。

7.5 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，为阴性。

结果判读参照图片见附录 A。

8 结果计算与表示

8.1 结果计算

根据不同接种量的阳性纸片数量，查 MPN 表（附录 B）得到 MPN 值（MPN / 100 ml），按公式（1）换算并报告 1 L 水样中总大肠菌群或粪大肠菌群数：

$$C = 100 \times \frac{M}{Q} \quad (1)$$

式中：

C——水样总大肠菌群或粪大肠菌群浓度（MPN / L）

M——查 MPN 表得到的 MPN 值（MPN / 100 ml）

Q——实际水样最大接种量（ml）

100——为 10×10 ml，其中，10 将 MPN 值的单位 MPN/100 ml 转换为 MPN/L，10 ml 为 MPN 表中最大接种量

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。平均值以几何平均计算。

9 精密度和准确度

微生物检测数据为偏态分布，按其统计分析要求，其检测结果全部经对数（以 10 为底）转换后进行以下分析。

9.1 精密度

6 家实验室分别对有证标准样品（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 家实验室分别对有证标准样品（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。

9.2 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%。

10 质量保证和质量控制

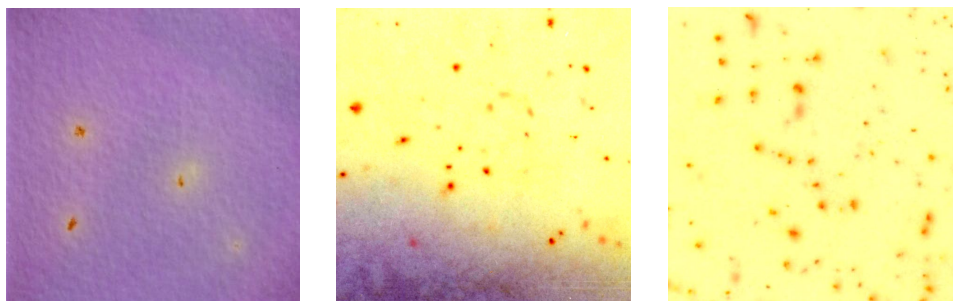
10.1 必须使用质量鉴定合格的纸片。

10.2 每批样品按“7.4 对照试验”进行全程序空白测定，并使用有证标准菌株进行阳性、阴性对照试验。

11 废物处理

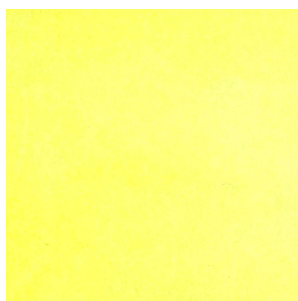
使用后的器皿及废弃物须经 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min 后，器皿方可清洗，废弃物作为一般废物处置。

附录 A
(资料性附录)
结果判定参考图片



阳 性

(纸片上出现红斑或红晕且周围变黄)



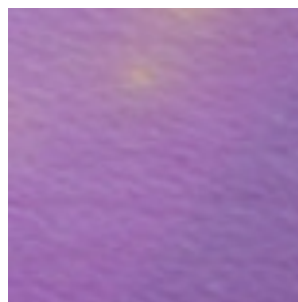
阳 性

(纸片全片变黄，无红斑或红晕)



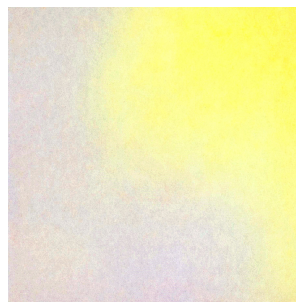
阴 性

(纸片无变化)



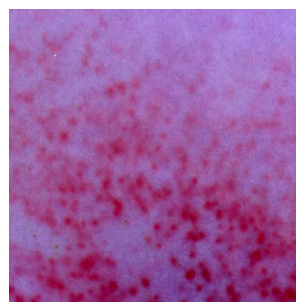
阴 性

(纸片部分变黄，无红斑或红晕)



阴 性

(纸片的紫色背景上出现红斑或红晕，而周围不变黄)



附录 B

(资料性附录)

最大可能数 (MPN) 表

(水样接种量为 5 份 10 ml, 5 份 1 ml, 5 份 0.1 ml)

各接种量阳性份数			MPN/100ml	95%置信限		各接种量阳性份数			MPN/100ml	95%置信限	
10ml	1ml	0.1ml		下限	上限	10ml	1ml	0.1ml		下限	上限
0	0	0	<2			3	0	0	8	1	19
0	0	1	2	<0.5	7	3	0	1	11	2	25
0	0	2	4	<0.5	7	3	0	2	13	3	31
0	0	3	5			3	0	3	16		
0	0	4	7			3	0	4	20		
0	0	5	9			3	0	5	23		
0	1	0	2	<0.5	7	3	1	0	11	2	25
0	1	1	4	<0.5	11	3	1	1	14	4	34
0	1	2	6	<0.5	15	3	1	2	17	5	46
0	1	3	7			3	1	3	20	6	60
0	1	4	9			3	1	4	23		
0	1	5	11			3	1	5	27		
0	2	0	4	<0.5	11	3	2	0	14	4	34
0	2	1	6	<0.5	15	3	2	1	17	5	46
0	2	2	7			3	2	2	20	6	60
0	2	3	9			3	2	3	24		
0	2	4	11			3	2	4	27		
0	2	5	13			3	2	5	31		
0	3	0	6	<0.5	15	3	3	0	17	5	46
0	3	1	7			3	3	1	21	7	63
0	3	2	9			3	3	2	24		
0	3	3	11			3	3	3	28		
0	3	4	13			3	3	4	32		
0	3	5	15			3	3	5	36		
0	4	0	8			3	4	0	21	7	63
0	4	1	9			3	4	1	24	8	72
0	4	2	11			3	4	2	28		
0	4	3	13			3	4	3	32		

各接种量阳性份数			MPN/100ml	95%置信限		各接种量阳性份数			MPN/100ml	95%置信限	
10ml	1ml	0.1ml		下限	上限	10ml	1ml	0.1ml		下限	上限
0	4	4	15			3	4	4	36		
0	4	5	17			3	4	5	40		
0	5	0	9			3	5	0	25	8	75
0	5	1	11			3	5	1	29		
0	5	2	13			3	5	2	32		
0	5	3	15			3	5	3	37		
0	5	4	17			3	5	4	41		
0	5	5	19			3	5	5	45		
1	0	0	2	<0.5	7	4	0	0	13	3	31
1	0	1	4	<0.5	11	4	0	1	17	5	46
1	0	2	6	<0.5	15	4	0	2	21	7	63
1	0	3	8	1	19	4	0	3	25	8	75
1	0	4	10			4	0	4	30		
1	0	5	12			4	0	5	36		
1	1	0	4	<0.5	11	4	1	0	17	5	46
1	1	1	6	<0.5	15	4	1	1	21	7	63
1	1	2	8	1	19	4	1	2	26	9	78
1	1	3	10			4	1	3	31		
1	1	4	12			4	1	4	36		
1	1	5	14			4	1	5	42		
1	2	0	6	<0.5	15	4	2	0	22	7	67
1	2	1	8	1	19	4	2	1	26	9	78
1	2	2	10	2	23	4	2	2	32	11	91
1	2	3	12			4	2	3	38		
1	2	4	15			4	2	4	44		
1	2	5	17			4	2	5	50		
1	3	0	8	1	19	4	3	0	27	9	80
1	3	1	10	2	23	4	3	1	33	11	93
1	3	2	12			4	3	2	39	13	110
1	3	3	15			4	3	3	45		
1	3	4	17			4	3	4	52		
1	3	5	19			4	3	5	59		

各接种量阳性份数			MPN/100ml	95%置信限		各接种量阳性份数			MPN/100ml	95%置信限	
10ml	1ml	0.1ml		下限	上限	10ml	1ml	0.1ml		下限	上限
1	4	0	11	2	25	4	4	0	34	12	93
1	4	1	13			4	4	1	40	14	110
1	4	2	15			4	4	2	47		
1	4	3	17			4	4	3	54		
1	4	4	19			4	4	4	62		
1	4	5	22			4	4	5	69		
1	5	0	13			4	5	0	41	16	120
1	5	1	15			4	5	1	48		
1	5	2	17			4	5	2	56		
1	5	3	19			4	5	3	64		
1	5	4	22			4	5	4	72		
1	5	5	24			4	5	5	81		
2	0	0	5	<0.5	13	5	0	0	23	7	70
2	0	1	7	1	17	5	0	1	31	11	89
2	0	2	9	2	21	5	0	2	43	15	110
2	0	3	12	3	28	5	0	3	58	19	140
2	0	4	14			5	0	4	76	24	180
2	0	5	16			5	0	5	95		
2	1	0	7	1	17	5	1	0	33	11	93
2	1	1	9	2	21	5	1	1	46	16	120
2	1	2	12	3	28	5	1	2	63	21	150
2	1	3	14			5	1	3	84	26	200
2	1	4	17			5	1	4	110		
2	1	5	19			5	1	5	130		
2	2	0	9	2	21	5	2	0	49	17	130
2	2	1	12	3	28	5	2	1	70	23	170
2	2	2	14	4	34	5	2	2	94	28	220
2	2	3	17			5	2	3	120	33	280
2	2	4	19			5	2	4	150	38	370
2	2	5	22			5	2	5	180	44	520
2	3	0	12	3	28	5	3	0	79	25	190
2	3	1	14	4	34	5	3	1	110	31	250

各接种量阳性份数			MPN/100ml	95%置信限		各接种量阳性份数			MPN/100ml	95%置信限	
10ml	1ml	0.1ml		下限	上限	10ml	1ml	0.1ml		下限	上限
2	3	2	17			5	3	2	140	37	340
2	3	3	20			5	3	3	180	44	500
2	3	4	22			5	3	4	210	53	670
2	3	5	25			5	3	5	250	77	790
2	4	0	15	4	37	5	4	0	130	35	300
2	4	1	17			5	4	1	170	43	490
2	4	2	20			5	4	2	220	57	700
2	4	3	23			5	4	3	280	90	850
2	4	4	25			5	4	4	350	120	1000
2	4	5	28			5	4	5	430	150	1200
2	5	0	17			5	5	0	240	68	750
2	5	1	20			5	5	1	350	120	1000
2	5	2	23			5	5	2	540	180	1400
2	5	3	26			5	5	3	920	300	3200
2	5	4	29			5	5	4	1600	640	5800
2	5	5	32			5	5	5	≥2400	800	