

中华人民共和国国家环境保护标准

HJ 347.1-2018

部分代替 HJ/T 347-2007

水质 粪大肠菌群的测定 滤膜法

Water quality—Determination of fecal coliform—Membrane filtration

(发布稿)

本电子版为发布稿。请以中国环境出版集团出版的正式标准文本为准。

2018-12-26 发布

2019-06-01 实施

生态环境部 发布

目 次

前 言.....	ii
1 适用范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 方法原理.....	1
5 干扰和消除.....	1
6 试剂和材料.....	2
7 仪器和设备.....	2
8 样品.....	3
9 分析步骤.....	3
10 结果计算与表示.....	5
11 精密度和准确度.....	6
12 质量保证和质量控制.....	6
13 废物处理.....	7
14 注意事项.....	7
附录 A（资料性附录）粪大肠菌群检验记录及报告格式.....	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》，保护生态环境，保障人体健康，规范水中粪大肠菌群的测定方法，制定本标准。

本标准规定了测定地表水、地下水、生活污水和工业废水中粪大肠菌群的滤膜法。

本标准是对《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）滤膜法部分的修订。

本标准首次发布于2007年，原起草单位为中国环境监测总站。本次为第一次修订。

本次修订的主要内容如下：

——完善了方法原理的表述；

——增加了检出限；

——增加了规范性引用文件、术语和定义、干扰和消除、仪器和设备、样品采集、样品保存、精密度和准确度、质量保证和质量控制、废物处理等章节；

自本标准实施之日起，《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）废止。

本标准的附录A为资料性附录。

本标准由生态环境部生态环境监测司、法规与标准司组织制订。

本标准起草单位：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、铁岭市环境保护监测站和沈阳市疾病预防控制中心。

本标准生态环境部2018年12月26日批准。

本标准自2019年6月1日起实施。

本标准由生态环境部解释。

水质 粪大肠菌群的测定 滤膜法

1 适用范围

本标准规定了测定水中粪大肠菌群的滤膜法。

本标准适用于地表水、地下水、生活污水和工业废水中粪大肠菌群的测定。

本方法的检出限：当接种量为 100 ml 时，检出限为 10 CFU/L；当接种量为 500 ml 时，检出限为 2 CFU/L。

2 规范性引用文件

本标准引用了下列文件或其中的条款。凡是不注日期的引用文件，其有效版本适用于本标准。

GB/T 14581 水质 湖泊和水库采样技术指导

HJ 494 水质 采样技术指导

HJ/T 91 地表水和污水监测技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

粪大肠菌群 fecal coliforms

又称耐热大肠菌群（thermotolerant coliforms）。44.5℃培养 24 h，能在 MFC 选择性培养基上生长，发酵乳糖产酸，并形成蓝色或蓝绿色菌落的肠杆菌科细菌。

3.2

菌落形成单位 colony-forming units (CFU)

单位体积样品中的细菌群落总数。

4 方法原理

样品通过孔径为 0.45 μm 的滤膜过滤，细菌被截留在滤膜上，然后将滤膜置于 MFC 选择性培养基上，在特定的温度（44.5℃）下培养 24 h，胆盐三号可抑制革兰氏阳性菌的生长，粪大肠菌群能生长并发酵乳糖产酸使指示剂变色，通过颜色判断是否产酸，并通过呈蓝色或蓝绿色菌落计数，测定样品中粪大肠菌群浓度。

5 干扰和消除

5.1 活性氯具有氧化性，能破坏微生物细胞内的酶活性，导致细胞死亡，可在样品采集(8.1)

时加入硫代硫酸钠溶液（6.6）消除干扰。

5.2 重金属离子具有细胞毒性，能破坏微生物细胞内的酶活性，导致细胞死亡，可在样品采集（8.1）时加入乙二胺四乙酸二钠溶液（6.7）消除干扰。

6 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试剂或生物试剂，实验用水为蒸馏水或去离子水。

6.1 MFC 培养基。

胰胨	10 g
蛋白胨	5 g
酵母浸膏	3 g
氯化钠	5 g
乳糖	12.5 g
胆盐三号	1.5 g
1%苯胺蓝水溶液	10 ml
1%玫瑰红酸溶液（溶于 8.0 g/L 氢氧化钠液中）	10 ml

将上述培养基中的成分（除苯胺蓝和玫瑰红酸外），溶解于 1000 ml 水中，调节 pH 至 7.4，分装于三角烧瓶内，于 115℃ 高压蒸汽灭菌 20 min，储存于冷暗处备用。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% 苯胺蓝水溶液 1 ml 及 1% 玫瑰红酸溶液（溶于 8.0 g/L 氢氧化钠液中）1 ml，混合均匀。如培养物中杂菌不多，则不加玫瑰红酸亦可。加热溶解前，加入 1.2%~1.5% 琼脂可制成固体培养基。也可选用市售成品培养基。配制好的培养基避光、干燥保存，必要时在 5℃ ± 3℃ 冰箱中保存，分装到平皿中的培养基可保存 2~4 周。配制好的培养基不能进行多次融化操作，以少量勤配为宜。当培养基颜色变化，或脱水明显时应废弃不用。

6.2 无菌滤膜：直径 50 mm，孔径 0.45 μm 的醋酸纤维滤膜，按无菌操作要求包扎，经 121℃ 高压蒸汽灭菌 20 min，晾干备用；或将滤膜放入烧杯中，加入实验用水，煮沸灭菌 3 次，15 min/次，前 2 次煮沸后需更换水洗涤 2~3 次。

6.3 无菌水：取适量实验用水，经 121℃ 高压蒸汽灭菌 20 min，备用。

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

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

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

称取 15.7 g 硫代硫酸钠（6.4），溶于适量水中，定容至 100 ml，临用现配。

6.7 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 15 g 乙二胺四乙酸二钠（6.5），溶于适量水中，定容至 100 ml，此溶液可保存 30 d。

7 仪器和设备

7.1 采样瓶：1 L、500 ml 或 250 ml 带螺旋帽或磨口塞的广口玻璃瓶。

- 7.2 高压蒸汽灭菌器：115℃、121℃可调。
- 7.3 恒温培养箱：允许温度偏差 44.5℃±0.5℃。
- 7.4 过滤装置：配有砂芯滤器和真空泵，抽滤压力勿超过-50 kPa。
- 7.5 pH 计：准确到 0.1 pH 单位。
- 7.6 培养皿：直径 90 mm。
- 7.7 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。

8 样品

8.1 样品采集

点位布设及采样频次按照GB/T 14581、HJ/T 494和HJ/T 91的相关规定执行。

采集微生物样品时，采样瓶（7.1）不得用样品洗涤，采集样品于灭菌的采样瓶中。样品采集量可根据水体实际情况而定，一般不少于250 ml。

采集河流、湖库等地表水样品时，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，拔瓶塞，使样品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。样品采集完毕后，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 灭菌或用 70%~75%的酒精对龙头进行消毒，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样品时，也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。

如果采集的是含有活性氯样品，需在采样瓶灭菌前加入硫代硫酸钠溶液（6.6），以除去活性氯对细菌的抑制作用（每 125 ml 容积加入 0.1 ml 的硫代硫酸钠溶液）；如果采集的是重金属离子含量较高的样品，则在采样瓶灭菌前加入乙二胺四乙酸二钠溶液（6.7），以消除干扰（每 125 ml 容积加入 0.3 ml 的乙二胺四乙酸二钠溶液）。

注：15.7 mg 硫代硫酸钠（6.4）可去除样品中 1.5 mg 活性氯，硫代硫酸钠用量可根据样品实际活性氯量调整。

8.2 样品保存

采样后应在 2 h 内检测，否则，应 10℃ 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，将样品在 4℃ 以下冷藏并在 2 h 内检测。

9 分析步骤

9.1 样品过滤

根据样品的种类判断接种量，最小过滤体积为10 ml，如接种量小于10 ml时应逐级稀释。

先估计出适合在滤膜上计数所使用的体积，然后再取这个体积的1/10和10倍，分别过滤。理想的样品接种量是滤膜上生长的粪大肠菌群菌落数为20~60个，总菌落数不得超过200个。当最小过滤体积为10 ml，滤膜上菌落密度仍过大时，则应对样品进行稀释。1:10稀释的方法为：吸取10 ml样品，注入盛有90 ml无菌水（6.3）的三角烧瓶中，混匀，制成1:10稀释样品。样品接种量参考表见表1。

表1 接种量参考表

样品类型		接种量 (ml)							
		100	10	1	0.1	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
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			▲	▲	▲				

用灭菌镊子以无菌操作夹取无菌滤膜（6.2）贴放在已灭菌的过滤装置（7.4）上，固定好过滤装置，将样品充分混匀后抽滤，以无菌水（6.3）冲洗器壁2~3次。样品过滤完成后，再抽气约5 s，关上开关。

9.2 培养

用灭菌镊子夹取滤膜移放在MFC培养基（6.1）上，滤膜截留细菌面向上，滤膜应与培养基完全贴紧，两者间不得留有气泡，然后将培养皿倒置，放入恒温培养箱内，44.5℃±0.5℃培养24 h±2 h。

9.3 对照试验

9.3.1 空白对照

每次试验都要用无菌水（6.3）按照步骤9.1和9.2进行实验室空白测定。

9.3.2 阳性及阴性对照

将粪大肠菌群的阳性菌株（如大肠埃希氏菌*Escherichia coli*）和阴性菌株（如产气肠杆菌*Enterobacter aerogenes*）制成浓度为40~600 CFU/L的菌悬液，分别按照9.1~9.2步骤培养，阳性菌株应呈现阳性反应，阴性菌株应呈现阴性反应，否则，该次样品测定结果无效，应查明原因后重新测定。

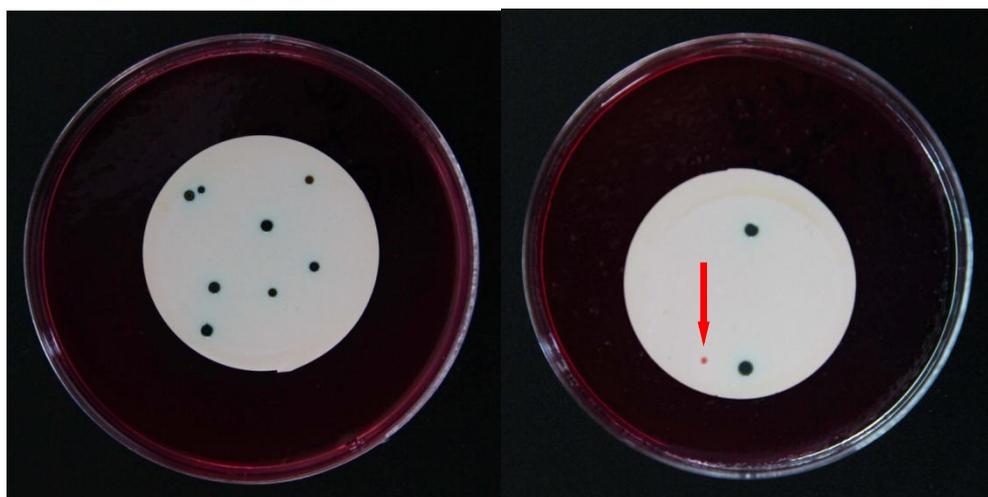
10 结果计算与表示

10.1 结果判读

MFC培养基上呈蓝色或蓝绿色的菌落为粪大肠菌群菌落，予以计数。

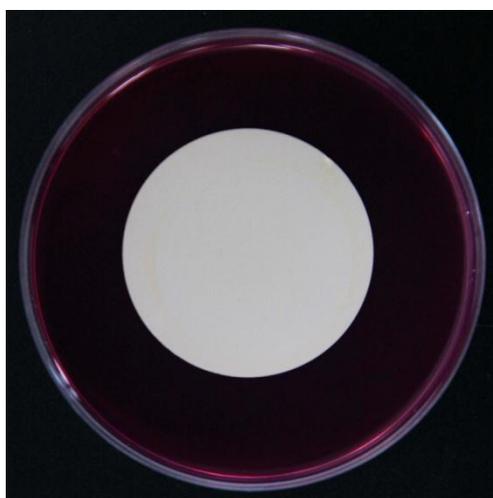
MFC培养基上呈灰色、淡黄色或无色的菌落为非粪大肠菌群菌落，不予计数。

结果判读参考图片见图1。



阳性菌落

阴性菌落(箭头指示处)



无菌落生长

图1 结果判读参考图片

10.2 结果计算

样品中的粪大肠菌群数 (CFU/L)，按照公式 (1) 进行计算：

$$C = \frac{C_1 \times 1000}{f} \quad (1)$$

式中： C ——样品中粪大肠菌群数，CFU/L；

C_f ——滤膜上生长的粪大肠菌群菌落总数，个；

1000——将过滤体积的单位由ml转换为L；

f ——样品接种量，ml；

注：若平行样结果都在20~60 CFU/L范围内，最终结果取平均值以几何平均计算。

10.3 结果表示

测定结果保留至整数位，最多保留两位有效数字，当测定结果 ≥ 100 CFU/L时，以科学计数法表示。粪大肠菌群检验记录及报告格式参见附录A。

11 精密度和准确度

11.1 精密度

6个实验室对低浓度（地下水，浓度均值为 2.0×10^2 CFU/L）、中浓度（地表水，浓度均值为 1.6×10^5 CFU/L）和高浓度（生活污水，浓度均值为 1.6×10^7 CFU/L）三个不同浓度粪大肠菌群的实际样品和有证标准样品（浓度为3670 MPN/L，可接受范围为330~7710 MPN/L）进行了6次重复测定：实验室内相对标准偏差范围分别为5.3%~12%、0.81%~2.1%、0.51%~4.2%和7.7%~9.8%；实验室间相对标准偏差分别为6.8%、3.9%、4.0%和3.6%；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/L)		中浓度 (CFU/L)		高浓度 (CFU/L)		标准样品 (CFU/L)	
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
2.0×10^2	$1.4 \times 10^2 \sim 2.9 \times 10^2$	1.6×10^5	$9.8 \times 10^4 \sim 2.6 \times 10^5$	1.6×10^7	$8.2 \times 10^6 \sim 3.0 \times 10^7$	6.1×10^2	$3.8 \times 10^2 \sim 9.9 \times 10^2$

11.2 准确度

6个实验室对含粪大肠菌群浓度为3670 MPN/L（可接受范围为330~7710 MPN/L）的标准样品进行了6次重复测定：相对误差范围为-19%~-32%；相对误差最终值为：-23% \pm 10%。

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。

12 质量保证和质量控制

12.1 培养基检验

更换不同批次培养基时要进行阳性和阴性菌株检验，将粪大肠菌群测定的阳性菌株（如大肠埃希氏菌 *Escherichia coli*）和阴性菌株（如产气肠杆菌 *Enterobacter aerogenes*）配成适宜浓度，按样品过滤（9.1）的要求使滤膜上生长的菌落数为20~60个，然后按培养（9.2）

的要求进行操作，阳性菌株应生长为蓝色或蓝绿色菌落，阴性菌株应生长为灰色、淡黄色、无色或无菌落生长。否则，该次样品测定结果无效，应查明原因后重新测定。

12.2 对照试验

12.2.1 空白对照

每次试验都要用无菌水做实验室空白测定（9.3.1），培养后的培养基上不得有任何菌落生长。否则，该次样品测定结果无效，应查明原因后重新测定。

12.2.2 阳性及阴性对照

定期按照 9.3.2 进行阳性及阴性对照试验，阳性菌株应呈现阳性反应，阴性菌株应呈现阴性反应，否则，该次样品测定结果无效，应查明原因后重新测定。

13 废物处理

使用后的废物及器皿须经 121℃ 高压蒸汽灭菌 30 min 或使用液体消毒剂（自制或市售）灭菌后，器皿方可清洗，废物作为一般废物处置。

14 注意事项

当样品浑浊度较高时，应选用其他方法。

附录 A
 (资料性附录)
 粪大肠菌群检验记录及报告格式

表 A.1 粪大肠菌群测定检验记录

项目名称: _____ 检验日期: 年 月 日

检验方法		方法依据	
灭菌锅型号		出厂编号	
培养箱型号		出厂编号	
培养基灭菌温度(℃)		培养温度(℃)	
样品编号:			
过滤体积		ml	
滤膜上生长的菌落总数			个
稀释倍数(D)			倍
结果			CFU/L

检验者: 校对: 审核:

注: 可根据实际工作需要自行设计表格, 至少要包括上述信息。

表 A.2 粪大肠菌群测定数据报告格式

样品来源			
采/送样日期		分析日期	
样品数量			
样品状态			
监测点位	样品编号	监测频次	
标准方法名称		标准方法编号	
测定值:		监测结果:	
备注			

注: 可根据实际工作需要自行设计表格, 至少要包括上述信息。