

附件 3

生态环境监测机构资质认定生物监测 方法验证技术规定

中国环境监测总站

2023 年 12 月

目 录

1 适用范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 生物监测方法的分类.....	1
5 基本条件确认.....	2
6 方法性能指标的验证.....	4
7 实际监测.....	6
附 录 A（资料性附录）生物监测方法验证典型案例	8

前 言

本技术规定是《生态环境监测机构资质认定方法验证通用技术指南》（以下简称《通用技术指南》）的配套文件，是生态环境监测机构开展生物监测方法验证的指导性文件。旨在规范生态环境监测机构生物监测方法的验证活动，确保方法验证过程科学合理，评价结论客观可靠。

本技术规定为首次发布，依据《通用技术指南》，综合考虑微生物检测、水生生物监测、急性毒性试验等生物监测方法的特性，并结合操作实践经验而制定。主要参考《环境监测分析方法标准制订技术导则》（HJ 168-2020）等。如有相关标准规范发布，则以其标准规范要求为准。

本技术规定从基本条件确认、方法性能指标的验证、实际监测 3 个方面，对生态环境监测机构开展的生物监测方法的验证活动，从操作层面给出了指导性的建议。

本技术规定的附录 A 为资料性附录。

本技术规定由中国环境监测总站组织编制。

本技术规定主要起草单位：中国环境监测总站、辽宁省生态环境监测中心、浙江省生态环境监测中心、云南省生态环境监测中心

本技术规定主要起草人员：丁振军、于海燕、金玉、彭跃、叶伟红、谢海涛、米方卓、李杨、王秋丽

本技术规定自 2024 年 5 月 1 日实施，由中国环境监测总站解释。

生态环境监测机构资质认定生物监测方法验证技术规定

1 适用范围

本规定明确了生态环境监测机构（以下简称“机构”）开展生物监测方法验证活动的技术要求，包括基本条件确认、方法性能指标的验证、实际监测等。

本规定适用于机构在申请资质认定时实施的微生物检测、水生生物监测、急性毒性试验等生物监测方法的验证。其他生态环境监测专项工作也可参考使用。

2 规范性引用文件

本规定引用了下列文件或其中的内容。凡是未注明日期的引用文件，其有效版本适用于本规定。

GB 4789.28	食品安全国家标准 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求
GB/T 16294	医药工业洁净室（区）沉降菌的测试方法
GB/T 30690	小型压力蒸汽灭菌器灭菌效果监测方法和评价要求
GB/T 25916.1	洁净室及相关受控环境生物污染控制 第1部分：一般原理和方法
HJ 1215	水质 浮游植物的测定 滤膜-显微镜计数法
HJ 1216	水质 浮游植物的测定 0.1ml 计数框-显微镜计数法
HJ 442.6	近岸海域环境监测技术规范 第六部分 近岸海域生物监测
SN/T 1538.2	培养基制备指南 第2部分：培养基性能测试实用指南 生态环境监测机构资质认定方法验证通用技术指南

3 术语和定义

《通用技术指南》中的术语和定义，以及下列术语和定义适用于本规定。

3.1

物种分类差异百分比（Percent Taxonomic Disagreement, PTD）

指同一样品，不同鉴定人员鉴定出物种数的差异。

3.2

计数差异百分比（Percent Difference in Enumeration, PDE）

指同一样品，不同鉴定人员个体数计数的差异。

4 生物监测方法的分类

4.1 微生物方法

微生物方法是指微生物在特定培养条件下使用特定培养基培养，对微生物进行鉴定或计数的方法。按照培养方式不同，微生物方法可分为滤膜法、多管发酵法、酶底物法、纸片快

速法和平皿计数法等。

4.2 水生生物监测

水生生物监测通常指采用肉眼、放大镜、显微镜等工具，观察淡水或海水中水生维管植物、浮游植物、浮游动物、着生藻类和大型底栖无脊椎动物等的形态特征，对照相关分类鉴定工具书、图谱库开展水生生物物种鉴定和计数。

4.3 急性毒性法

急性毒性法是指利用不同的受试生物对不同稀释倍数的水样或参比毒物的敏感度不同，通过 LC_{50} 、 EC_{50} 或参比毒物浓度表征水样毒性的方法。按照受试生物的不同，急性毒性法可分为发光细菌法、鱼类法、斑马鱼卵法和溞类法等。

5 基本条件确认

5.1 人员

5.1.1 参加生物监测方法验证的人员至少 1 人应具备生物或相关专业大专以上学历，并有 3 年以上生物监测工作经历；如果学历或专业不满足要求，则应有 5 年以上生物监测经历。

5.1.2 参加生物监测方法验证的人员应掌握和熟悉相关生物监测方法的基本原理、生物实验基本操作、相关仪器设备的使用维护、数据处理方法、质量控制技术、生物防护措施、生物危害识别、废弃物处理方法、生物安全事故应急处理方法等。

5.1.3 参加生物监测方法验证的人员应经过相应培训，培训内容包括但不限于：拟验证的标准方法、相关技术规范 and 法律法规、相关作业指导书等。水生生物监测人员经过系统的生物分类鉴定技术培训，具有一定的实践经验积累。

5.2 仪器设备

5.2.1 按照《通用技术指南》5.2.1 和 5.2.2 配备仪器设备。包括水生生物采样器材、冷藏箱、天平、pH 计、显微镜、离心机、过滤装置、恒温培养箱、分光光度计、生物毒性检测仪、压力蒸汽灭菌器、超净工作台或洁净室（无菌室）、程控定量封口机、鱼类养殖系统等。

5.2.2 经过检定/校准，并确认仪器设备的性能满足标准方法或技术规范的要求。用于样品、培养基等试剂冷藏以及菌种冷冻的冰箱，需定期监控温度。恒温培养箱应符合方法的温度范围和温控精度的要求。压力蒸汽灭菌器温度和压力应满足标准方法要求，可用压力蒸汽灭菌指示卡、指示胶带或生物指示物等方法检查灭菌效果。主要仪器设备要求见表 1。

表 1 主要仪器设备要求

仪器名称	相关要求
天平	检定/校准并确认，天平示值误差满足监测方法要求。
pH 计	检定/校准并确认，示值误差满足监测方法要求，精度 0.01 pH。
过滤装置	可高压蒸汽灭菌。
冰箱	冰箱温度满足培养基、质控样品、标准菌株保存温度要求。

仪器名称	相关要求
离心机	满足方法的转速要求。
生物显微镜	检定/校准并确认，光学性能满足水生生物分类鉴定要求。
恒温培养箱	检定/校准并确认，温度偏差、温度均匀度、温度波动度满足监测方法要求。
压力蒸汽灭菌器	检定/校准并确认，温度偏差、温度均匀度、温度波动度、灭菌温度和灭菌效果满足监测方法要求。
超净工作台或洁净室	提供微生物方法所需的无菌环境。
生物安全柜	生物安全等级满足安全防护要求。

5.3 标准物质及关键试剂耗材

5.3.1 按照《通用技术指南》5.3.1 配备标准物质及试剂耗材。

5.3.2 微生物方法的标准物质包括有证标准样品、质控样品或标准菌株。质控样品进行质量控制与人员考核，有证标准样品或标准菌株用于阴性对照、阳性对照、培养基检验。其来源可追溯，菌株成分、浓度等应符合标准方法的要求。必要时应按计划对标准菌株进行期间核查。

5.3.3 水生生物鉴定图谱库。检测人员应参考标准方法中推荐的水生生物分类学文献资料开展鉴定工作。机构应建立基于日常实际样品的水生生物鉴定图谱库，图谱应准确反映物种的形态特征和分类鉴定结果。机构应定期对图谱库进行维护和更新。如发现新物种或新记录种应保存标本和照片资料。

5.3.4 急性毒性的受试物种及参比毒物。急性毒性测定中的受试物种应有明确来源。发光细菌质量、大型溞和鱼类等受试生物的个体大小、发育或繁殖阶段、健康状况、驯养期间存活率或死亡率等应满足标准方法要求。采用急性毒性标准方法中规定的参比毒物用于受试生物敏感性验证和阳性对照试验。

5.3.5 微生物方法的关键试剂如培养基、微生物测试纸片等应按标准方法要求进行符合性检验，包括培养基和纸片批号、有效期、包装完整性检查，即用型培养基和商品化脱水合成培养基质量检查。自制培养基制备方法和保存应满足标准方法要求。培养基制备及质量保证可参考 SN/T 1538.2。应使用有证标准菌株对每批次培养基进行质量检验。

5.3.6 微生物方法的实验用水要求可参考 GB 4789.28，其他关键试剂耗材的规格、纯度应符合方法要求。

5.3.7 标准物质及关键试剂耗材应按照标准方法或使用说明书要求进行保存，确保其性状的稳定性和免受污染，并填写相关记录。

5.4 环境条件

5.4.1 生物监测实验室应以防止交叉污染和保障可靠的监测结果为前提进行合理布局。微生物实验室应做无菌区和操作区的功能划分并有明显标识，无菌器具和非灭菌器具也应有明显标识加以区分。水生生物监测和生物急性毒性法应根据方法中试验环境条件要求进行合理分区。

5.4.2 生物监测需监控和记录的环境条件包括但不限于：显微镜室环境温湿度、生物急性毒性试验过程的环境条件、洁净室灭菌效果等。洁净室灭菌效果检验可参考 GB/T 25916.1 和

GB/T 16294。也可使用紫外线强度指示卡等进行洁净室灭菌效果检验。

5.4.3 微生物方法中样品保存条件应监控并记录，包括样品运输过程和实验室中的保存温度及时间等。

5.4.4 采样器具和实验器皿的灭菌条件应监控并记录，依据 GB/T 30690 中化学指示胶带或生物指示物等方法，对压力蒸汽灭菌器灭菌效果进行监控。

5.4.5 应采取措​​施满足标准菌株、微生物培养基、生物标本保存等需避光的环境要求。

5.5 安全防护设施设备

5.5.1 人员在采样和实验分析过程中应做好个人防护。方法验证过程中所用到的安全防护设备和设施应满足标准方法的要求。必要时配备洁净室、超净工作台或生物安全柜，并保证其处于正常工作状态。应采取措​​施保证生物安全，防止病原微生物人间传染。

5.5.2 实验室应妥善处理微生物实验废弃物，培养后的废弃物应无菌处理后作为一般废物处置，并对废弃物灭菌处理时的温度、时间和灭菌效果监控。具有急性毒性的样品、含有参比毒物的废液以及受试生物，应分类收集、清晰标识、集中保管，委托有资质的单位统一处置。

5.6 原始记录

5.6.1 方法验证原始记录应包含但不限于以下内容：监测方法依据、样品编号、仪器名称及型号、计算公式、样品分析原始数据、计算结果、质量保证与质量控制结果、分析人员、复核人员或审核人员的识别和签名等。

5.6.2 微生物方法记录还应包括以下内容：

- (1) 采样记录中应包含样品采集时间（采样时间应精确到分钟）、样品保存温度等；
- (2) 分析记录中应包含培养基类型（市售或自配）、培养基灭菌温度及时间、培养温度及培养时间、样品稀释度、取样量、阳性结果等；
- (3) 压力蒸汽灭菌器和洁净室灭菌效果检查记录中应包含灭菌效果检查方法、检查效果和检查日期等；
- (4) 菌种传代记录中应包含菌种名称、代号、来源、传代次数、培养基名称、培养基灭菌温度及时间、保存温度及时间等。

5.6.3 水生生物监测记录还应包括以下内容：水生生物采样方式方法、采样工具及采样量、基质类型、生境特征、固定剂、样品前处理、浓缩倍数、取样体积、底栖动物挑拣比例、镜检计数方式和定性定量结果等。

5.6.4 急性毒性法记录还应包括以下内容：受试生物名称及来源、样品名称、性质、来源、试验时间、试验环境条件（试验培养用水、水温、溶解氧、pH、光照条件等）、阴性对照浓度及结果和阳性对照浓度及结果等。

6 方法性能指标的验证

6.1 方法性能指标的选择

微生物方法应对精密度、正确度、实际样品测定及质量控制指标等进行验证；水生生物方法应对精密度、实际样品测定及质量控制指标等进行验证；发光细菌急性毒性法应对精密

度和实际样品测定等进行验证。

6.2 检出限及测定下限

微生物方法的检出限是根据监测方法在特定加样量或抽滤体积条件下，查 MPN 表的最小值或检出一个阳性菌落的值作为检出限，故微生物方法无需进行检出限和测定下限的验证。浮游植物的测定检出限和测定下限按照 HJ 1215 和 HJ 1216 中要求验证。急性毒性法等无检出限的方法无需进行检出限和测定下限的验证。

6.3 精密度

6.3.1 按照《通用技术指南》6.2.4.1 要求验证方法的精密度。

6.3.2 微生物方法采用对同一样品在重复性条件下重复测定 6 次，测定结果应经对数转换后再用相对标准偏差评价其精密度。

6.3.3 水生生物方法精密度的验证可采用以下 2 种方式：

(1) 相同测试人员对密度计数的精密度验证。选取水生生物样品开展分类计数，计算 2 个平行样的相对偏差。

(2) 不同测试人员物种鉴定数的精密度验证。同一个样品，2 名测试人员分类计数后，计算物种分类差异百分比（PTD），PTD 计算方法参照总站发布的《水生态监测作业指导书》。

6.3.4 急性毒性试验样品应重复测定至少 3 次，计算相对标准偏差。

6.4 正确度

6.4.1 微生物方法按照《通用技术指南》6.2.5.1 要求，在标准方法适用范围内的每个基质类型中，至少选择一个有证标准样品（或质控样品）进行方法正确度验证，重复性测定次数应至少 3 次。也可根据实际情况，采用其他方法验证方法的正确度，如参加能力验证（考核）、协作定值、经典方法的比对等。

6.4.2 水生生物监测当前可通过检测人员集中比对、典型物种分类鉴定工具书和图谱库等开展正确度验证，待标准样品成熟后可使用标准样品进行正确度验证。

6.5 方法性能指标验证结果的评价

6.5.1 精密度

6.5.1.1 微生物方法精密度验证所得结果应符合标准方法实验室内相对标准偏差的相关要求；若标准方法给出了多家实验室验证结果，应小于或等于标准方法中近似浓度水平样品的实验室内相对标准偏差最大值。

6.5.1.2 水生生物方法，相同测试人员同一样品两次计数相对偏差应在-15%~15%范围内；不同测试人员物种分类差异百分比（PTD）浮游植物、着生藻类、底栖动物应 \leq 15%，浮游动物应 \leq 25%。

6.5.1.3 急性毒性法 3 次重复测定结果的相对标准偏差应 \leq 15%。

6.5.2 正确度

微生物方法有证标准样品（或质控样品）测定结果应在保证值范围内。

7 实际监测

7.1 实际样品的选择

7.1.1 按照《通用技术指南》7.1 和 7.2 要求进行实际样品测定。

7.1.2 如果无法获得有检出的实际样品，可采用标准物质配制样品或者微生物方法选择复苏的冻干粉样品进行验证，测定过程应覆盖取样、前处理和分析的监测过程。

7.2 样品采集和保存

7.2.1 涉及微生物的监测项目原则上需对样品采集过程（包括采样前的准备、采样和运输过程等）进行验证。当标准方法中包括采样程序时，按标准方法进行验证，否则按相关技术规范进行验证。

7.2.2 标准方法或相关技术规范中对采样过程有特殊要求的，需详细描述采样过程，否则仅说明采样依据、样品类型和保存方式即可。

7.3 样品前处理

根据实际情况详细描述样品前处理过程，包括前处理条件、操作过程等。

7.4 样品测试

样品测试过程按照各标准方法或技术规范要求执行。

7.5 质量控制措施

7.5.1 质量控制指标的选择

7.5.1.1 微生物方法

（1）空白试验

每次试验用无菌水按照样品分析的全过程进行实验室空白测定，检验试验器皿、培养基等的无菌性。

（2）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。

（3）阳性及阴性对照

微生物方法（除细菌总数外）应选择标准中要求的合适的有证标准菌株或者质控样品进行阳性对照试验及阴性菌株对照试验。

7.5.1.2 水生生物监测

每批次样品中，随机抽取 10%（至少 2 个）的样品平行测定，或利用水生生物鉴定质控比对样品，对参加生物鉴定的实验室进行考核。淡水水生生物采用总站发布的《水生态监测作业指导书》进行数据评估，海水水生生物采用 HJ 442.6 中实验室不同鉴定人员对种类鉴定的误差进行评估。

7.5.1.3 急性毒性法

（1）对照试验

每批样品应进行空白对照试验。发光细菌急性毒性法应选择氯化钠、斑马鱼卵法应选择

3,4-二氯苯胺进行对照试验。

(2) 参比毒物

鱼类法、溞类法选择重铬酸钾作为参比毒物进行毒性试验，测试试验生物的敏感性。

7.5.2 质量控制指标的评价

7.5.2.1 微生物方法

(1) 空白试验

空白试验培养后应无阳性菌落生长，否则该批次样品测定结果无效，应查明原因后重新测定。

(2) 培养基检验

培养基阳性和阴性菌株检验，阳性菌株应呈阳性反应，阴性菌株呈阴性反应，否则应查明原因后重新测定。

(3) 阳性及阴性对照

定量质控样品的测定值应在保证值范围内，阴性对照试验结果应为阴性。

7.5.2.2 水生生物监测

淡水中，浮游植物计数差异百分比（PDE）应 $\leq 15\%$ ，属级分类差异百分比（PTD）应 $\leq 15\%$ ；浮游动物计数差异百分比（PDE）应 $\leq 15\%$ ，属级分类差异百分比（PTD）应 $\leq 25\%$ ；着生藻类计数差异百分比（PDE）应 $\leq 15\%$ ，属级分类差异百分比（PTD）应 $\leq 15\%$ ；底栖动物计数差异百分比（PDE）应 $\leq 5\%$ ，物种分类差异百分比（PTD）应 $\leq 15\%$ 。海水中，实验室内不同鉴定人员对种类鉴定的误差应 $\leq 20\%$ 。

7.5.2.3 生物急性毒性法

(1) 对照试验

对照试验结果应符合方法要求。斑马鱼卵法阴性对照，48h 鱼卵存活率应 $\geq 90\%$ 。

(2) 参比毒物

试验生物的敏感性应满足方法的要求。发光细菌急性毒性试验 0.10 mg/L 氯化汞溶液相对发光度应为 $50\% \pm 10\%$ 。大型溞急性毒性试验重铬酸钾 24h-EC₅₀ 值应为 0.5~1.2 mg/L（20℃条件下）。斑马鱼急性毒性试验重铬酸钾 24h-LC₅₀ 值应在 200~400mg/L 之间。斑马鱼卵法阳性对照，48h 鱼卵死亡率应 $> 10\%$ 。

附录 A
(资料性)
生物监测方法验证典型案例

《水质 粪大肠菌群的测定 滤膜法》 (HJ 347.1-2018)

1 方法名称及适用范围

1.1 方法名称及编号

《水质 粪大肠菌群的测定 滤膜法》 (HJ 347.1-2018)。

1.2 方法适用范围

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。

2 基本条件确认

2.1 人员

参加方法验证人员通过了培训和资格确认 (见表 A-1)，相关验证人员培训及资格确认情况的证明材料见附件 A-1。

表 A-1 验证人员情况

序号	姓名	年龄	职称	专业	参加本标准方法相关要求培训情况 (是/否)	资格确认情况 (是/否)	相关监测工作年限	验证工作内容
1	XXX	27	工程师	环境工程	是	是	5	采样
2	XXX	28	助理工程师	微生物学	是	是	4	
3	XXX	29	工程师	生物学	是	是	6	分析测试
4	XXX	34	高级工程师	环境生物学	是	是	12	

2.2 仪器设备

本方法验证中，使用了采样仪器和分析测试仪器等。主要仪器设备情况见表 A-2，相关仪器设备的检定/校准证书及结果确认等证明材料见附件 A-2。

表 A-2 主要仪器设备

序号	过程	仪器名称	仪器规格型号	仪器编号	溯源/核查情况	溯源/核查结果确认情况	其他特殊要求
1	采样	立式压力蒸汽灭菌器	XX	XX	检定	合格	121℃湿热灭菌
		无菌采样瓶	XX	XX	核查	合格	螺口耐高温高压玻璃瓶、具塞磨口广口玻璃瓶
		冷藏箱	XX	XX	核查	合格	/
2	分析测试	超净工作台	XX	XX	核查	合格	/
		洁净室	XX	XX	核查	合格	/
		恒温培养箱	XX	XX	校准	合格	校准温度： 44.5℃
		立式压力蒸汽灭菌器	XX	XX	检定	合格	121℃湿热灭菌
		pH 计	XX	XX	检定	合格	/
		过滤装置	XX	XX	核查	合格	/

2.3 标准物质及关键试剂耗材

本方法验证中使用的标准物质、主要试剂耗材情况见表 A-3，有证标准物质证书、关键试剂耗材验收记录等证明材料见附件 A-3。

表 A-3 标准物质及主要试剂耗材

序号	过程	名称	生产厂家	技术指标(规格/浓度/纯度/不确定度)	证书/批号	标准物质基体类型	标准物质是否在有效期内(是/否)	主要试剂耗材验收情况
1	采样	硫代硫酸钠	XX	分析纯	XX	/	/	合格
		乙二胺四乙酸二钠	XX	分析纯	XX	/	/	合格
2	分析测试	产气肠杆菌(阴性对照标准菌株)	XX	真值: 206±231CFU/100ml; 可接受范围:37-2160 CFU/100ml	XX	水质	是	合格
		大肠埃希氏菌(阳性对照标准菌株)	XX	真值: 357±53 CFU/100ml; 可接受范围: 62-2310 CFU/100ml	XX	水质	是	合格
		MFC 培养基	XX	/	XX	/	/	合格
		无菌醋酸纤维滤膜	XX	直径 50mm、孔径 0.45μm	XX	/	/	合格
		压力蒸汽灭菌化学指示胶带	XX	/	XX	/	/	合格
		无菌水	XX	/	XX	/	/	合格

2.4 环境条件

本方法验证中, 环境条件监控情况见表 A-4, 相关环境条件监控记录见附件 A-4。

表 A-4 环境条件监控情况

序号	过程	控制项目	环境条件控制要求	实际环境条件	环境条件确认情况
1	采样	样品运输温度	采样后 10℃ 以下冷藏	冷藏箱控制 2-8℃。	合格
		采样瓶灭菌	使用已灭菌的采样瓶，保证采样过程不引入杂菌	采样瓶按无菌操作要求包扎，121℃ 高压蒸汽灭菌 20 min。	合格
2	分析测试	样品保存温度	实验室接样后，不能立即开展检测的，将样品在 4℃ 以下冷藏。	实验室配置样品存放用冰箱，样品不能立即分析时，控温 4℃ 冷藏。	合格
		培养基灭菌	配制好的培养基分装于三角烧瓶内，于 115℃ 高压蒸汽灭菌 20 min。	装有培养基的三角瓶用纱布和牛皮纸包扎好后，置于高压蒸汽灭菌锅中，115℃ 高压蒸汽灭菌 20 min。	合格
		培养基保存	配制好的培养基避光、干燥保存，必要时在 5℃ ±3℃ 冰箱中保存。	将配置好并灭菌的培养基用牛皮纸包裹瓶身，置于试剂存放用冰箱 4℃ 冷藏保存。	合格
		样品培养温度	滤膜放于培养皿后，将培养皿倒置，放入恒温培养箱内，44.5℃ ±0.5℃ 培养 24h ±2h。	培养箱经过校准后，将温度值设定至实际温度为 44.5℃，同时培养箱内放置检定过的带温度探头的温度计。样品培养时，进箱后和出箱前各检查一次培养箱温度显示值和温度计测量值，确保培养期间温度始终满足标准要求。	合格
		无菌	1. 每季检查紫外光强度及实验室无菌情况。紫外光灯光强度不少于初始值的 70%。 2. 无菌室沉降菌实验，培养皿暴露 5 min 以上，培养后菌落总数 ≤200 cfu/m ³ 。	1. 配置紫外照度计定期检查紫外光强度和实验室洁净情况。无菌室灭菌后，经检测，紫外线强度为 138μw/cm ² （强度为初始值的 89%），平板检测结果为 4 个。 2. 每次高压锅灭菌时，将化学指示卡卡面印有指示剂一段，放入灭菌物品中间，当锅内温度达到 121℃ 后，保留 20 min 以上，灭菌完毕将指示卡抽出，观察颜色变化，并将指示卡贴于环境监控原始记录上。检测结果均满足要求。	合格

2.5 安全防护设备设施

本方法验证中，使用后的废物及器皿经 121℃ 高压蒸汽灭菌 30 min，灭菌后清洗器皿，废物作为一般废物处置。

2.6 相关体系文件

本方法采用的监测原始记录为《粪（总）大肠菌群原始记录表（滤膜法）》（XXXXX-XX-XX）；监测报告格式为本实验室原有委托监测报告模板（XXXXX-XX-XX）。实验室分析测试过程依据《无菌操作作业指导书》（XXXXX-XX-XX）开展。

3 方法性能指标的验证

3.1 精密度

按照标准方法要求，采用实际样品（低浓度地下水、地表水和高浓度污水）进行 6 次平行测定。按标准操作要求过滤 100 ml、10 ml、1ml（稀释 10 倍后取 10ml）实际样品，用灭菌镊子夹取滤膜移放在 MFC 培养基上进行培养。测定结果见表 A-5。

表 A-5 精密度测定结果

平行样品号		样品浓度（低）	样品浓度（中）	样品浓度（高）
测定结果 (CFU/L)	1	4.5×10^2	5.2×10^3	5.0×10^6
	2	5.2×10^2	5.5×10^3	5.0×10^6
	3	4.7×10^2	4.9×10^3	2.0×10^6
	4	4.4×10^2	5.1×10^3	3.0×10^6
	5	3.3×10^2	5.6×10^3	1.3×10^7
	6	3.9×10^2	5.3×10^3	7.0×10^6
平均值 \bar{x} (CFU/L)		2.63	3.72	6.69
标准偏差 S (CFU/L)		0.07	0.02	0.28
相对标准偏差 (%)		2.62	0.57	4.23
标准要求的相对标准偏差 (%)		12	4.2	9.8

注： \bar{x} 、 s 、相对标准偏差 (%) 为原始数据以 10 为底，对数转化后计算所得。

经验证，对浓度约为 4.4×10^2 CFU/L、 5.2×10^3 CFU/L、 3.0×10^6 CFU/L 的地下水、地表水和生活污水实际样品分别进行 6 次重复测定，相对标准偏差分别为 2.62%、0.57%、4.23%，符合标准规定的要求，相关验证材料见附件 A-5。

3.2 正确度

按照标准方法要求，采用质控样品进行方法正确度验证。对粪大肠菌群标准样品严格按照使用说明溶到 100 ml 无菌水中，完全摇匀后按无菌操作要求过滤 10 ml、1ml (稀释 10 倍后取 10 ml)、 1×10^{-1} ml（逐级稀释 100 倍后取 10 ml）标准样品，用灭菌镊子夹取滤膜移放在 MFC 培养基上进行培养。测定结果见表 A-6。

表 A-6 质控样品测定结果

平行样品号	质控样品测定浓度 (CFU/100 ml)
	粪大肠菌群 (阳性对照标准菌株)
1	2.3×10^2
2	3.5×10^2
3	2.7×10^2
质控样品浓度 μ (CFU/100 ml)	真值: 357±53 可接受范围: 62~2310

经验证, 对粪大肠菌群 (编号 HJQC-002) 进行 3 次重复测定, 测定结果均在其保证值范围内, 符合标准方法要求, 相关验证材料见附件 A-6。

4 实际样品测定

按照标准方法要求, 选择地表水、地下水、生活污水和工业废水的实际样品进行测定, 实际样品监测报告和相关原始记录见附件 A-8。

4.1 样品采集和保存

按照《水质 粪大肠菌群的测定 滤膜法》(HJ 347.1-2018) 的要求, 使用样品瓶直接进行地表水样品、地下水样品、高浓度生活污水样品和工业废水样品的采集。采样点位和频率按相应水采样标准要求进行。采样人员戴上无菌手套, 用酒精擦拭瓶身, 去掉包裹瓶塞的牛皮纸和纱布后, 用握住瓶子下部直接将带塞采样瓶插入水中, 约距水面 10~15cm 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。采集没有水流的地下水, 则握住瓶子水平往前推。采样量为采样瓶容量的 80% 左右。样品采集完毕后, 迅速扎上纱布和牛皮纸, 并再次用酒精擦拭瓶身, 整个采样过程注意避免污染。采样后, 将样品瓶置于装有冰袋的冷藏箱中, 3h 内运回实验室。样品采集和保存情况见表 A-7。

表 A-7 样品采集和保存情况

序号	样品类型及性状	采样依据	样品保存方式
1	地表水/无色液体	《水质 粪大肠菌群的测定 滤膜法》(HJ 347.1-2018)	10℃ 以下冷藏保存
2	地下水/无色液体	《水质 粪大肠菌群的测定 滤膜法》(HJ 347.1-2018)	10℃ 以下冷藏保存
3	生活污水/无色液体	《水质 粪大肠菌群的测定 滤膜法》(HJ 347.1-2018)	10℃ 以下冷藏保存
4	工业废水/无色液体	《水质 粪大肠菌群的测定 滤膜法》(HJ 347.1-2018)	10℃ 以下冷藏保存

经验证, 本实验室粪大肠菌群样品采集和保存能力满足《水质 粪大肠菌群的测定 滤膜法》(HJ 347.1-2018) 的要求, 样品采集、保存和流转相关证明材料见附件 A-7。

4.2 样品分析步骤

按照标准方法要求对地表水、地下水、生活污水和工业废水的实际样品进行分析测试，具体操作为：用灭菌镊子以无菌操作夹取无菌滤膜贴放在已灭菌的过滤装置上，固定好过滤装置。在酒精灯旁取样：每次取样前，将样品瓶瓶口靠近火焰，将移液管伸入液面下 1 cm 左右，利用洗耳球反复吹气，使样品充分混匀后（不可颠倒混匀），立即取 100 ml、10 ml、1 ml 样品分别抽滤，以无菌水冲洗器壁 3 次，其中 1 ml 样品用无菌水稀释至 10 ml 后抽滤。样品过滤完成后，再抽气约 5 s，关上开关。用灭菌镊子夹取滤膜移放在 MFC 培养基上，滤膜截留细菌面向上，与培养基完全贴紧，两者间不留有气泡，然后将培养皿倒置，放入的恒温培养箱中 44.5℃ 下培养 24 h 后计数。

4.3 样品测定结果

按照标准方法中要求，对地表水样品、地下水样品、高浓度生活污水样品和工业废水样品进行分析测试，实际样品测定结果见表 A-8，实际样品监测报告及相关原始记录见附件 A-8。

表 A-8 实际样品测定结果

监测项目	样品类型	测定结果 (CFU/L)
粪大肠菌群	地表水	4.0×10^3
	地下水	61
	生活污水 (进口)	7.3×10^6
		4.0×10^6
		6.2×10^6
		5.7×10^6
	工业废水 (排口)	23
		16
		31

4.4 质量控制

按照标准方法要求，采用的质控措施包括：空白对照、培养基检验和阳性及阴性对照。相关原始记录见附件 A-8。

4.4.1 空白测定

本次方法验证过程中，按照标准要求进行了空白样品测定，其测量条件与样品测定相同。经验证，空白试样滤膜培养后无菌落生长，满足标准规定的要求。测定结果见表 A-9。

表 A-9 空白试验测定结果

空白类型	监测项目	测定结果	标准规定的要求
实验室空白	粪大肠菌群	无菌落生长	培养基上不得有任何菌落生长

4.4.2 培养基检验

本次方法验证过程中，按照标准要求进行了培养基检验，将粪大肠阴性和阳性菌株按使用说明溶到 100 ml 无菌水中，取 10 ml 抽滤、培养，其测量条件与样品测定相同。经验证，阳性检验中有蓝绿色菌落生长，阴性检验中无菌落生长，满足标准规定的要求。培养基检验情况见表 A-10。

表 A-10 培养基检验

测试类型	监测项目	测定结果	标准规定的要求
阳性检验	粪大肠菌群	蓝绿色菌落生长	蓝色或蓝绿色菌落生长
阴性检验	粪大肠菌群	淡黄色菌落生长	灰色、淡黄色、无色或无菌落生长

4.4.3 阴阳性对照

本次实际样品测试过程中，按照标准要求进行了样品的阳性对照和阴性对照试验，将粪大肠阴性和阳性菌株按使用说明溶到 100ml 无菌水中，取 10ml 抽滤、培养，其测量条件与样品测定相同。经验证，阳性对照试样中均呈阳性反应，阴性对照试样均呈阴性反应，满足标准规定的要求。阴阳性对照测定情况见表 A-11。

表 A-11 阴阳性对照测定

测试类型	监测项目	测定结果	标准规定的要求
阴性对照	粪大肠菌群	阴性	呈现阴性反应
阳性对照	粪大肠菌群	阳性	呈现阳性反应

5 验证结论

综上所述，本实验室人员经培训和资格确认后，依据《水质 粪大肠菌群的测定 滤膜法》（HJ 347.1-2018）开展方法验证，并进行了实际样品测定。所用仪器设备、标准物质、关键试剂耗材、采取质量控制措施，以及经实验验证得出的方法精密度和正确度，均满足标准方法相关要求，本实验室具备了采用该方法进行监测的能力。

- 附件 A-1 验证人员培训及资格确认情况的证明材料
 - 附件 A-2 仪器设备的溯源证书及结果确认等证明材料
 - 附件 A-3 有证标准物质证书及关键试剂耗材验收材料
 - 附件 A-4 环境条件监控原始记录
 - 附件 A-5 精密度验证原始记录
 - 附件 A-6 正确度验证原始记录
 - 附件 A-7 样品采集、保存、流转和前处理相关原始记录
 - 附件 A-8 实际样品监测报告及相关原始记录
-