

团 体 标 准

T/QDAS xxx-2023

水质 耐热大肠菌群的测定 高效微生物生长分 析仪法

Water quality – Determination of heat-resistant
coliforms – High efficiency microbial growth analyzer
method

(征求意见稿)

2023-xx-xx 发布

2023-xx-xx 实施



青岛市标准化协会发布

青岛市标准化协会（QDAS）是由青岛市从事标准化研究与应用的单位和个人自愿组织的非营利性社会组织。制定青岛市标准化协会标准（以下简称：青标协标准），满足市场需要，增加标准的有效供给，是青岛市标准化协会的工作内容之一。中国境内的团体和个人，均可提出制、修订青标协标准的建议并参与有关工作。

青标协标准按《青岛市标准化协会团体标准管理办法》进行制定和管理。

青标协标准草案经向社会公开征求意见，并得到参加审定会议的 75%以上的专家、成员的投票赞同，方可作为青标协标准予以发布。

在本标准实施过程中，如发现需要修改或补充之处，请将意见和有关资料寄给青岛市标准化协会，以便修订时参考。

本标准版权为青岛市标准化协会所有，除了用于国家法律或事先得到青岛市标准化协会的许可外，不得以任何形式或任何手段复制、再版或使用本标准及其章节，包括电子版、影印件，或发布在互联网及内部网络等。

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 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 检验程序	3
10 操作步骤	4
11 精密度和准确度	4
12 培养基检验	4
13 废物处理	5

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这些专利的责任。

本文件由中国水产科学研究院黄海水产研究所提出。

本文件由青岛市标准化协会归口。

本标准起草单位：中国水产科学研究院黄海水产研究所、中国海洋大学、青岛市分析测试学会、中国科学院海洋研究所、海洋湖泽学会化学分会、农业农村部环境保护科研监测所、生态环境部华南环境科学研究所、中建环能科技股份有限公司、青岛精灵分析仪器有限公司、青岛大学、青岛延晖环保科技有限公司。

本标准主要起草人：张旭志、张大海、曲克明、杨倩倩、陈志香、张艳、李宁、王伟、刘跃丹、张媛卿、张菲菲、詹彪、李琦、肖达成、车千里、朱元京。

水质 耐热大肠菌群的测定 高效微生物生长分析仪法

1 范围

本文件规定了测定水中耐热大肠菌群的高效微生物生长分析仪法。

本文件适用于地表水、地下水、污水、废水和河口水（盐度 $\leq 2\%$ ）中耐热大肠菌群的快速测定。

本方法的检出限：10个/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 14581 水质 湖泊和水库采样技术指导

HJ/T 91 地表水和污水监测技术规范

HJ 347.2-2018 水质 粪大肠菌群的测定 多管发酵法

HJ 494 水质 采样技术指导

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

耐热大肠菌群 thermotolerant coliforms

在44.5℃培养能发酵乳糖产酸产气的需氧及兼性厌氧革兰氏阴性无芽孢杆菌。

[来源：GB/T 5750.12-2023, 3.3]

4 方法原理

将水样加入EC肉汤（其中的胆盐三号抑制革兰氏阳性菌的生长而不抑制耐热大肠菌群的生长）中，44.5℃培养，耐热大肠菌群繁殖分解乳糖产酸产气。这个过程引起检测管中介质导电能力的变化。该变化由高效微生物生长分析仪实时监测并自动化绘制“电导变化值-时间”动力学曲线，进而报告出可检测时间（Detectable time, D_t ，单位为min）。 D_t 和水样中耐热大肠菌群数量呈负相关，将其代入公式 $D_t(\text{min}) = -36.095Lg(C) + 509.42$ ($R^2=0.9598$) 计算待测水样中耐热大肠菌群的数量和浓度。

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（6.5）消除干扰。现场检测时无需此操作。

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（6.6）消除干扰。现场检测时无需此操作。

6 试剂和材料

除非另有说明，分析时均使用符合国家标准和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 EC 培养基。

胰胨	20g
乳糖	5g
胆盐三号	1.5 g
磷酸氢二钾	4g
磷酸二氢钾	1.5 g
氯化钠	5g

将上述成分或含有上述成分的市售成品加热溶解于 1000 mL 水中，然后分装于锥形瓶中，115℃ 高压蒸汽灭菌 20 min，灭菌后 pH 值应在 6.9 左右。

注：配制好的培养基（6.1）避光、干燥保存，必要时在 5℃±3℃ 冰箱中保存，通常瓶装培养基不超过 3 个月。配制好的培养基要避免杂菌侵入和水分蒸发，当培养基颜色变化，或体积变化明显时废弃不用。

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

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

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

6.5 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（6.3），溶于适量水中，定容至 100 mL，临用现配。

6.6 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（6.6），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 高效微生物生长分析仪。

7.2 一次性玻璃检测管（下简称检测管）。

7.3 微量移液器及吸头：100 μL （1 μL 刻度）、1 mL（0.01 mL 刻度）、5 mL（0.1 mL 刻度）、10 mL（0.1 mL 刻度）。

7.4 采样瓶：500 mL 带螺旋帽或磨口塞的广口玻璃瓶。

7.5 高压蒸汽灭菌器：115℃、121℃ 可调。

7.6 pH 计：准确到 0.1 pH 单位。

7.7 天平：感量为 0.001g。

7.8 无菌离心管：容量 2 mL、容量 15 mL。

7.9 无菌培养皿：直径 90 mm。

7.10 保温箱。

7.11 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 494 和 HJ/T 91 的相关规定执行。采集微生物样品时，采样瓶（7.4）不得用样品洗涤，采集样品于灭菌的采样瓶中。清洁水体的采样量不低于 400 mL，其余水体采样量不低于 100 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，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的样品，需在采样瓶灭菌前加入硫代硫酸钠溶液（6.5），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（6.6），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（6.3）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，将样品于 4℃下冷藏并在 2 h 内检测。

9 检验程序

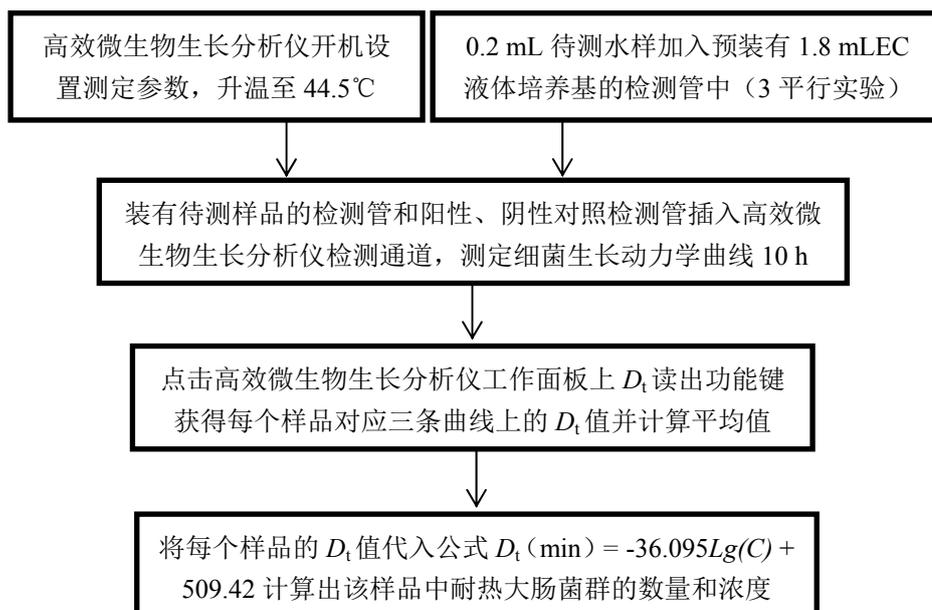


图1 水体样品中耐热大肠菌群的测定程序

10 操作步骤

10.1 准备仪器：打开高效微生物生长分析仪，设定温度为 44.5℃、电导变化值采集周期为 1 min、运行时长为 10 h。预热 30 min。

10.2 上机测定：采用微量移液器吸取待测样品 n_1 、 n_2 …… n_x 各 0.2mL，分别加入预装有 1.8 mL 无菌 EC 液体培养基的检测管中。将检测管分别插入高效微生物生长分析仪的检测通道，点击“运行”功能键，测定细菌生长曲线。

注：测定样品时，仪器上出现S型细菌生长曲线后即可（手动）停止检测，即使测定曲线时间未达到10 h亦可获得 D_t 值。

10.3 数据读出：细菌生长曲线测定完毕后，点击高效微生物生长分析仪上“ D_t 读出”功能键，读出每个样品对应三条曲线上的 D_t 值并计算出平均值。将 D_{t1} 、 D_{t2} …… D_{tn} 平均值分别代入，按照公式（1）换算样品中耐热大肠菌群总数（个/mL）：

$$C_n = 10 \times 10^{\left(\frac{D_{tn}-509.42}{-36.095}\right)} \dots\dots\dots (1)$$

式中： C_n —— n 样品中耐热大肠菌群总数（个/mL）；

D_{tn} —— n 样品三条生长曲线上 D_t 值的平均值。

10.4 结果报告：待检水样的耐热大肠菌群总数结果值 < 100 时，采用两位有效数字报告；≥ 100 时，第三位数字采用“四舍五入”方式修约后，后面用 0 代替位数来表示结果，也可用 10 的指数形式来表示。

10.5 试验报告

试验报告应注明：

- 样品完整标识的必要的全部信息；
- 采用的取样方法（如果有的话）；
- 本文件中没有规定的所有操作细节以及可能已经影响试验结果的一些因素；
- 获得的结果，指明所采用的表示方法；
- 如果做了重复性核查，最终引用的所得结果。

10.6 对照试验

将耐热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 30~300 个/mL 的菌悬液，分别取相应体积的菌悬液装入检测管中，然后按上机测定（10.2），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。

11 精密度和准确度

11.1 精密度

6 个实验室对低浓度（河水，浓度均值为 14 个/mL）、中浓度（农业废水，浓度均值为 270 个/mL）和高浓度（生活污水，浓度均值为 8800 个/mL）三个不同浓度耐热大肠菌群的样品和有证标准样品（浓度为 3600 个/mL）进行了 6 次重复测定：实验室内相对标准偏差范围分别为 2.3%~3.8%、2.0%~11.0%、1.1%~5.4%和 5.1%~17.0%；实验室间相对标准偏差分别为 3.4%、11.0%、1.6%和 5.4%。

11.2 准确度

6 个实验室对含耐热大肠菌群浓度为 3600 个/mL（可接受范围为 330~7710 个/mL）的标准样品进行了 6 次重复测定：相对误差范围为-6.2%~8.4%；相对误差最终值为 -1.7%±10.6%。

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 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，将耐热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 300~3000 个/mL 的菌悬液。若使用的是定性标准菌株，配制方法为先进行预实验，摸清浓度后按目标为 300~3000 个/mL 稀释；若使用的是定量标准菌株，则可按照给定值直接稀释。

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。灭菌后，器皿方可清洗，废物作为一般废物处置。
