



# 团 体 标 准

T/HBZLWH 002—2024

## 污水、污泥中总大肠菌群、粪大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定 荧光光度法

Determination of total coliforms, fecal coliforms, and *Escherichia coli* in sewage and sludge—Fluorescence spectrophotometry

2024-12-10 发布

2024-12-10 实施

河北省质量文化协会 发布  
中国标准出版社 出版

## 目 次

前言 .....	III
1 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 试剂和材料 .....	1
6 仪器和设备 .....	3
7 样品采集与保存 .....	3
8 样品制备与保存 .....	4
9 样品测定 .....	4
10 对照试验 .....	4
11 结果与报告 .....	5
12 质量保证和质量控制 .....	5
13 废物处理 .....	6

## 前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由河北省质量文化协会提出并归口。

本文件起草单位：石家庄高新技术产业开发区供水排水公司、石家庄高新技术产业开发区污水处理厂、温州市自来水有限公司、中国南水北调集团中线有限公司河北分公司、石家庄市城市排水监测站、河北工业职业技术大学、邯郸市环境监控中心、沧州市生态环境监控中心、秦皇岛市环境监控中心、河北省生态环境监测中心、石家庄市环境监控中心、承德市环境监控中心、河北化工医药职业技术学院、北京石油化工学院、河北拓维检测技术有限公司、河北中彻环境检测技术有限公司、河北省粮食交易中心、广西绿城检测服务有限公司、广东粤海水务检测技术有限公司汕头分公司、广州市水务科学研究院有限公司、珠海市水质监测中心、江门公用检测科技有限公司、广州市花都自来水有限公司、深圳市深水宝安水务集团有限公司水质监测中心、深圳市布吉供水有限公司、广东粤海水务检测技术有限公司广州分公司、四川凯乐检测认证集团有限公司、黄河水利委员会宁蒙水文水资源局（黄河宁蒙水环境监测中心）。

本文件主要起草人：白玉玮、宁静、薛飞、赵伦、李亚娜、林孔亮、王兵、霍鹏、郭林水、辛超英、马聪士、王冰然、刘翠棉、刘娟、冀建南、戚娟娟、王珣、张丽、贡丽楠、李诗话、杨东洁、刘紫倩、董龙周、霍晓通、张靖、李再兴、王彦雷、张伟、朱亚强、李子龙、何晓云、张红蕊、邵铁梅、潘雪珍、潘国荣、林俐、杨丽丽、姜建彪、戴春岭、朱高云、曾慧、陈健焱、胡颖斌、任柯柯、司徒晓英、吴海鹏、唐炜文、姜萍萍、肖源、陈霓彤、陈璐、蔡婉冰、李偲琳、骆承康、包伟群、王庆生、何振乾、杨森滔、杨春锋、沈国庭、班赛楠、蔚波。

# 污水、污泥中总大肠菌群、粪大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定 荧光光度法

## 1 范围

本文件描述了测定污水及污泥中总大肠菌群、粪大肠菌群和大肠埃希氏菌的荧光光度法的方法原理、试剂材料、仪器设备、样品采集与保存、样品的测定、对照试验、结果与报告等。

本文件适用于生产与生活活动中排放的污水及城镇污水处理厂污泥中总大肠菌群、粪大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定。

检出限本方法的污水检出限为 1 MPN/100 mL, 污泥检出限 0.1 MPN/g。

方法测定上限  $1 \times 10^8$  MPN/100 mL。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中, 注日期的引用文件, 仅该日期对应的版本适用于本文件; 不注日期的引用文件, 其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

CJ/T 221 城镇污泥标准检验方法

HJ 91.1 污水监测技术规范

HJ 1001 水质 总大肠菌群、粪大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定 酶底物法

HJ/T 166 土壤环境监测技术规范

## 3 术语和定义

HJ 1001 界定的术语和定义适用于本文件。

## 4 方法原理

一定量经预处理后的污水或污泥样品与选择性培养基混合均匀, 总大肠菌群、大肠埃希氏菌放置于 35.0 °C、粪大肠菌群放置于 44.5 °C 环境下培养 2 h~18 h, 总大肠菌群、大肠埃希氏菌和粪大肠菌群产生  $\beta$ -半乳糖苷酶( $\beta$ -D-galactosidase), 并分解  $\beta$ -半乳糖苷释放出荧光。疏水的荧光产物聚合至光学检测区, 通过光度计(波长: 350 nm~650 nm)测定, 依据荧光强度与样品中总大肠菌群、大肠埃希氏菌和粪大肠菌群数成一定关系的原理, 得出总大肠菌群、大肠埃希氏菌和粪大肠菌群浓度。

## 5 试剂和材料

5.1 除非另有说明, 分析时均使用符合国家标准和分析纯试剂, 实验用水应满足 GB/T 6682 中三级水的要求。

5.2 培养基。

总大肠菌群和大肠埃希氏菌采用 Tectalert CCA 培养基。每 100 mL 样品需使用培养基粉末  $2.0 \text{ g} \pm 0.5 \text{ g}$ , 所含成分见表 1。

表 1 总大肠菌群和大肠埃希氏菌培养基成分及含量

成分	含量
硫酸铵 $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$	0.87 g
硫酸镁 ( $\text{MgSO}_4$ )	13 mg
氯化钠 ( $\text{NaCl}$ )	1.0 g
氯化钙 ( $\text{CaCl}_2$ )	9 mg
亚硫酸钠 ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ )	7 mg
两性霉素 B (Amphotericin B)	1 mg
邻硝基苯- $\beta$ -D-吡喃半乳糖苷 (ONPG)	87 mg
I4-甲基伞形酮- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷 (MUG)	13 mg
也可采用市售商品化培养基制品	

粪大肠菌群采用 Tectalert FCA 培养基。每 100 mL 样品需使用培养基粉末  $2.0 \text{ g} \pm 0.5 \text{ g}$ , 所含成分见表 2。

表 2 粪大肠菌群培养基成分及含量

成分	含量
硫酸铵 $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$	0.877 g
硫酸镁 ( $\text{MgSO}_4$ )	18 mg
氯化钠 ( $\text{NaCl}$ )	1.0 g
氯化钙 ( $\text{CaCl}_2$ )	9 mg
亚硫酸钠 ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ )	7 mg
两性霉素 B (Amphotericin B)	1 mg
邻硝基苯- $\beta$ -D-吡喃半乳糖苷 (ONPG)	88 mg
也可采用市售商品化培养基制品	

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 ( $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8 \cdot \text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )。

5.5 氯化钠 ( $\text{NaCl}$ )。

5.6 生理盐水:称取 8.5 g 氯化钠(5.5),溶于 1 000 mL 纯水中。

5.7 无菌水:取适量实验用水,经  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  高压蒸汽灭菌 20 min,备用。

5.8 无菌稀释水:根据污泥样品的数量配制稀释用的生理盐水(5.6)。每个污泥样品准备 8 个或 9 个内装有 90 mL 生理盐水(5.6)的三角瓶,其中放入数颗玻璃珠,经  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  高压蒸汽灭菌。

5.9 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(5.3),溶于适量无菌水(5.7)中,定容至 100 mL,现用现配。

5.10 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(5.4)，溶于适量纯水中，定容至 100 mL，此溶液保质期为 30 d。

## 6 仪器和设备

6.1 采样瓶：经过灭菌处理的具螺旋帽或磨口塞的 100 mL、250 mL、500 mL 广口玻璃瓶。可采用市售无菌采样瓶、无菌采样袋或均质袋。

6.2 样品瓶：具螺旋帽的 100 mL、250 mL 玻璃瓶。可采用市售无菌采样瓶。

6.3 高压蒸汽灭菌器：121 °C 可调、101.3 kPa。

6.4 仪器适配检测瓶：100 mL。

6.5 天平：感量 0.01 g 和 0.000 1 g。（选用市售培养基可不使用 0.000 1 g 感量天平）

6.6 振荡器。

6.7 微生物快速检测仪：

——恒温培养单元：不少于 2 个温控系统，温度控制精度  $\pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ ，可自动调节待检测样本培养温度（ $35.0 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$  和  $44.5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ ）；

——检测单元：不少于 4 个独立的检测系统，可实现多个样本的同时监测；

——数据显示、处理单元：自动输出检测结果，可查询和显示历史数据。

6.8 移液管：1 mL  $\pm 0.01 \text{ mL}$ 、10 mL  $\pm 0.1 \text{ mL}$ 。也可采用计量合格的可调式移液器。

6.9 三角瓶：100 mL、250 mL、500 mL。

6.10 量筒：100 mL  $\pm 1 \text{ mL}$ 。

6.11 瓷盘。

6.12 刮板。

6.13 镊子。

注：采样瓶(6.1)、样品瓶(6.2)、移液管(6.8)、三角瓶(6.9)等器具保持清洁、无生物毒性，在试验前按无菌操作要求包扎，按需选择高压蒸汽灭菌器(6.3)121 °C 灭菌 20 min，烘干，或 160 °C 干热灭菌 2 h，备用。

## 7 样品采集与保存

### 7.1 污水样品

点位布设和采样频次按照 HJ 91.1 相关规定执行。

与其他项目一同采样时，先单独采集微生物样品，采集瓶(6.1)不应用水样洗涤，采集水样于无菌采样瓶中。

采集废水样品及一定深度的样品时，也可使用无菌专用采样装置采样。

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的样品，需在采样瓶灭菌前加入硫代硫酸钠溶液(5.9)，以除去活性氯对细菌的抑制作用；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(5.10)，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）。

### 7.2 污泥样品

城镇污水处理厂及污泥处置厂的污泥样品应符合 HJ/T 166 中的相关规定，选取当天新鲜污泥，采用多点取样，样品质量不小于 1 kg。采集后的污泥样品平铺于瓷盘上，用玻璃棒或木棒等压散，除去泥样中石子和动植物残体等异物，混匀备用。

如果采集的是含有活性氯消毒的污泥，在采样后立即加入硫代硫酸钠溶液(5.9)，适当搅拌混匀，去

除余氯。如果采集的是重金属离子含量较高的样品,加入乙二胺四乙酸二钠溶液(5.10)适当搅拌均匀,以消除干扰(每 125 g 样品加入 0.3 mL 的乙二胺四乙酸二钠溶液)。

注:7.1 和 7.2 步骤中去除样品中 1.5 mg 活性氯需使用 15.7 mg 硫代硫酸钠(5.3),硫代硫酸钠用量根据样品实际活性氯量调整。

## 8 样品制备与保存

### 8.1 污水样品

采样后应在 2 h 内检测,否则,应 10 °C 以下冷藏但不应超过 6 h。实验室接样后,不能立即开展检测的,将样品于 4 °C 以下冷藏并在 2 h 内检测。

### 8.2 污泥样品

污泥混匀后,按检测要求制备样品。湿污泥置于瓷盘中均匀摊开,剔除碎石、沙砾和杂物等,划分成多个小方格,用小勺于每个方格中取等量的泥样(总量不应少于 20 g),置于研钵中研磨混匀后,直接取样检测分析。

制备后的样品如需放置,应密闭储存在 4 °C 冷藏冰箱中,保存时间不应超过 24 h。

## 9 样品测定

### 9.1 接种

9.1.1 污水接种:将 100 mL 待测样品放入含有 2 g 培养基(5.2.1 或 5.2.2)的检测瓶(6.4)中,混匀。

9.1.2 污泥接种:制备后的污泥样品用天平(6.5)称取 10.0 g 放于灭菌三角瓶中,加 100 mL 无菌水(5.7),充分摇匀,若污泥样品颗粒较大,可将三角瓶置于振荡器上振荡 3 min,制成均匀样液,作为原液。用 10 mL 灭菌移液管吸取 10 mL 原液加入装有 90 mL 无菌稀释水(5.8)的三角瓶中,摇匀,制成 1:10 稀释度的均匀样液。按上述操作步骤,依次配制稀释 10 倍样液,如此每递增 1 次,即换用 1 支 10 mL 灭菌移液管。根据污泥样品含菌量的估计,选择 2 个或 3 个适宜浓度的稀释样液 100 mL 加入含有 2 g 培养基(5.2.1 或 5.2.2)的检测瓶(6.4)中,混匀。

### 9.2 培养和检测

打开仪器电源开关,将接种后的检测瓶放置于微生物快速检测仪中,按照仪器说明书进行操作,选择相应的测定参数,“总大肠菌群和大肠埃希氏菌”或“粪大肠菌群”,点击“检测”按钮,2 h~18 h,仪器自动培养得出结果。

## 10 对照试验

### 10.1 空白对照

采用无菌水(5.7)作为待测水样按照 9.1 和 9.2 进行空白测定,测试结果不应检出,否则该次样品测定结果无效,应重新测定空白以及待测样品。

### 10.2 阴性和阳性对照

总大肠菌群、大肠埃希氏菌、粪大肠菌群的阴性、阳性菌株参考表 3。

表 3 阴性、阳性菌株参考表

检测指标	阳性菌种	阴性菌种
总大肠菌群	大肠埃希氏菌( <i>Escherichia coli</i> )	假单胞菌属( <i>Pseudomonas sp.</i> )
大肠埃希氏菌	大肠埃希氏菌	假单胞菌属
粪大肠菌群	大肠埃希氏菌(耐热型)	假单胞菌属

将阳性菌株大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)标准菌株 ATCC 25922(CICC 10305 或其他等效标准菌株)和阴性菌株假单胞菌属(*Pseudomonas sp.*)有证标准物质 NCTC 12951 或其他等效标准菌株制成 300 个/mL~3 000 个/mL 的菌悬液,将菌悬液按接种(9.1)和培养 and 检测(9.2)要求操作,阳性菌株应呈现阳性反应;阴性菌株呈现阴性反应,否则,该次样品测定结果无效,应重新测定。

注: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(5.5)稀释至 300 个/mL~3 000 个/mL。

## 11 结果与报告

### 11.1 试验结果计算

#### 11.1.1 污水

微生物快速检测仪自动显示检测结果。

#### 11.1.2 污泥

按照微生物快速检测仪自动显示检测结果 MPN 值后,根据公式(1)换算样品中“总大肠菌群和大肠埃希氏菌”或“粪大肠菌群”浓度:

$$C = \frac{\text{MPN 值} \times 100}{D \times m} \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- $C$  ——原始(湿)污泥样品中“总大肠菌群和大肠埃希氏菌”或“粪大肠菌群”浓度,单位为最可能数每克(MPN/g);
- MPN 值 ——每 100 mL 稀释样品中总大肠菌群、大肠埃希氏菌、粪大肠菌群浓度,单位为最可能数每一百毫升(MPN/100 mL);
- $D$  ——稀释度;
- $m$  ——污泥称重,单位为克(g)。

### 11.2 试验结果表述

污水样品测定结果保留两位有效数字,当测定结果 $\geq 100$  MPN/100 mL 时,以科学计数法表示;若为阴性,可报告总大肠菌群、大肠埃希氏菌、粪大肠菌群未检出(MPN/100 mL)。

污泥样品测定结果保留两位有效数字,当测定结果 $\geq 100$  MPN/g 时,以科学计数法表示。若为阴性,可报告总大肠菌群、大肠埃希氏菌、粪大肠菌群未检出(MPN/g)。

## 12 质量保证和质量控制

12.1 每批样品按对照试验(10.1)进行空白对照测定,定期使用有证标准菌株进行阳性、阴性对照

试验。

12.2 每批培养基按对照试验的要求采用有证标准菌株进行培养基质量验证。

12.3 定期使用有证标准菌株或标准样品进行质量控制。

12.4 每 30 个样品或每批次样品( $\leq 30$  个/批)测定一个平行双样,测定结果以算术平均值计。

### 13 废物处理

实验中产生的废弃物经高压蒸汽灭菌器(6.3)121 °C 灭菌 30 min 后,作为一般废物处理。