

上海市净水技术学会

沪净水学会（2024）001号

关于征求团体标准《水中微生物含量的测定 三磷酸腺苷（ATP）生物发光法（征求意见稿）》意见的函

各有关单位和专家：

团体标准《水中微生物含量的测定 三磷酸腺苷（ATP）生物发光法》已完成征求意见稿，现予征求意见。请将意见和建议于2024年2月7日前反馈至学会秘书处。

意见征询期：2024年1月31日~2月7日

联系单位：上海市净水技术学会

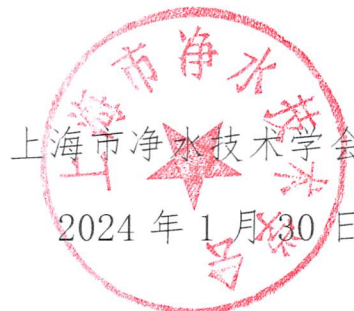
联系地址：上海市杨树浦路855号1楼 邮编：200082

联系人：阮辰旻 13585990831(同微信)

邮箱：50706127@qq.com

附件：

- 1、团体标准征求意见稿
- 2、团体标准编制说明
- 3、团体标准征求意见反馈表



团体标准

T/SAWP 001—2024

水中微生物三磷酸腺苷（ATP）的测定 生物发光法

Determination of adenosine triphosphate (ATP) of microorganisms in
water — bioluminescence method

（征求意见稿）

2024-0X-XX 发布

2024-0X-XX 实施

上海市净水技术学会 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	2
5 试剂和材料	2
6 仪器和设备	2
7 个人防护用品	3
8 实验环境	3
9 样品	3
10 分析步骤	4
11 结果计算与表示	6
12 精密度和准确度	6
13 质量保证和质量控制	7
14 废物处理	7
15 说明事项	7
附录 A（资料性附录）ATP 测定原始记录格式	8

前 言

为贯彻《关于加强城市供水安全保障工作的通知》（建办城〔2022〕41号），提高供水突发污染应对能力，加强水厂精细化管理，保障供水生物安全，规范水中微生物三磷酸腺苷（ATP）的测定，为《上海市城市总体规划（2017-2035年）报告》中“全市供水水质达到国际先进水平，满足直饮需求”提供技术支撑，编制组经广泛调查研究，并在充分征求意见的基础上，制定本标准。

本标准参照 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。

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准为首次发布。

本标准由上海市净水技术学会提出并归口管理。

本标准起草单位：上海浦东水务（集团）有限公司、东方国际集团上海环境科技有限公司、上海南汇自来水有限公司、哈希水质分析仪器（上海）有限公司、同济大学、天津泰达水业有限公司、上海青浦自来水有限公司、上海市松江自来水有限公司、上海市自来水奉贤有限公司、沈阳水务水质检测技术发展有限公司、衡阳市清源水质检测有限公司、厦门理工学院、厦门市水资源利用与保护重点实验室、昆山市自来水集团有限公司。

本标准起草人：蒋增辉、李梅、张华军、马顺君、唐玉霖、于大海、雷斌、任廷晟、曲磊、姚子鸾、孟向军、陈晨、王晓方、李晨、张建柱、张怡然、陈卓然、张叶、潘旭康、施胜利、徐玲华、叶翠丽、何璐晨、庄李清、方芳、邵雪红、陆彬斌、张龙、秦钰芬、佟雪峰、张琦、王舒、王超群、白杰、李青松、袁雨瑾、张国荣、戴鸣。

水中微生物三磷酸腺苷（ATP）的测定 生物发光法

1 适用范围

本标准中的“微生物”是指具有细胞结构的微生物，如细菌、真菌、藻类和原动物等。

本标准规定了测定水中微生物三磷酸腺苷（ATP）的生物发光法。

本标准适用于以水为基质的样品，包括地表水、水源水、工艺过程水、生活饮用水、直饮水和瓶装水等。

当制备试样的样品体积为 50 mL 时，方法检出限为 0.17 pg/mL，测定下限为 0.68 pg/mL。

本标准不适用于溶解性总固体 > 10000 mg/L 的水样，也不适用于含高浓度有机物、重金属等干扰物质的水样。

2 规范性引用文件

本标准引用了下列文件或其中的条款。凡是注明日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本标准。凡是未注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

GB/T 5750.2—2023 生活饮用水标准检验方法 第 2 部分：水样的采集与保存

HJ 1000—2018 水质 细菌总数的测定 平皿计数法

ASTM D4012—23a Standard Test Method for Adenosine Triphosphate (ATP) Content of Microorganisms in Water（美国材料与试验协会 ASTM D4012—23a 水中微生物的三磷酸腺苷（ATP）含量标准测定法）

3 术语和定义

以下术语和定义适用于本标准。

3.1 三磷酸腺苷 adenosine triphosphate (ATP)

由腺嘌呤、核糖和磷酸基团连接而成，是生物细胞内主要的能量来源，又称腺嘌呤核苷三磷酸、腺苷三磷酸。

3.2 荧光素 luciferin

生物体内的发光生物色素。

3.3 荧光素酶 Luciferase

能够产生生物发光的酶的统称。

3.4 裂解 lysis

溶解和破坏细胞结构，并导致胞内物质释放的过程。

3.5 相对光单位 relative light unit (RLU)

描述发光强度或亮度的相对值。

注：RLU 非 SI 单位。

3.6 光度计 luminometer

测量光物质所发出光信号的仪器。

4 方法原理

ATP 是高等植物细胞、高等动物细胞和微生物细胞的主要组成部分，通过测定活性细胞内的 ATP 浓度，可以快速反映水中活性微生物的含量。测定过程中，ATP 和荧光素、荧光素酶等快速反应产生光，经由 ATP 标准物质校准的光度计测定 RLU，根据公式计算最终得到 ATP 浓度。

5 试剂和材料

除非另有说明，使用的分析纯试剂或生物试剂应符合相关标准的要求，实验用水为蒸馏水、超纯水或去离子水。

- 5.1 裂解液：用量为 1 mL，用于破坏细胞结构后释放 ATP。
- 5.2 提取液：使用 1 mL 裂解液（5.1）提取 ATP 后的混合液。
- 5.3 稀释液：用量为 9 mL，用于稀释和定容提取液（5.2）。
- 5.4 ATP 保存液：1 mL 提取液（5.2）和 9 mL 稀释液（5.3）的混合物。
- 5.5 荧光素-荧光素酶干粉：含有荧光素和荧光素酶的粉剂。
- 5.6 缓冲液：用于溶解和稀释荧光素-荧光素酶干粉（5.5）的试剂。
- 5.7 荧光素-荧光素酶试剂：将荧光素-荧光素酶干粉（5.5）溶解于缓冲液（5.6）后配制成的试剂。
- 5.8 单点校准标液：浓度为 1000 pg/mL 的 ATP 标准物质溶液。
- 5.9 校准曲线标液：浓度为 10 pg/mL、100 pg/mL、1000 pg/mL、10000 pg/mL 和 100000 pg/mL 的 ATP 标准物质溶液。
- 5.10 无菌水：经 121 °C 高压蒸汽持续灭菌 20 min 的实验用水，冷却备用。

6 仪器和设备

不应将一次性耗材经高压灭菌后重复使用，不应使用含有荧光物质的记号笔。

- 6.1 光度计：使用光电倍增管，波长范围至少覆盖 530 ± 20 nm，测量结果为 RLU。
- 6.2 微量移液器：固定式 100 μ L 和 1000 μ L，可调式 100~1000 μ L。
- 6.3 高压蒸汽灭菌器：121 °C 可调，用于实验用水等的灭菌。
- 6.4 干热灭菌器：160 °C~180 °C 可调，用于玻璃采样容器和无菌瓶等的灭菌。
- 6.5 采样容器：带螺旋盖的无菌瓶或无菌袋，容积 > 100 mL，玻璃、PP 和 HDPE 等材质。
- 6.6 注射器：容积刻度 ≥ 50 mL，具活塞，无针头，鲁尔接口，PP 材质，无菌独立包装，一次性使用。
- 6.7 测光管：尺寸和光度计（6.1）适配，PP 材质，无菌包装，一次性使用。
- 6.8 测光管架：尺寸和测光管（6.7）适配。
- 6.9 微量移液器吸头：200 μ L 和 1000 μ L，与微量移液器（6.2）适配，PP 材质，必须为无菌原盒包装，一次性使用。
- 6.10 针头过滤器：滤盘直径 ≤ 35 mm，孔径 0.45 μ m，鲁尔接口与注射器（6.6）适配，水系混合纤维素酯（MCE）、玻璃纤维等材质，无菌包装，一次性使用。
- 6.11 实验室常用仪器、设备和器材。

7 个人防护用品

7.1 医用外科口罩：无纺布材质，无菌包装，一次性使用。

7.2 手套：乳胶、丁腈和 PE 等材质，一次性使用。

7.3 医用防尘帽：无纺布材质，无菌包装，一次性使用。

7.4 消毒用品：70%~75%酒精棉或酒精消毒湿巾。

8 实验环境

操作人员应佩戴个人防护用品（7.1~7.3），对实验桌面和仪器进行表面消毒（7.4），减少环境对实验全过程的污染。无菌室不是必须的。

9 样品

9.1 样品的采集

样品的采集应符合 GB/T 5750.2 和 HJ 1000 的规定。

采样前应对采样龙头进行消毒，采样过程应避免污染样品、试剂和无菌耗材，采样容器（6.5）不得用样品洗涤。样品量一般为采样容器的 80%左右，不得装满。采样容器上标注样品信息。

9.2 样品的运输与保存

样品应尽快完成试样制备，否则，应在 4℃~10℃冷藏保存但不超过 3 h。

9.3 试样的制备

试样的制备可在样品采集现场完成，其余分析步骤宜在实验室中进行。

9.3.1 过滤

预先将样品和无菌水稳定至同一室温。

若样品清洁，可使用同一套过滤器材重复过滤步骤以增加过滤体积，过滤体积宜为 50 mL 的整数倍，记录过滤体积；若样品浑浊，可适当减少过滤体积至注射器最小刻度的整数倍，或用无菌水稀释样品后再过滤，记录过滤体积和稀释倍数；若已倒入注射器内的样品无法滤完，记录已过滤体积，弃去注射器内剩余的样品。过滤步骤如下：

- 1) 拧紧采样容器（6.5）盖，将样品用力振摇至少 20 次，充分混匀后拧松但不取下采样容器盖。
- 2) 撕开注射器（6.6）外包装，取出注射器，拔出活塞，将活塞放回注射器外包装内。
- 3) 取出针头过滤器（6.10），与注射器的鲁尔接口对接旋紧。
- 4) 打开采样容器盖，将样品缓慢地倒入竖立的注射器内至 50 mL 刻度。
- 5) 将活塞插入注射器，缓慢地推动活塞直至样品全部滤完，弃去滤液。
- 6) 将装有活塞和针头过滤器的注射器放回注射器外包装内。

9.3.2 提取和保存

预先将试剂稳定至同一室温。提取和保存步骤如下：

- 1) 拧紧裂解液（5.1）瓶盖，轻柔地上下颠倒混合至少 5 次，充分混匀后拧松但不取下瓶盖。
- 2) 拧紧稀释液（5.3）瓶盖，轻柔地上下颠倒混合至少 5 次，充分混匀后拧松但不取下

瓶盖。

3) 确认微量移液器(6.2)调至 1000 μL 。

4) 取出过滤(9.3.1)时放回注射器外包装内的装有活塞和针头过滤器的注射器,必须先取下针头过滤器,再拔出活塞,将活塞放回注射器外包装内,而后将针头过滤器重新与注射器的鲁尔接口对接旋紧;手握注射器,使针头过滤器朝下。

5) 打开稀释液瓶盖,将朝下的针头过滤器插入稀释液瓶口,针头过滤器不应接触稀释液。

6) 打开裂解液瓶盖,在微量移液器上装上吸头,准确移取 1000 μL 裂解液至注射器内,移液时应避免液体挂壁。

7) 再次取出注射器外包装内的活塞,缓慢地推动活塞至注射器底部,将 1 mL 提取液全部过滤转移至稀释液瓶内,盖上并拧紧瓶盖,混匀后即为 ATP 保存液(5.4)。

8) 标注试样信息,完成试样的制备。

9.4 空白试样的制备

以无菌水(5.10)替代样品,重复步骤 9.3。

10 分析步骤

预先将仪器、样品和试剂稳定至同一室温。为避免频繁进行单点校准,宜将试样集中分析。

10.1 光度计的使用

连接光度计(6.1)电源和数据线,开启设备,按光度计说明书要求确认技术参数是否正常,稳定运行 10 min 后方可进行后续测定。

10.2 荧光素-荧光素酶试剂的配制

荧光素-荧光素酶试剂(5.7)一般现配现用,若有剩余,应 4 $^{\circ}\text{C}$ ~10 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏保存。荧光素-荧光素酶试剂的配制步骤如下:

1) 确认微量移液器调至 1000 μL 。

2) 拧紧缓冲液(5.6)瓶盖,轻柔地上下颠倒混合至少 5 次,充分混匀后拧松瓶盖。

3) 打开荧光素-荧光素酶干粉(5.5)瓶盖,在 1000 μL 微量移液器上装上吸头,将缓冲液全部转移至荧光素-荧光素酶干粉瓶中。

4) 拧紧瓶盖,轻柔地上下颠倒混合至少 5 次,至少静置 5 min。

5) 标注试剂信息,完成荧光素-荧光素酶试剂的配制。

10.3 单点校准

测定当日,在开展试样测定前,必须进行单点校准;若新配制荧光素-荧光素酶试剂,必须进行单点校准。单点校准步骤如下:

1) 确认微量移液器调至 100 μL 。

2) 将测光管(6.7)插入光度计孔槽内,盖上遮光盖,按下测量键,读取测光管本底 RLU_0 ,若 $\text{RLU}_0 > 10$,应更换测光管或采取措施降低 RLU_0 。

3) 从孔槽内取出测光管,插入测光管架(6.8)内。

4) 拧紧单点校准标液(5.8)瓶盖,轻柔地上下颠倒混合至少 5 次,充分混匀后打开瓶盖,在 100 μL 微量移液器上装上吸头,准确移取 100 μL 单点校准标液至测光管底部,盖上

瓶盖，弃去微量移液器吸头。

5) 拧紧荧光素-荧光素酶试剂瓶盖，轻柔地上下颠倒混合至少 5 次，充分混匀后打开瓶盖。

6) 更换微量移液器吸头，准确移取 100 μL 荧光素-荧光素酶试剂至已加过单点校准标液的测光管中，轻柔地振摇测光管 5 次，插入光度计孔槽内，盖上遮光盖，按下测量键，读取并记录单点校准结果 RLU_{C1} ；立即将此测光管取出，再次轻柔地振摇 5 次，插入光度计孔槽内，盖上遮光盖，按下测量键，读取并记录单点校准结果 RLU_{C2} ；此步骤的 2 次重复测定应在 1 min 内完成。

7) 盖上荧光素-荧光素酶试剂瓶盖，弃去微量移液器吸头，弃去测光管，盖上遮光盖。

8) RLU_{C1} 和 RLU_{C2} 均必须 ≥ 5000 ，且 RLU_{C1} 和 RLU_{C2} 的相对偏差 R_{VC} 应 $\leq 5\%$ ，否则，应查找原因并重新进行单点校准， R_{VC} 按照公式 (1) 计算。

$$R_{VC} = \frac{|RLU_{C1} - RLU_{C2}|}{RLU_{C1} + RLU_{C2}} \times 100\% \quad (1)$$

式中：

R_{VC} —— 单点校准重复测定 2 个结果的相对偏差，%；

RLU_{C1} —— 单点校准重复测定的第 1 次测定结果；

RLU_{C2} —— 单点校准重复测定的第 2 次测定结果。

10.4 试样测定

试样测定步骤如下：

1) 确认微量移液器调至 100 μL 。

2) 将测光管插入光度计孔槽内，盖上遮光盖，按下测量键，读取测光管本底 RLU_0 ，若 $RLU_0 > 10$ ，应更换测光管或采取措施降低 RLU_0 。

3) 取出测光管，插入测光管架内。

4) 拧紧试样 ATP 保存液 (5.4) 瓶盖，轻柔地上下颠倒混合至少 5 次，充分混匀后打开瓶盖，在 100 μL 微量移液器上装上吸头，准确移取 100 μL 试样至测光管底部，盖上瓶盖，弃去微量移液器吸头。

5) 拧紧荧光素-荧光素酶试剂瓶盖，轻柔地上下颠倒混合至少 5 次，充分混匀后打开瓶盖。

6) 更换微量移液器吸头，准确移取 100 μL 荧光素-荧光素酶试剂至已加过试样的测光管中，轻柔地振摇测光管 5 次，插入光度计孔槽内，盖上遮光盖，按下测量键，读取并记录试样测定结果 RLU_{S1} ；立即将此测光管取出，再次轻柔地振摇 5 次，插入光度计孔槽内，盖上遮光盖，按下测量键，读取并记录试样测定结果 RLU_{S2} ；此步骤的 2 次重复测定应在 1 min 内完成。

7) 盖上荧光素-荧光素酶试剂瓶盖，弃去微量移液器吸头，弃去测光管，盖上遮光盖。

8) 当 RLU_{S1} 和 RLU_{S2} 均 ≤ 100 时，重复测定极差 R_S 应 < 20 ， R_S 按照公式 (2) 计算；当 RLU_{S1} 和 RLU_{S2} 中至少有一个值 > 100 时， RLU_{S1} 和 RLU_{S2} 的相对偏差 R_{VS} 应 $\leq 10\%$ ；否则，应查找原因并重新进行试样测定， R_{VS} 按照公式 (3) 计算。

$$R_S = |RLU_{S1} - RLU_{S2}| \quad (2)$$

$$R_{VS} = \frac{|RLU_{S1} - RLU_{S2}|}{RLU_{S1} + RLU_{S2}} \times 100\% \quad (3)$$

式中：

- R_S —— 试样重复测定 2 个结果之差的绝对值；
 R_{VS} —— 试样重复测定 2 个结果的相对偏差，%；
 RLU_{S1} —— 试样重复测定的第 1 次测定结果；
 RLU_{S2} —— 试样重复测定的第 2 次测定结果。

10.5 空白试样测定

以无菌水替代试样，重复步骤 10.4。

11 结果计算与表示

11.1 结果计算

样品中 ATP 的质量浓度 ρ (pg/mL)，按照公式 (4) 计算：

$$\rho = \frac{RLU_{S1} + RLU_{S2}}{RLU_{C1} + RLU_{C2}} \times \frac{1000 \times 10 \times f}{V} \quad (4)$$

式中：

- ρ —— 样品中微生物 ATP 的浓度，反映活性微生物的含量，pg/mL；
 RLU_{S1} —— 试样重复测定的第 1 次测定结果；
 RLU_{S2} —— 试样重复测定的第 2 次测定结果；
 RLU_{C1} —— 单点校准重复测定的第 1 次测定结果；
 RLU_{C2} —— 单点校准重复测定的第 2 次测定结果；
1000 —— 单点校准标液的浓度，pg/mL；
10 —— ATP 保存液体积，mL；
 f —— 样品稀释倍数；
 V —— 样品过滤体积，mL。

11.2 结果表示

测定结果的表示方式见表 1；若将测定结果转换成以 10 为底的对数表示时，应保留 2 位小数。

ATP 测定原始记录格式见附录 A。

表 1 ATP 测定结果表示

测定结果浓度区间 (pg/mL)	保留小数位数	举例 (pg/mL)
ATP < 1	2~3	<0.17、0.25、0.182、0.630、0.99
1 ≤ ATP < 10	2	1.00、2.43、9.99
10 ≤ ATP < 100	1	10.0、17.5、99.9
ATP ≥ 100	0	100、365、999、2408

12 精密度和准确度

5 个实验室对不同类型的试样重复测定 5 次，相对标准偏差范围为 0.60%~17.5%，其中，不同 ATP 浓度区间的精密度见表 2。在不同类型的试样中加入 50 μL 单点校准标液，回收率范围为 105.7%~125.8%。对校准曲线标液进行测定，相对误差范围为 94.3%~110.4%。

表 2 不同 ATP 浓度区间的精密度

ATP 浓度区间 (pg/mL)	样品浓度范围 (pg/mL)	相对标准偏差 (%)
ATP<1	0.102~0.647	4.0~16.8
1≤ATP<10	2.67~7.97	2.3~14.9
10≤ATP<100	16.7~73.8	2.2~15.3
ATP≥100	108~1414	0.60~17.5

13 质量保证和质量控制

13.1 空白实验

每批（或 20 个）样品应对 1 个空白试样（9.4）进行全程序空白实验，测定结果应＜方法检出限。

13.2 单点校准

完成当日所有试样测定后，宜进行一次单点校准，评估当日测定数据的有效性。

13.3 准确度

13.3.1 校准曲线

定期使用校准曲线标液（5.9）绘制校准曲线以评估光度计性能，浓度系列为 0 pg/mL、10 pg/mL、100 pg/mL、1000 pg/mL、10000 pg/mL 和 100000 pg/mL，校准曲线的相关系数 r 应≥0.99。校准曲线回归方程不应作为计算样品 ATP 浓度的依据。

13.3.2 加标实验

定期开展试样加标回收率测定，试样加标回收率应在 90%~130%之间。

14 废物处理

实验过程中产生的废物应分类收集，集中保管，并做好相应标识，委托有资质的单位处理。

15 说明事项

参考本标准测定微生物培养液的 ATP 浓度时，宜用无菌水稀释后再过滤。

参考本标准测定游离于细胞外的 ATP 浓度时，应将样品滤液（9.3.5）作为试样，按照步骤 10.4 进行测定，计算 ATP 浓度时应删除公式（4）中的 10 和 V 。

附录 A
(资料性附录)
ATP 测定原始记录格式

表 A.1 ATP 测定原始记录

项目名称：

测定日期： 年 月 日

测定方法			校准曲线标液					
测定方法 标准号			标液浓度 (pg/mL)					
光度计 品牌、型号			RLU					
光度计编号			ATP 浓度 (pg/mL)					
裂解液 品牌、批号			校准曲线 回归方程				相关系数 r	
稀释液 品牌、批号			单点校准标液 品牌、批号、浓度			第 1 次 RLU _{C1}	第 2 次 RLU _{C2}	相对偏差 R _{VC}
缓冲液 品牌、批号			荧光素-荧光素酶干粉 品牌批号					
样品编号	过滤体积 V (mL)	稀释倍数 f	测光管 RLU ₀	第 1 次 RLU _{S1}	第 2 次 RLU _{S2}	相对偏差 R _{VS} 或极差 R _S	ATP 浓度 (pg/mL)	备注
空白试样								
备注								

实验人员：

审核人员：

《水中微生物三磷酸腺苷（ATP）的测定 生物发光法 （征求意见稿）》编制说明

《水中微生物三磷酸腺苷（ATP）的测定 生物发光法》

标准编制组

二〇二四年一月

项 目 名 称 : 水中微生物三磷酸腺苷(ATP)的测定 生物发光法

项 目 承 担 单 位 : 上海浦东水务(集团)有限公司、东方国际集团上海环境科技有限公司、上海南汇自来水有限公司

编制组主要成员 : 蒋增辉、李梅、张华军、马顺君、唐玉霖、雷斌

编 制 单 位 : 上海浦东水务(集团)有限公司、东方国际集团上海环境科技有限公司、上海南汇自来水有限公司、哈希水质分析仪器(上海)有限公司、同济大学、天津泰达水业有限公司、上海青浦自来水有限公司、上海市松江自来水有限公司、上海市自来水奉贤有限公司、沈阳水务水质检测技术发展有限公司、衡阳市清源水质检测有限公司、厦门理工学院、厦门市水资源利用与保护重点实验室、昆山市自来水集团有限公司

目 录

1	项目背景	1
1.1	任务来源	1
1.2	工作过程	1
2	标准制订的必要性分析	2
2.1	三磷酸腺苷 (ATP)	2
2.2	饮用水微生物指标现状	2
2.3	ATP 测定的优势	3
3	国内外相关分析方法研究	3
3.1	国外相关分析方法和应用	3
3.2	国内相关分析方法和应用	4
3.3	国内外相关分析方法研究结论	7
4	标准制订的基本原则和技术路线	7
4.1	标准制订的基本原则	7
4.2	标准制订技术路线	8
5	方法研究报告	9
5.1	方法研究目标	9
5.2	方法原理	9
5.3	试剂和材料	9
5.4	仪器和设备	9
5.5	个人防护用品	10
5.6	实验环境	10
5.7	样品	10
5.8	分析步骤	11
5.10	方法检出限和测定下限	14
5.11	精密度和准确度	14
5.12	正确度	15
6	方法验证	16
6.1	方法验证方案	16
6.2	方法验证过程及结论	17
7	与开题报告的差异说明	19
8	参考文献	19
附件 1	方法验证报告	21

《水中微生物三磷酸腺苷（ATP）的测定 生物发光法（征求意见稿）》

编制说明

1 项目背景

1.1 任务来源

2018年1月4日，上海市政府发布了《上海市城市总体规划（2017-2035年）报告》^[1]，要求“全市供水水质达到国际先进水平，满足直饮需求”。2022年8月30日，住建部办公厅等部门联合下发了《关于加强城市供水安全保障工作的通知》（建办城〔2022〕41号）^[2]，要求“全面、系统加强城市供水工作，推动城市供水高质量发展，持续增强供水安全保障能力；到2025年，建立较为完善的城市供水全流程保障体系和基本健全的城市供水应急体系。”为积极落实上述要求，提升突发污染应对能力，加强水厂精细化管理，保障供水生物安全，拓展水质微生物指标和测定分析能力，上海市净水技术学会组织上海浦东水务（集团）有限公司、东方国际集团上海环境科技有限公司和上海南汇自来水有限公司等单位，开展《水中微生物含量的测定 三磷酸腺苷（ATP）生物发光法》团体标准编制项目，并于2023年4月10日正式立项。编制过程中，为精准表达标准意义和测定指标，编制组将标准名称由《水中微生物含量的测定 三磷酸腺苷（ATP）生物发光法》调整为《水中微生物三磷酸腺苷（ATP）的测定 生物发光法》。

1.2 工作过程

1.2.1 成立标准编制组

2023年3月，由上海浦东水务（集团）有限公司、东方国际集团上海环境科技有限公司、上海南汇自来水有限公司、哈希水质分析（上海）有限公司和同济大学等单位成立标准编制组，确定标准编制组成员，分配项目工作任务。

1.2.2 国内外资料调研

2023年3月～6月，标准编制组成员查询了国内外水质 ATP 测定方法和应用的相关标准和文献资料，在整理借鉴的基础上进行归纳和总结，对方法中涉及的样品前处理、测定步骤等内容进行了研究和探讨，制订了初步的实验方案。

1.2.3 立项评审

2023年3月30日，上海市净水技术学会组织召开团体标准《水中微生物含量的测定 三磷酸腺苷（ATP）生物发光法》立项专家评审会，经审阅文件材料、听取技术汇报和现场质询讨论，专家组一致同意团体标准项目立项。

1.2.4 建立标准方法

2023年4月～7月，标准编制组开展实验研究工作，明确技术路线，对方法的各项技术参数和条件进行优化，确定标准方法技术细节、检出限、测定下限、精密度和正确度等方法指标的实验要求。

1.2.5 方法验证工作

2023 年 7 月~2024 年 1 月，标准编制组组织 5 家验证实验室对标准方法的适用性进行方法验证，统一了前处理方法、测定步骤、样品性质、浓度范围和数据单位等，规范了验证报告格式。

1.2.6 标准征求意见稿和编制说明

标准编制组汇总分析实验数据，修改完善材料文本，经内部反复讨论，于 2024 年 1 月 30 日完成了《〈水中微生物三磷酸腺苷（ATP）的测定 生物发光法〉（征求意见稿）》和《〈水中微生物三磷酸腺苷（ATP）的测定 生物发光法〉（编制说明）》。

1.2.7 标准征求意见稿审查会

待补充。

2 标准制订的必要性分析

2.1 三磷酸腺苷（ATP）

三磷酸腺苷（ATP）又称腺嘌呤核苷三磷酸、腺苷三磷酸，由 1 分子腺嘌呤、1 分子核糖和 3 个磷酸基团连接而成，化学式为 $C_{10}H_{16}O_{13}N_5P_3$ ，结构式（见图 1）也可简写成 A-P~P~P，“~”代表高能磷酸键，当高能磷酸键水解时可释放大量能量。ATP 是生物细胞内主要的能量来源，在生命活动中起着传递能量的作用。

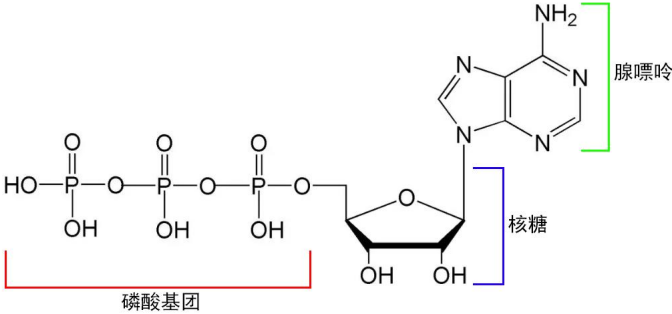


图 1. 三磷酸腺苷（ATP）结构式

ATP 广泛存在于细胞内，包括高等动物细胞、高等植物细胞和微生物细胞等，且细胞内 ATP 的浓度相对恒定。通过测定 ATP 的浓度可以快速反映水中活性微生物的污染水平，并为估算微生物纯培养物中的活性细胞数量提供方法依据。

2.2 饮用水微生物指标现状

微生物指标是反映饮用水卫生安全的重要指标，相比理化指标，微生物指标偏少，《生活饮用水卫生标准》（GB 5749—2022）^[3]中规定的微生物指标仅有菌落总数、总大肠菌群、大肠埃希氏菌、肠球菌、贾第鞭毛虫、隐孢子虫和产气荚膜梭状芽孢杆菌等 7 项。菌落总数虽是反映水中细菌总量的指标，但由于培养基、培养温度 and 好氧条件等限制，实际仅能检测出水中很小一部分以细菌为主的微生物，无法全面评价饮用水的生物安全。藻类和放线菌并未列入目前的饮用水水质标准，而这两类微生物恰恰是造成水源污染和臭味事件的重要指标。

《生活饮用水标准检验方法 第 12 部分：微生物指标》（GB/T 5750.12—2023）^[4]中主要采用培养、富集、染色和镜检等传统分析方法，步骤复杂、工作量大、成本高、培养废弃物多，而且往往需要等待 1~2 d 才能得到结果，既无法适应水厂精细化管理的要求，也无法实现

应急快速检测的需求。总之，为了保障供水全流程的生物安全和去除效果，亟需引入既能实施便捷测定，又能快速得到结果，还能反映水中微生物总体污染程度的水质指标。

2.3 ATP 测定的优势

2.3.1 快速便捷

与培养法 1~2 d 的冗长时间相比，ATP 测定十分便捷快速，从样品过滤到 ATP 提取再到荧光测定仅需 5~15 min，既大幅度减轻了操作人员的工作强度，也大幅度提升了检测效率，为城镇供水厂及时应对和工艺调整提供了快速便捷的水质分析手段。

2.3.2 浓度跨度大

在制水全流程中，微生物 ATP 含量变化非常大，水源水可超过 1×10^2 pg/mL，藻类暴发时更高，砂滤池反冲洗水可达 1×10^3 pg/mL，后臭氧消毒接触池出水则可降至 1×10^{-2} pg/mL，出厂水普遍为 1×10^{-1} pg/mL，部分水龄长的管网末梢水接近 1×10^1 pg/mL，如此大的浓度跨度均可使用相同的 ATP 测定方法。

2.3.3 解决关键水质问题

供水源头方面，湖库藻类暴发污染十分频繁，ATP 测定可以快速获得生物总量结果，还可以通过对藻类的长期监测预判藻华发展趋势。供水末端方面，由于城市供水水质的整体提升，理化指标已相对稳定，与化学污染不同，微生物污染常具有增殖性、次生性和传染性等特性^[5]，从而成为影响二次供水乃至直饮水水质的关键问题。由于 ATP 的方法检出限低于 1 pg/mL，通过增加富集水量还可降至飞克 (fg) 级别，这为研究二次供水和直饮水的生物安全提供了快速、精准和有效的手段。

3 国内外相关分析方法研究

3.1 国外相关分析方法和应用

自 1963 年 W.D. McElroy^[6]等揭示了使 ATP 发出荧光的方法原理，欧美等发达国家相继采用生物发光法测定水中 ATP 浓度的历史已超过半个世纪，积累了大量的实践经验，涉及领域包括：水源藻类暴发预警、净水工艺过程中的微生物变化、氧化和消毒效果评估、供水管网生物安全性评估等。

在 ATP 分析方法技术方面，ATP 测定常与经典平板法菌落总数、异养菌平板计数 (HPC) 和流式细胞技术 (FCM) 等微生物检测方法进行比较，研究各种方法之间的相关性^[7]；在水源水藻类暴发预警方面，通过联合测定藻密度、叶绿素 a 和 OD730 吸光度等指标，ATP 测定可作为藻类暴发的早期预警信号^[8]；在净水工艺方面，通过工艺过程进、出水中 ATP 浓度变化，计算工艺对微生物的去处效率和生物泄漏程度，探讨滤池反冲洗频率的合理性，评价氯消毒效果^[9-11]；在管网水方面，ATP 测定结果可反映不同管网中的基准微生物含量随采样位置与水厂距离的变化情况 (水龄)^[12]；在污水方面，ATP 测定可快速获得由不同种类微生物构成的复杂活性污泥的真实活性，可表征污水消毒过程中粪大肠菌群的灭活效果，可弥补经紫外线消毒后培养法无法生长成菌落的方法不足^[13]；在再生回用水方面，通过 ATP 测定，可反映可同化有机物 (AOC) 水平，从而评价回用水的生物稳定性^[14]。

为规范水中微生物 (包括水样、废水样品、微生物培养液、水中浮游植物和浮游动物样品等) 的 ATP 测定方法，美国材料与试验协会 (ASTM) 于 2015 年制订了分析方法标准：“Standard Test Method for Adenosine Triphosphate (ATP) Content of Microorganisms in Water

(D4012—15)”^[15]（《水中微生物的三磷酸腺苷（ATP）含量标准测定法》（D4012—15））；2023 年，ASTM 对该方法进行了修订：“Standard Test Method for Adenosine Triphosphate (ATP) Content of Microorganisms in Water (D4012—23a)”^[16]。

注：美国材料与试验协会（AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS，简称 ASTM）成立于 1896 年，是世界上最大的标准发展机构之一，ASTM 的会员约 34000 个，其中约 4000 个来自美国以外的上百个国家，ASTM 已制定 10000 多项标准。

通过国外文献和分析方法标准可以发现：①ATP 测定应用已有较长历史，在国外得到了广泛应用；②权威机构 ASTM 于 2015 年发布了测定标准，并在 2023 年进行了修订。总之，通过测定 ATP 浓度来反映水中微生物含量的方法是一项成熟、标准的测定方法，已被广泛应用。

3.2 国内相关分析方法和应用

3.2.1 国内水行业的应用

国内采用生物发光法测定水中 ATP 浓度的研究应用时间不长，但应用范围较广，包括原水、城镇供水厂工艺过程水、管网水、二次供水、分质供水、现制现售水、再生水、工业处理工艺过程水、口腔治疗用水、石油采出水、空间站循环水和细菌培养液等（见表 1）。

表 1. 水中 ATP 测定相关国内文献

文献名	样品类型	文献主要研究内容
ATP 发光技术快速检测饮用水中菌落总数 ^[17]	细菌培养液	配制菌落总数浓度梯度样品，将平板计数法测定菌落总数和 ATP 测定结果进行比较：①ATP 测定快速、简便，使细菌检查的工作量大幅度减轻；②ATP 测定结果与菌落总数在一定范围内呈正相关，两者对数值的相关性 $r=0.98525$ ；③革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌都可以用 ATP 测定确定细菌数量。
ATP 生物发光法在快速检测饮用水菌落总数中的应用 ^[18]	饮用水（二次供水、分质供水、现制现售水）	对住宅小区和自动售水机水样进行 ATP 测定：①ATP 测定结果合格率为 84.3%（ >50 RLU/mL），菌落总数合格率为 89.4%（ >100 CFU/mL）；②ATP 测定和菌落总数有较好相关性（ $R^2=0.804$ ， $P<0.05$ ），通过 ATP 测定可以间接反映出细菌的数量；③ATP 测定 5 min 内可完成，仪器携带方便，可实现及时现场取样监测。
ATP 技术用于工业水厂微生物监测的研究 ^{[19]*}	工业处理工艺过程水	将 ATP 测定用于工业水供水系统：①ATP 测定简便、快速；②可用于评估工业水供水系统的运行状况；③红虫虫卵可能是造成工艺段和储存段 ATP 升高的原因之一；④ATP 测定有助于水处理系统在微生物大量滋生时采取及时的防范措施，对工艺段药剂的投加量具有一定的指导意义。
空间站水循环处理系统中微生物的检测技术 ^[20]	空间站循环水	对空间站水循环处理系统中微生物的测定进行比较：①ATP 测定不需要复杂设备、稀释和培养，操作简便，与传统的平板计数法有较好的相关性；②比色固相萃取法测碘和银离子浓度法快速、精确、简便，也解决了杀菌剂选择的问题。
ATP 生物发光法在饮用水和再生水活菌生物量快速检测中的应用 ^[21]	饮用水、再生水	对饮用水和再生水进行 ATP 测定，使用异养菌平板计数法（HPC）和流式细胞技术（FCM）验证：①ATP 测定方法快速、灵敏度高，操作简便，可和其他方法结合用于水中微生物的测定及现场实时监测；②ATP 测定检测限为 0.001 nM；③水样中活菌 ATP 浓度与 FCM 活细胞数相关性良好（ $R^2=0.87$ ， $P<0.05$ ），但与 HPC 菌落数之间

		相关性较差 ($R^2=0.64$, $P<0.05$)；③水样平均每个细胞 ATP 浓度为 1.39×10^{-11} nM。
ATP 生物荧光技术在口腔治疗用水污染状况现场快速检测中的应用初探 ^[22]	口腔治疗用水	对 48 家相同规模的医疗机构口腔科共 720 份治疗用水进行 ATP 测定：①ATP 测定和菌落总数结果相关性较好 ($R^2=0.819$, $P=0.00$)；②参照生活饮用水中菌落总数限制 (≤ 100 CFU/mL)，ATP 测定限值 RLU 为 787；③ATP 测定口腔治疗用水污染状况，可实现现场快速检测和筛查，提高监督执法效率。
牙科综合治疗台出水端水质调查及检测方法 ^[23]	口腔治疗用水	对 20 家口腔医疗单位的 60 台牙科综合治疗台的 176 份椅旁水样，采用 ATP 测定和细菌培养法进行比较：①细菌总数范围为 $0\sim 2.3\times 10^6$ CFU/mL，仅有 29.55%达标；②ATP 测定和平板计数法的相关系数为 0.60；③ATP 测定可作为快速椅旁水质监测的方法之一。
ATP 法测水中细菌数目效果评价及预警限值研究 ^[24]	细菌培养液、生活热水、饮用水	采用 ATP 测定和平板计数法测定单一细菌、混合细菌、生活热水和饮用水：①对生活热水和饮用水进行 ATP 测定与 R_2A 培养基平板计数的相关性 R^2 为 0.8436 和 0.7254，可作为评价水质的初筛方法；②针对生活热水和饮用水限值 100 CFU/mL，对应的 ATP 测定限值为 1000 RLU 和 1400 RLU。
ATP 生物发光检测法在油田采出水中的应用 ^{[25]*}	石油采出水	比较 ATP 测定与现行绝迹稀释法为基础评价油田采出水杀菌剂的杀菌效果：①ATP 测定可准确测出杀菌剂的杀菌率，并将检测评价时间由原来的 7 d 缩短至 2 h。
不同季节山区饮用水处理系统微生物多样性和时空分布特征 ^[26]	城镇供水厂原水、工艺过程水	采用 ATP 测定和异养菌平板计数法 (HPC) 对丽水市新建镇自来水厂进行分析：①处理系统微生物量和活性随季节变化，春季>夏季>冬季>秋季；②砂层微生物活性>活性炭颗粒层活性，生物量<活性炭层生物量；③微生物多样性受 pH 值、 COD_{Mn} 和浊度等影响；④微生物活性和生物量之间没有显著相关性。
水中细菌 ATP 荧光检测影响因素实验研究 ^[27]	细菌培养液、饮用水、纯水	使用细菌培养液、饮用水、纯水研究 ATP 测定准确性的影响因素：①在 25℃条件下，采用 5 s 间隔连续读数，记录最大值作为测试结果；②稀释用的溶剂会在一定程度上干扰测试结果；③不同水质会导致 ATP 测试结果的差异；④应将相对发光强度转化成 ATP 物质的量，并以此作为生物量的表征指标。
ATP 检测技术在自来水处理中的应用 ^{[28]*}	城镇供水厂原水、工艺过程水、出厂水及应用水(管网水)	对出厂水和管网水进行 ATP 测定，扣除离群值后建立 ATP 基准线：①ATP 测定用于自来水中微生物的检测，与菌落总数相比具有检测更快速、检测细菌更全面、操作更方便的特点；②ATP 含量和菌落总数在出厂水和管网水中没有明显相关性；③通过统计计算 ATP 测定结果设定基准线，检查水厂生产运行情况和管网污染问题。
基于 ATP 生物荧光法的供水系统生物安全评估 ^{[29]*}	饮用水(管网水、二次供水)	对 4 个管网点和 9 个二次供水点水样进行 ATP、菌落总数、异养菌平板计数 (HPC) 和总大肠菌群测定：①生物安全指标受供水距离、季节影响较大；②ATP 与 HPC、温度显著正相关，与总氯显著负相关，ATP 能较好地反映生物安全现状；③基于菌落总数和 HPC 限值计算 ATP 限值为 1.30 pg /mL；④ATP 测定是针对水质生物安全评价的新技术，可为后续供水系统生物安全评价提供技术支持。

注：*所使用的仪器和试剂品牌型号与本标准相同。

通过国内文献可以发现：①ATP 测定相较传统细菌培养方法更简便、更快速、更适合现场测定；②ATP 测定结果和菌落总数或 HPC 的相关性不一，但和细菌（纯）培养液的相关性强；③ATP 测定的精密度和准确度较高，检出限极低，达到每毫升皮克级别。总之，通过测定 ATP 反映水中微生物含量的分析方法在国内已得到多个领域的应用，方法简便、快速，精密度和准确度好。

3.2.2 国内相关标准

目前尚无针对供水行业测定水中微生物 ATP 浓度的分析方法标准发布。

在食品接触表面污染方面，已制订了 1 部国家标准、1 部行业标准和 2 部团体标准（见表 2）。

表 2. 食品接触表面污染 ATP 测定标准

标准名称	标准类别/标准号	起草单位
铁路食（饮）具洁净度 ATP 生物发光检测法和分级判定 ^[30]	行业标准 TB/T 3121—2005	铁道部劳动卫生研究所、北京滨松光子技术股份有限公司、乌鲁木齐铁路疾病预防控制中心、乌鲁木齐铁路卫生监督所、武汉铁路中心卫生防疫站
食品接触表面清洗消毒效果试验方法 三磷酸腺苷生物发光法 ^[31]	国家标准 GB/T 36004—2018	上海市计量测试技术研究院、中国日用化学工业研究院、艺康（中国）投资有限公司、洛娃科技实业集团有限公司
餐（饮）具及公共用品用具表面 ATP 含量的测定和限值要求 ^[32]	团体标准 T/CAQI 220—2021	深圳赛威玛智能科技有限公司、中国检验检疫科学研究院综合检测中心、标管准家（北京）标准化服务中心、保定市市场监督管理局综合执法局、中检科创（北京）测试认证有限责任公司、中检科（北京）测试技术有限公司
食品接触表面清洁效果评价 ATP 监测及限值要求 ^[33]	团体标准 T/CCA 029—2022	3M 中国有限公司、中国人民解放军疾病预防控制中心、中国检验检疫科学研究院、中检科（北京）测试技术有限公司、深圳市检验检疫科学研究院、天津顶巧餐饮服务咨询有限公司、上海天祥质量技术服务有限公司、海鸿达（北京）餐饮管理有限公司、眉州东坡餐饮管理（北京）有限公司

在医疗机构表面洁净度方面，已制订了 3 部地方标准（见表 3）。其它行业也制订了一些标准：2021 年，中国香料香精化妆品工业协会制订了 1 部团体标准《化妆品微生物检验方法（定性）ATP 生物荧光增幅法》（T/CAFFCI 46—2021）；2023 年，中华人民共和国海关总署制订了 1 部行业标准《抗菌纺织品抗菌性能的测定 ATP 荧光分析法》（SN/T 5432—2023）。

表 3. 医疗机构表面洁净度 ATP 测定标准

标准名称	标准类别/标准号	起草单位
医疗机构环境表面清洁度 ATP 生物荧光现场评价与检测方法 ^[34]	地方标准 DB31/T 1070—2017	上海市卫生和计划生育委员会监督所
医疗机构物体表面洁净度 ATP 生物荧光检测规范 ^[35]	地方标准 DB32/T 3422—2018	泰州市卫生监督所、泰州市卫生监督服务协会、泰州市中西医结合医院

医疗机构物体表面清洗效果现场快速检测-ATP 生物荧光法 ^[36]	地方标准 DB42/T 1412—2018	武汉市医院感染管理质量控制中心、武汉市中西医结合医院、武汉市第三医院、武汉市中心医院、湖北省妇幼保健院、武汉市第八医院
--	--------------------------	---

虽然上述标准中 ATP 发光的原理与本标准一致，但在样品采集、仪器类型、操作步骤、结果表示等方面并不适用于水样的测定，主要的差异包括：①使用采样器材多为无菌拭子（涂抹采样棒）或无菌滤纸；②样品计量并非按照体积而是面积，一般为 25~100 cm²；③部分标准中需增菌培养 30 min；④测定结果单位不是 pg/mL，而是 RLU 或 mol。总之，目前国内的 ATP 测定方法标准并不适用于测定水中微生物 ATP 浓度，亟需制订针对性的标准文本。

3.3 国内外相关分析方法研究结论

通过测定 ATP 反映水中微生物含量的分析方法在国外被广泛应用，且发布了权威标准并经修订完善；国内已发布的 ATP 测定标准主要针对表面污染，水中微生物的 ATP 测定已有较多应用，但缺少测定方法标准，亟需尽快制订。

4 标准制订的基本原则和技术路线

4.1 标准制订的基本原则

主要参照《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》(GB/T 1.1—2020)^[37]和《环境监测分析方法标准制定技术导则》(HJ 168—2020)^[38]的要求，参考国内外最新的标准、方法和相关文献而编制，标准制订中确保方法标准的科学性、先进性、可行性和可操作性。

4.1.1 方法检出限

根据光度计最小示值确定仪器检出限，根据生活饮用水（出厂水、管网水）、水厂工艺过程水、瓶装水、无菌水和超纯水等确定方法检出限的大致浓度范围，对接近检出限浓度的试样重复测定 7 次后计算出方法检出限，选择各单位验证报告中最大的方法检出限作为本标准的方法检出限。

当制备试样的样品体积为 50 mL 时，方法检出限为 0.17 pg/mL，测定下限为 0.68 pg/mL。

4.1.2 方法准确可靠

5 家验证实验室对不同 ATP 浓度范围（极低浓度 $c_{ATP} < 1 \text{ pg/mL}$ 、低浓度 $1 \text{ pg/mL} \leq c_{ATP} < 10 \text{ pg/mL}$ 、中浓度 $10 \text{ pg/mL} \leq c_{ATP} < 100 \text{ pg/mL}$ 和高浓度 $c_{ATP} \geq 100 \text{ pg/mL}$ ）的实际样品进行精密度测定，对 10 pg/mL、100 pg/mL、1000 pg/mL、10000 pg/mL 和 100000 pg/mL 的标准物质进行正确度测定，对不同浓度范围（极低浓度 $c_{ATP} < 1 \text{ pg/mL}$ 、低浓度 $1 \text{ pg/mL} \leq c_{ATP} < 10 \text{ pg/mL}$ 和高浓度 $c_{ATP} \geq 100 \text{ pg/mL}$ ）的实际样品进行试样加标回收率测定，结果表明：本标准方法的精密度、正确度良好，满足各项性能指标要求。方法验证报告见附件一。

4.1.3 方法普遍适用易于推广

本标准所使用的主要分析仪器光度计和主要试剂在 ASTM D4012—23a 中使用；实验方法开发和验证过程中使用的样品来源地域跨度大，包括上海、天津、沈阳、湖南等地；实验开展季节包括春季、夏季、秋季、冬季且气温跨度大，最高 36 °C，最低 -27 °C；样品类型

全面，包括水源水、水厂工艺过程水、管网水、二次供水、瓶装水、超纯水、无菌水等，因此，本标准测定方法具备良好的适用性。

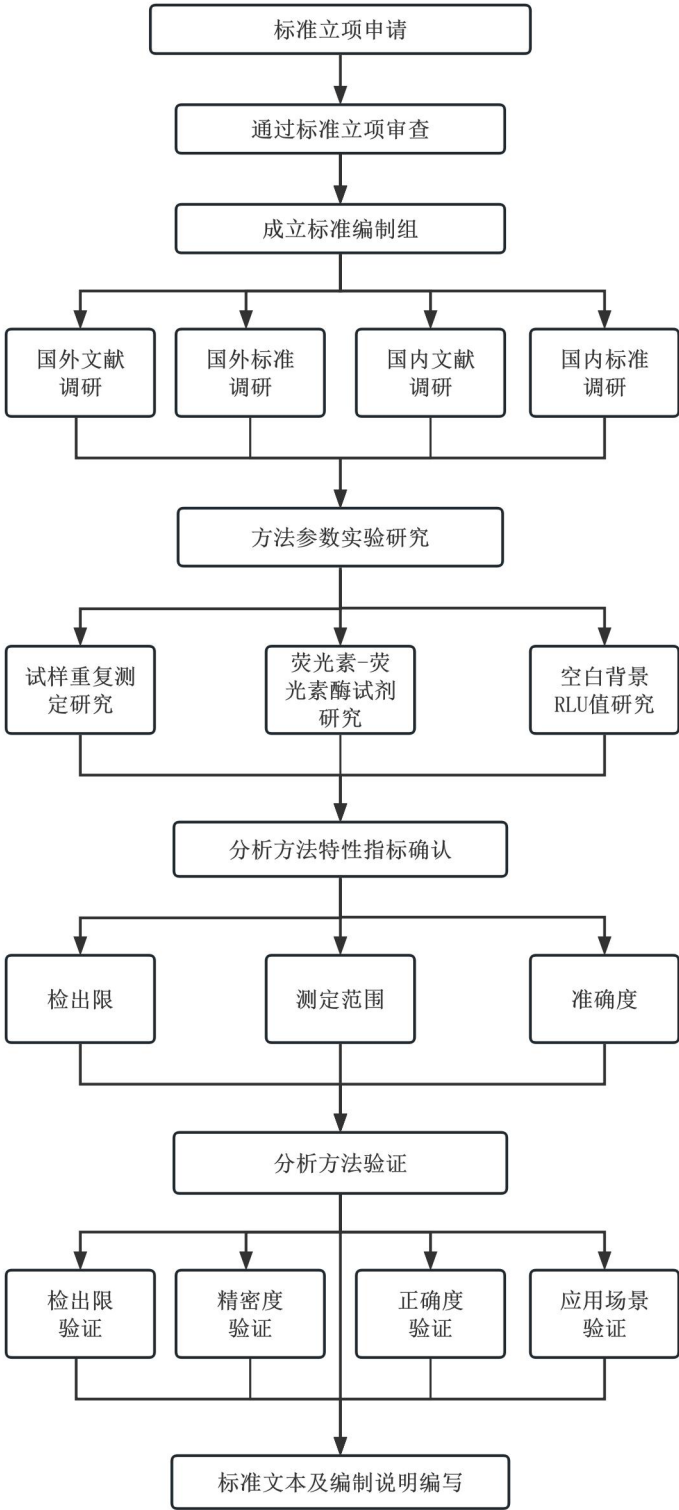


图 2. 标准制订技术路线图

4.2 标准制订技术路线

本标准制订的技术路线见图 2。

5 方法研究报告

5.1 方法研究目标

(1) 借鉴 ASTM D4012—23a 明确本方法的适用范围：地表水、水源水、水厂工艺过程水、生活饮用水、直饮水和瓶装水等。

(2) 主要参照 HJ 168—2020 编写标准文本。

(3) 根据研究结果和验证结果确定特性指标：检出限、测定下限、精密度等。

(4) 通过方法研究和验证实验确定方法的可行性和适用性。

(5) 方法拟达到的特性指标要求：方法检出限预期达到 0.20 pg/L；测定下限按 4 倍方法检出限表示；精密度以相对标准偏差表示，预期 <20%；正确度以试样加标回收率表示，预期可接受范围为 90%~130%。

(6) 提交材料：团体标准方法文本和编制说明（征求意见稿、征求意见并汇总处理、送审稿及完成报批稿）。

5.2 方法原理

ATP 是高等植物细胞、高等动物细胞和微生物细胞的主要组成部分，通过测定活性细胞内的 ATP 浓度，可以快速反映水中活性微生物的含量。测定过程中，ATP 和荧光素、荧光素酶等快速反应产生光，经由 ATP 标准物质校准的光度计测定 RLU，根据公式计算最终得到 ATP 浓度。

5.3 试剂和材料

除非另有说明，使用的分析纯试剂或生物试剂应符合相关标准的要求，实验用水为蒸馏水、超纯水或去离子水。

5.3.1 裂解液：用量为 1 mL，用于破坏细胞结构后释放 ATP。

5.3.2 提取液：使用 1 mL 裂解液提取 ATP 后的混合液。

5.3.3 稀释液：用量为 9 mL，用于稀释和定容提取液。

5.3.4 ATP 保存液：1 mL 提取液和 9 mL 稀释液的混合物。

5.3.5 荧光素-荧光素酶干粉：含有荧光素和荧光素酶的粉剂。

5.3.6 缓冲液：用于溶解和稀释荧光素-荧光素酶干粉的试剂。

5.3.7 荧光素-荧光素酶试剂：将荧光素-荧光素酶干粉溶解于缓冲液后配制成的试剂。

5.3.8 单点校准标液：浓度为 1000 pg/mL 的 ATP 标准物质溶液。

5.3.9 校准曲线标液：浓度为 10 pg/mL、100 pg/mL、1000 pg/mL、10000 pg/mL 和 100000 pg/mL 的 ATP 标准物质溶液。

5.3.10 无菌水：经 121 °C 高压蒸汽持续灭菌 20 min 的实验用水，冷却备用。

5.4 仪器和设备

不应将一次性耗材经高压灭菌后重复使用，不应使用含有荧光物质的记号笔。

5.4.1 光度计：使用光电倍增管，波长范围至少覆盖 530±20 nm，测量结果为 RLU。

5.4.2 微量移液器：固定式 100 μL 和 1000 μL，可调式 100~1000 μL。

5.4.3 高压蒸汽灭菌器：121 °C 可调，用于实验用水等的灭菌。

5.4.4 干热灭菌器：160 °C~180 °C 可调，用于玻璃采样容器和无菌瓶等的灭菌。

5.4.5 采样容器：带螺旋盖的无菌瓶或无菌袋，容积 >100 mL，玻璃、PP 和 HDPE 等材质。

5.4.6 注射器：容积刻度 ≥50 mL，具活塞，无针头，鲁尔接口，PP 材质，无菌独立包装，

一次性使用。

5.4.7 测光管：尺寸和光度计适配，PP 材质，无菌包装，一次性使用。

5.4.8 测光管架：尺寸和测光管适配。

5.4.9 微量移液器吸头：200 μL 和 1000 μL ，与微量移液器适配，PP 材质，必须为无菌原盒包装，一次性使用。

5.4.10 针头过滤器：滤盘直径 $\leq 35\text{ mm}$ ，孔径 0.45 μm ，鲁尔接口与注射器适配，水系混合纤维素酯（MCE）、玻璃纤维等材质，无菌包装，一次性使用。

5.4.11 实验室常用仪器、设备和器材。

5.5 个人防护用品

5.5.1 医用外科口罩：无纺布材质，无菌包装，一次性使用。

5.5.2 手套：乳胶、丁腈和 PE 等材质，一次性使用。

5.5.3 医用防尘帽：无纺布材质，无菌包装，一次性使用。

5.5.4 消毒用品：70%~75%酒精棉或酒精消毒湿巾。

5.6 实验环境

操作人员应佩戴个人防护用品，对实验桌面和仪器进行表面消毒，减少环境对实验全过程的污染。根据方法研究过程中的测定结果，试样测定过程在普通实验室完成即可，无菌室不是必须的。

5.7 样品

5.7.1 样品的采集

样品的采集应符合 GB/T 5750.2 和 HJ 1000 的规定。

采样前应对采样龙头进行消毒，采样过程避免污染样品、试剂和无菌耗材，采样容器不得用样品洗涤。样品量一般为采样容器的 80%左右，不得装满。采样容器上标注样品信息。

5.7.2 样品的运输与保存

样品应尽快完成试样制备，否则，应在 4 $^{\circ}\text{C}$ ~10 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏保存但不超过 3 h。

5.7.3 试样的制备

试样的制备可视作样品的前处理，可在样品采集现场完成，其余分析步骤宜在实验室中进行。由于微生物很容易受到环境温度、消毒剂等的影响，若非冷藏或经较长时间运输后，微生物含量会产生数量级变化，因此，建议通过试样制备得到 ATP 保存液以使 ATP 浓度稳定。对 ATP 极低浓度（ATP<1 pg/mL ）、低浓度（1 pg/mL $\leq$ ATP<10 pg/mL ）、中浓度（10 pg/mL $\leq$ ATP<100 pg/mL ）和高浓度（ATP $\geq$ 100 pg/mL ）样品进行试样制备后得到 ATP 保存液，在常温避光环境下放置 1 d、2 d 和 3 d 后，极低浓度样品测定结果仅有极微小增加且小于方法检出限，其它浓度样品测定结果均下降，但下降幅度不大（见表 4）。

表 4. ATP 保存液试样保存变化情况

保存天数 (d)	极低浓度样品变化 (pg/mL)	低浓度样品变化 (pg/mL)	中浓度样品变化 (%)	高浓度样品变化 (%)
1	0.024	-0.084	-6.15	-7.49
2	0.009	-0.294	-14.3	-21.5
3	0.009	-0.356	-18.0	-22.4

5.7.3.1 过滤

预先将样品和无菌水稳定至同一室温。

若样品清洁，可使用同一套过滤器材重复过滤步骤以增加过滤体积，过滤体积宜为 50 mL 的整数倍，记录过滤体积；若样品浑浊，可适当减少过滤体积至注射器最小刻度的整数倍，或用无菌水稀释样品后再过滤，记录过滤体积和稀释倍数；若已倒入注射器内的样品无法滤完，记录已过滤体积，弃去注射器内剩余的样品。过滤步骤如下：

- 1) 拧紧采样容器盖，将样品用力振摇至少 20 次，充分混匀后拧松但不取下采样容器盖。
- 2) 撕开注射器外包装，取出注射器，拔出活塞，将活塞放回注射器外包装内。
- 3) 取出针头过滤器，与注射器的鲁尔接口对接旋紧。
- 4) 打开采样容器盖，将样品缓慢地倒入竖立的注射器内至 50 mL 刻度。
- 5) 将活塞插入注射器，缓慢地推动活塞直至样品全部滤完，弃去滤液。
- 6) 将装有活塞和针头过滤器的注射器放回注射器外包装内。

5.7.3.2 提取和保存

预先将试剂稳定至同一室温。提取和保存步骤如下：

- 1) 拧紧裂解液瓶盖，轻柔地上下颠倒混合至少 5 次，充分混匀后拧松但不取下瓶盖。
- 2) 拧紧稀释液瓶盖，轻柔地上下颠倒混合至少 5 次，充分混匀后拧松但不取下瓶盖。
- 3) 确认微量移液器调至 1000 μL 。
- 4) 取出过滤时放回注射器外包装内的装有活塞和针头过滤器的注射器，必须先取下针头过滤器，再拔出活塞，将活塞放回注射器外包装内，而后将针头过滤器重新与注射器的鲁尔接口对接旋紧；手握注射器，使针头过滤器朝下。
- 5) 打开稀释液瓶盖，将朝下的针头过滤器插入稀释液瓶口，针头过滤器不应接触稀释液。
- 6) 打开裂解液瓶盖，在微量移液器上装上吸头，准确移取 1000 μL 裂解液至注射器内，移液时应避免液体挂壁。
- 7) 再次取出注射器外包装内的活塞，缓慢地推动活塞至注射器底部，将 1 mL 提取液全部过滤转移至稀释液瓶内，盖上并拧紧瓶盖，混匀后即 ATP 保存液。
- 8) 标注试样信息，完成试样的制备。

5.7.4 空白试样的制备

以无菌水替代样品，重复步骤 5.7.3。

5.8 分析步骤

预先将仪器、样品和试剂稳定至同一室温。为避免频繁进行单点校准，宜将试样集中分析。

5.8.1 光度计的使用

连接光度计电源和数据线，开启设备，按光度计说明书要求确认技术参数是否正常，稳定运行 10 min 后方可进行后续测定。

5.8.2 荧光素-荧光素酶试剂的配制

荧光素-荧光素酶试剂一般现配现用，若有剩余，应 4 $^{\circ}\text{C}$ ~10 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏保存。荧光素-荧光素酶试剂的配制步骤如下：

- 1) 确认微量移液器调至 1000 μL 。
- 2) 拧紧缓冲液瓶盖，轻柔地上下颠倒混合至少 5 次，充分混匀后拧松瓶盖。

- 3) 打开荧光素-荧光素酶干粉瓶盖，在 1000 μL 微量移液器上装上吸头，将缓冲液全部转移至荧光素-荧光素酶干粉瓶中。
- 4) 拧紧瓶盖，轻柔地上下颠倒混合至少 5 次，至少静置 5 min。
- 5) 标注试剂信息，完成荧光素-荧光素酶试剂的配制。

5.8.3 单点校准

测定当日，在开展试样测定前，必须进行单点校准；若新配制荧光素-荧光素酶试剂，必须进行单点校准。单点校准步骤如下：

- 1) 确认微量移液器调至 100 μL 。
 - 2) 将测光管插入光度计孔槽内，盖上遮光盖，按下测量键，读取测光管本底 RLU_0 ，若 $\text{RLU}_0 > 10$ ，应更换测光管或采取措施降低 RLU_0 。
- 对连续 7 个不同的测光管测定本底 RLU_0 ，结果均 < 10 （见表 5），对应的 ATP 浓度均 $<$ 方法检出限。

表 5. 测光管本底 RLU_0 结果

项目	比色管本底 RLU_0 结果	与本底质控要求 比较	对应的 ATP 浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	与方法检出限 比较
RLU_0 最大值	5	< 10	0.025	$<$ 方法检出限
RLU_0 最小值	1	< 10	0.005	$<$ 方法检出限
RLU_0 平均值	2.71	< 10	0.0135	$<$ 方法检出限
RLU_0 中位数	2	< 10	0.010	$<$ 方法检出限

- 3) 从孔槽内取出测光管，插入测光管架内。
- 4) 拧紧单点校准标液瓶盖，轻柔地上下颠倒混合至少 5 次，充分混匀后打开瓶盖，在 100 μL 微量移液器上装上吸头，准确移取 100 μL 单点校准标液至测光管底部，盖上瓶盖，弃去微量移液器吸头。
- 5) 拧紧荧光素-荧光素酶试剂瓶盖，轻柔地上下颠倒混合至少 5 次，充分混匀后打开瓶盖。
- 6) 更换微量移液器吸头，准确移取 100 μL 荧光素-荧光素酶试剂至已加过单点校准标液的测光管中，轻柔地振摇测光管 5 次，插入光度计孔槽内，盖上遮光盖，按下测量键，读取并记录单点校准结果 RLU_{C1} ；立即将此测光管取出，再次轻柔地振摇 5 次，插入光度计孔槽内，盖上遮光盖，按下测量键，读取并记录单点校准结果 RLU_{C2} ；此步骤的 2 次重复测定应在 1 min 内完成。
- 7) 盖上荧光素-荧光素酶试剂瓶盖，弃去微量移液器吸头，弃去测光管，盖上遮光盖。
- 8) 根据 ASTM D4012—23a 中单点校准结果 ≥ 5000 的要求， RLU_{C1} 和 RLU_{C2} 必须均 ≥ 5000 。根据方法研究测定结果， RLU_{C1} 和 RLU_{C2} 的相对偏差 R_{VC} 范围为 0.02%~1.92%，因此要求 $R_{VC} \leq 5\%$ ，否则，应查找原因并重新进行单点校准， R_{VC} 按照公式（1）计算。

$$R_{VC} = \frac{|\text{RLU}_{C1} - \text{RLU}_{C2}|}{\text{RLU}_{C1} + \text{RLU}_{C2}} \times 100\% \quad (1)$$

式中：

- R_{VC} —— 单点校准重复测定 2 个结果的相对偏差，%；
- RLU_{C1} —— 单点校准重复测定的第 1 次测定结果；
- RLU_{C2} —— 单点校准重复测定的第 2 次测定结果。

5.8.4 试样测定

试样测定步骤如下：

- 1) 确认微量移液器调至 100 μL 。
- 2) 将测光管插入光度计孔槽内，盖上遮光盖，按下测量键，读取测光管本底 RLU_0 ，若 $\text{RLU}_0 > 10$ ，应更换测光管或采取措施降低 RLU_0 。
- 3) 取出测光管，插入测光管架内。
- 4) 拧紧试样 ATP 保存液瓶盖，轻柔地上下颠倒混合至少 5 次，充分混匀后打开瓶盖，在 100 μL 微量移液器上装上吸头，准确移取 100 μL 试样至测光管底部，盖上瓶盖，弃去微量移液器吸头。
- 5) 拧紧荧光素-荧光素酶试剂瓶盖，轻柔地上下颠倒混合至少 5 次，充分混匀后打开瓶盖。
- 6) 更换微量移液器吸头，准确移取 100 μL 荧光素-荧光素酶试剂至已加过试样的测光管中，轻柔地振摇测光管 5 次，插入光度计孔槽内，盖上遮光盖，按下测量键，读取并记录试样测定结果 RLU_{S1} ；立即将此测光管取出，再次轻柔地振摇 5 次，插入光度计孔槽内，盖上遮光盖，按下测量键，读取并记录试样测定结果 RLU_{S2} ；此步骤的 2 次重复测定应在 1 min 内完成。
- 7) 盖上荧光素-荧光素酶试剂瓶盖，弃去微量移液器吸头，弃去测光管，盖上遮光盖。
- 8) 当 RLU_{S1} 和 RLU_{S2} 均 ≤ 100 时，根据方法研究测定结果，重复测定的极差 R_S 范围为 0~10，因此要求 R_S 应 ≤ 20 ， R_S 按照公式（2）计算；当 RLU_{S1} 和 RLU_{S2} 中至少有一个值 > 100 时，根据方法研究测定结果， RLU_{S1} 和 RLU_{S2} 的相对偏差 R_{VS} 范围为 0.24%~6.7%，因此要求 R_{VS} 应 $\leq 10\%$ ；否则，应查找原因并重新进行试样测定， R_{VS} 按照公式（3）计算。

$$R_S = |\text{RLU}_{S1} - \text{RLU}_{S2}| \quad (2)$$

$$R_{VS} = \frac{|\text{RLU}_{S1} - \text{RLU}_{S2}|}{\text{RLU}_{S1} + \text{RLU}_{S2}} \times 100\% \quad (3)$$

式中：

- R_S —— 试样重复测定 2 个结果之差的绝对值；
 R_{VS} —— 试样重复测定 2 个结果的相对偏差，%；
 RLU_{S1} —— 试样重复测定的第 1 次测定结果；
 RLU_{S2} —— 试样重复测定的第 2 次测定结果。

5.8.5 空白试样测定

以无菌水替代试样，重复步骤 5.8.4。将各类样品作为空白试样进行测定，其 ATP 测定结果均小于方法检出限。

表 6. 空白试样测定结果

样品类型	RLU_{S1}	RLU_{S2}	极差 R_S	ATP 浓度 (pg/mL)	与方法检出限比较
市售矿泉水	6	17	11	0.119	<方法检出限
市售纯净水	8	7	1	0.078	<方法检出限
超纯水	9	5	4	0.073	<方法检出限
无菌水	1	2	1	0.004	<方法检出限
出厂水	9	8	1	0.020	<方法检出限

5.9 结果计算与表示

样品中 ATP 的质量浓度 ρ (pg/mL)，按照公式 (4) 计算：

$$\rho = \frac{RLU_{S1} + RLU_{S2}}{RLU_{C1} + RLU_{C2}} \times \frac{1000 \times 10 \times f}{V} \tag{4}$$

式中：

- ρ —— 样品中微生物 ATP 的浓度，反映活性微生物的含量，pg/mL；
- RLU_{S1} —— 试样重复测定的第 1 次测定结果；
- RLU_{S2} —— 试样重复测定的第 2 次测定结果；
- RLU_{C1} —— 单点校准重复测定的第 1 次测定结果；
- RLU_{C2} —— 单点校准重复测定的第 2 次测定结果；
- 1000 —— 单点校准标液的浓度，pg/mL；
- 10 —— ATP 保存液体积，mL；
- f —— 样品稀释倍数；
- V —— 样品过滤体积，mL。

5.10 方法检出限和测定下限

选择预估 ATP 浓度接近方法检出限且 ATP 浓度<1 pg/mL 的实际样品，按照分析步骤制备试样，样品过滤体积为 50 mL，对试样进行 7 次重复测定，按照公式 (5) 计算方法检出限 MDL，以 4 倍方法检出限作为测定下限，根据光度计最小示值（1 RLU）计算仪器检出限（表 7）。

$$MDL = t_{(n-1,0.99)} \times S \tag{5}$$

式中：

- MDL —— 方法检出限；
- $t_{(n-1,0.99)}$ —— 置信度为 99%、自由度为 $n-1$ 时的 t 值， $t_{(6,0.99)} = 3.143$ ；
- n —— 重复分析的样品数， $n = 7$ ；
- S —— 标准偏差。

表 7. 方法精密度

试样重复测定 编号	重复测定结果 (pg/mL)	特征参数	计算结果
样品性质	管网水	平均值 $\bar{x}$ (pg/mL)	0.396
1	0.458	极差 R_s (pg/mL)	0.106
2	0.364	标准偏差 S_i (pg/mL)	0.045
3	0.384	t 值	3.143
4	0.384	仪器检出限 (pg/mL)	0.009
5	0.355	计算的方法检出限 (pg/mL)	0.141
6	0.364	方法检出限 (pg/mL)	0.15
7	0.462	测定下限 (pg/mL)	0.60

5.11 精密度和准确度

对 ATP 极低浓度（ATP<1 pg/mL）、低浓度（1 pg/mL≤ATP<10 pg/mL）、中浓度（10 pg/mL≤ATP<100 pg/mL）和高浓度（ATP≥100 pg/mL）的样品按照分析步骤制备试样，

样品体积为 50 mL，对试样进行 5 次重复测定，计算 5 次重复测定的平均值 $\bar{x}$ 、标准偏差 S_i 和相对标准偏差 RSD（表 8）。

表 8. 方法精密度

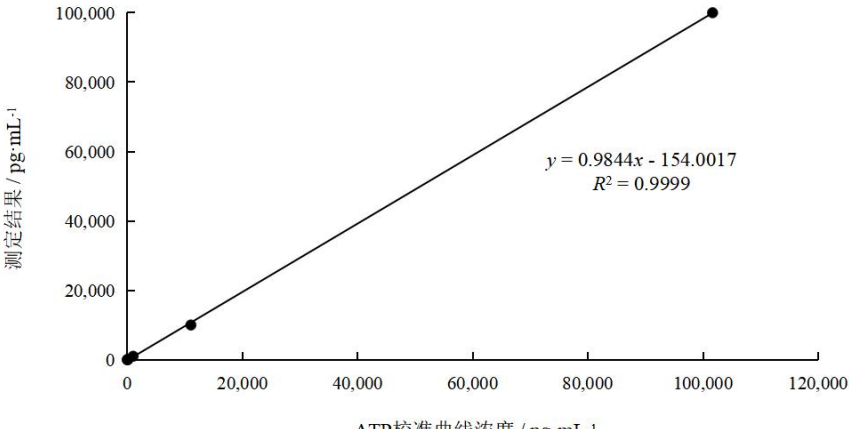
浓度范围		极低浓度	低浓度	中浓度	高浓度
试样重复测定编号	1	0.458	9.51	21.0	167
	2	0.364	7.05	19.4	152
	3	0.384	8.87	19.2	166
	4	0.384	7.95	18.7	147
	5	0.355	10.38	19.5	160
平均值 $\bar{x}_i$ (pg/mL)		0.389	8.75	19.6	158
标准偏差 S_i (pg/mL)		0.04	1.3	0.86	8.8
相对标准偏差 RSD (%)		10.4	14.9	4.4	5.6
极差 R_S (pg/mL)		0.102	—	—	—

5.12 正确度

对 ATP 浓度为 0 pg/mL、10 pg/mL、100 pg/mL、1000 pg/mL、10000 pg/mL 和 100000 pg/mL 的校准曲线标液进行测定，计算相对误差 RE_i；绘制校准曲线，计算回归方程和相关系数 r （见表 9）。

表 9. 相对误差、回归方程和相关系数

标准系列编号	标准系列浓度 (pg/mL)	测定结果 (pg/mL)	相对误差 (%)
1	0	0	—
2	10	10.1	100.7
3	100	98.4	98.4
4	1000	1000	100.0
5	10000	11036	110.4
6	100000	101663	101.7
回归方程	$y = 0.9844x - 154.0017$		
相关系数 r	$r = 0.9999$		



选择 ATP 极低浓度样品（ATP<1 pg/mL）、低浓度样品（1 pg/mL≤ATP<10 pg/mL）和高浓度样品（ATP>100 pg/mL），采用 1:1 加标方式（500 μL 试样+500μL 浓度为 1000 pg/mL 的单点校准标液）开展试样加标实验，计算加标回收率（见表 10）。

表 10. 加标回收率

样品序号	样品类型	样品 ATP 浓度 (pg/mL)	加标回收率 (%)
1	出厂水	0.357	119.2%
2	进厂原水	15.5	114.5%
3	炭滤池反冲洗水	171.9	108.3%

6 方法验证

6.1 方法验证方案

6.1.1 方法验证实验室和验证人员

编制组组织 5 家自来水公司所属水质检验实验室进行方法验证（见表 11），5 家验证单位均具有专业水质分析实验室和专业检测技术人员，参与方法验证的实验室分别是：天津泰达水业有限公司（具备 CMA 资质）、上海青浦自来水有限公司、上海市松江自来水有限公司、上海市自来水奉贤有限公司和沈阳水务水质检测技术发展有限公司（具备 CMA 资质）。

表 11. 验证实验室及人员情况汇总表

编号	验证单位 验证实验室	姓名	性别	年龄	职称	所学专业	相关分析 工作年限
1	天津泰达水业有限公司	李晨	女	54	高级工程师	环境工程	25 年
		张建柱	男	42	高级工程师	环境工程	20 年
		张怡然	女	36	高级工程师	环境工程	9 年
		陈卓然	女	29	中级工程师	环境工程	6 年
2	上海青浦自来水有限公司	张叶	女	46	中级工程师	行政管理	20 年
		潘旭康	男	39	中级工程师	高分子材料	15 年
		施胜利	男	30	检验工 3 级	应用化学	7 年
3	上海市松江自来水有限公司	何璐晨	男	36	技术员	行政管理	9 年
		庄李清	男	34	中级工程师	机械设计制造及自动化	3 年
4	上海市自来水奉贤有限公司	陆彬斌	男	36	中级工程师	电气工程自动化	13 年
		张龙	男	35	中级工程师	机械设计制造自动化	13 年
		秦钰芬	女	28	助理工程师	材料化学	7 年
5	沈阳水务水质检测技术发展有限公司	张琦	女	38	中级工程师	环境微生物	14 年
		王舒	女	39	中级工程师	环境工程	13 年
		王超群	女	36	中级工程师	生物物理学	5 年
		白杰	女	32	助理工程师	化学工程与工艺	9 年

主要使用的仪器为光度计，试剂为裂解液、固定液、荧光素-荧光素酶和荧光素-荧光素酶缓冲液，标准物质为单点校准标液和曲线标准标液（见表 12）。

表 12. 主要使用仪器和试剂

序号	仪器和试剂名称	型号
1	光度计	TX1315/PBM-TF
2	裂解液	UltraLyse™ 7
3	固定液	UltraLute™

4	荧光素-荧光素酶	Luminase™ Enzyme
5	荧光素-荧光素酶缓冲液	Luminase™ Buffer
6	单点校准标液	UltraCheck™ 1
7	校准曲线标液	UltraCheck™ 0.01、UltraCheck™ 0.1、UltraCheck™ 1、 UltraCheck™ 10、UltraCheck™ 100

6.1.2 验证方案

6.1.2.1 方法检出限和测定下限

选择预估 ATP 浓度接近方法检出限且 ATP 浓度 < 1 pg/mL 的实际样品（如出厂水、管网水和经消毒的水样等样品），按照分析步骤操作制备试样，样品过滤体积为 50 mL，对试样进行 7 次重复测定，按照公式（2）计算方法检出限 MDL，以 4 倍方法检出限作为测定下限，根据光度计最小示值（1 RLU）计算仪器检出限（表 7）。

$$MDL = t_{(n-1,0.99)} \times S \quad (2)$$

式中：

MDL —— 方法检出限；

$t_{(n-1,0.99)}$ —— 置信度为 99%、自由度为 $n-1$ 时的 t 值， $t_{(6,0.99)} = 3.143$ ；

n —— 重复分析的样品数， $n = 7$ ；

S —— 标准偏差。

6.1.2.2 精密度验证

根据样品 ATP 浓度范围将样品分为 4 种范围类型：极低浓度（ATP < 1 pg/mL）样品可选择出厂水、管网水、经消毒的水等，低浓度（1 pg/mL ≤ ATP < 10 pg/mL）样品可选择沉淀池出水、砂滤池出水和炭滤池出水等，中浓度（10 pg/mL ≤ ATP < 100 pg/mL）样品可选择进厂原水、前臭氧接触池出水和反冲洗水预浓缩池上清液等，高浓度（ATP ≥ 100 pg/mL）样品可选择砂滤池反冲洗水、炭滤池反冲洗水和地标水等。验证实验室至少选择上述 3 种浓度的样品按照分析步骤制备试样，样品体积原则上为 50 mL，对试样进行 5 次重复测定，计算 5 次重复测定的平均值 $\bar{x}_i$ 、标准偏差 S_i 和相对标准偏差 RSD。

6.1.2.3 正确度验证

对 ATP 浓度为 0 pg/mL、10 pg/mL、100 pg/mL、1000 pg/mL、10000 pg/mL 和 100000 pg/mL 的校准曲线标液进行测定，计算相对误差 RE_i；绘制校准曲线，计算回归方程和相关系数 r （见表 9）。

6.2 方法验证过程及结论

6.2.1 方法验证工作主要过程

2023 年 7 月～2024 年 1 月，编制组邀请了 5 家城镇供水行业相关实验室，分析人员按照统一的方法验证方案进行方法的验证准备，明确方法验证要求，确定方法验证完成时限。开展方法验证前，参与验证的操作人员均熟悉和掌握了方法原理、操作步骤及流程，方法验证过程中所用的试剂和材料、仪器和设备及分析步骤符合方法相关要求。

6.2.2 方法验证数据统计

经 5 家实验室验证，方法精密度、正确度等主要方法指标的统计结果能满足方法特性指标要求。详细结果见附件一《方法验证报告》。

6.2.3 方法验证结论

6.2.3.1 检出限最终结果

5家验证实验室测定ATP的方法检出限最大值为0.17 pg/mL, 测定下限为0.68 pg/mL, 根据最终方法检出限取各验证实验室最大值的规定, 本标准拟规定: 当制备试样的样品体积为50 mL时, 方法检出限为0.17 pg/mL, 测定下限为0.68 pg/mL。

6.2.3.2 精密度最终结果

5家验证实验室分别对ATP极低浓度($\text{ATP} < 1 \text{ pg/mL}$)、低浓度($1 \text{ pg/mL} \leq \text{ATP} < 10 \text{ pg/mL}$)、中浓度($10 \text{ pg/mL} \leq \text{ATP} < 100 \text{ pg/mL}$)和高浓度($\text{ATP} \geq 100 \text{ pg/mL}$)样品, 按照分析步骤制备试样, 对试样进行5次重复测定: ATP极低浓度的最大标准偏差为0.061 pg/mL, 最大极差为0.125 pg/mL, 均小于方法检出限0.17 pg/mL, 相对标准偏差范围为4.0%~16.9%; ATP低浓度样品的相对标准偏差范围为1.5%~10.7%; ATP中浓度样品的相对标准偏差范围为2.2%~15.3%; ATP高浓度样品的相对标准偏差范围为0.60%~17.5%; 总体相对标准偏差范围为0.60%~17.5%。

6.2.3.3 正确度最终结果

5家验证实验室分别对ATP浓度为10 pg/mL、100 pg/mL、1000 pg/mL、10000 pg/mL和100000 pg/mL的校准曲线标液进行测定, 相对误差范围分别为: 0.40%~8.6%、-1.2%~4.6%、-1.4%~4.0%、-1.7%~4.0%和-5.7%~1.9%, 总体相对误差范围为: -5.7%~8.6%。5家验证实验室分别使用上述浓度梯度的标准物质绘制校准曲线, 相关系数 r 的范围为0.9999~1.0000。本标准拟规定: 定期使用校准曲线标液绘制校准曲线以评估光度计性能, 浓度系列为0 pg/mL、10 pg/mL、100 pg/mL、1000 pg/mL、10000 pg/mL和100000 pg/mL, 校准曲线的相关系数 r 应 ≥ 0.99 。

5家验证实验室分别对ATP极低浓度、低浓度和高浓度样品进行试样加标实验, 加标回收率范围分别为117.0%~117.4%、120.4%~125.4%和105.7%~125.4%, 总体加标回收率范围为105.7%~125.4%。本标准拟规定: 加标回收率应控制在90%~130%之间。

6.2.3.4 空白试验最终结果

对无菌水、市售瓶装水、超纯水、部分出厂水作为空白试样测定后, ATP浓度均 $<$ 方法检出限, 结合1瓶荧光素-荧光素酶试剂可测定约20次的情况, 本标准拟规定: 每批(或20个)样品应对1个空白试样进行全程序空白实验, 测定结果应 $<$ 方法检出限。

6.2.3.5 单点校准最终结果

5家验证实验室所使用的测光管本底 RLU_0 均 <10 , 结合ASTM D4012—2023a中对本底测定 <20 的要求, 本标准拟规定: 测光管本底 $\text{RLU}_0 \leq 10$ 。

5家验证实验室单点校准 RLU_{C1} 和 RLU_{C2} 结果均 ≥ 5000 , 相对偏差 R_{VC} 范围为0.05%~3.5%, 结合ASTM D4012—2023a中对单点校准结果 ≥ 5000 的要求, 本标准拟规定: RLU_{C1} 和 RLU_{C2} 必须均 ≥ 5000 , 且 RLU_{C1} 和 RLU_{C2} 的相对偏差 R_{VC} 应 $\leq 5\%$ 。

6.2.3.6 试样重复测定最终结果

5家验证实验室试样重复测定, 当 RLU_{S1} 和 RLU_{S2} 均 ≤ 100 时, 2次重复测定极差 R_S 均 <20 ; 当 RLU_{S1} 和 RLU_{S2} 中至少有一个值 >100 时, 相对偏差 R_{VS} 范围为0.04%~5.8%。因此, 本标准拟规定: 当 RLU_{S1} 和 RLU_{S2} 均 ≤ 100 时, 重复测定极差 R_S 应 <20 ; 当 RLU_{S1} 和 RLU_{S2} 中至少有一个值 >100 时, RLU_{S1} 和 RLU_{S2} 的相对偏差 R_{VS} 应 $\leq 10\%$ 。

6.2.3.7 根据各验证实验室提出的对方法的各种意见, 考虑是否对方法进行改进及理由

各验证实验室均按照验证方案要求完成方法验证工作, 未提出改进建议。

7 与开题报告的差异说明

本标准名称由《水中微生物含量的测定 三磷酸腺苷（ATP）生物发光法》调整为《水中微生物三磷酸腺苷（ATP）的测定 生物发光法》，验证实验室由开题时的 3 家增加至 5 家。

8 参考文献

- [1] 上海市人民政府. 上海市城市总体规划（2017-2035 年）报告[R/OL. (2018-01-17) [2020-12-18]. <https://www.shanghai.gov.cn/newshanghai/xxgkfj/2035001.pdf>.
- [2] 住房和城乡建设部办公厅, 国家发展改革委办公厅, 国家疾病预防控制中心综合司. 关于加强城市供水安全保障工作的通知[N/OL. (2022-09-13) [2024-1-23]. https://www.mohurd.gov.cn/gongkai/fdzdgknr/zfhcxjsbwj/202209/20220909_767959.html.
- [3] 生活饮用水卫生标准: GB 5749—2022 [S].
- [4] 生活饮用水标准检验方法 第 12 部分: 微生物指标: GB/T 5750.12—2023[S].
- [5] 蒋增辉. 新型冠状病毒疫情下饮用水生物安全的分析与对策[J]. 净水技术, 2020,39(5).
- [6] McElroy, W.D. Crystalline firefly luciferase: $\text{LH}_2 + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{LH}_2 + \text{AMP} + \text{PP}_i$ $\text{LH}_2 + \text{AMP} + \text{O}_2 \rightarrow \text{L-AMP} + \text{light} + \text{H}_2\text{O}$ [J]. *Methods in Enzymology*, 1963(6).
- [7] Favere J, Waegenaar F, Boon N, et al. Online microbial monitoring of drinking water: How do different techniques respond to contaminations in practice?[J]. *Water Research*, 2021, 202(12).
- [8] Katherine E, Greenstein, Eric C, et al. Using rapid quantification of adenosine triphosphate (ATP) as an indicator for early detection and treatment of cyanobacterial blooms[J]. *Water research*, 2019.
- [9] Frederik, Hammes, Petra, et al. Flow cytometry and adenosine tri-phosphate analysis: Alternative possibilities to evaluate major bacteriological changes in drinking water treatment and distribution systems[J]. *Water research: A journal of the international water association*, 2012, 46(15).
- [10] De Vera G A, Wert E C. Using discrete and online ATP measurements to evaluate regrowth potential following ozonation and (non) biological drinking water treatment[J]. *Water Research*, 2019, 154(May. 1).
- [11] Lautenschlager K, Hwang C, Ling F, et al. Abundance and composition of indigenous bacterial communities in a multi-step biofiltration-based drinking water treatment plant[J]. *Water Research*, 2014, 62(Oct.1).
- [12] Paul W.J.J. van der Widen, Kooij D V D . Effect of water composition, distance and season on the adenosine triphosphate concentration in unchlorinated drinking water in the Netherlands[J]. *Water Research*, 2010, 44(17).
- [13] Lee Y, Imminger S, Czekalski N, et al. Inactivation efficiency of *Escherichia coli* and autochthonous bacteria during ozonation of municipal wastewater effluents quantified with flow cytometry and adenosine tri-phosphate analyses[J]. *Water Research*, 2016, 101(Sep.15).
- [14] Li, Q, Yu, T, et al. Development of an ATP luminescence-based method for assimilable organic carbon determination in reclaimed water [J]. *Water Research*, 2017.
- [15] Standard test method for adenosine triphosphate (ATP) content of microorganisms in water: ASTM D4012—15[S].
- [16] Standard test method for adenosine triphosphate (ATP) content of microorganisms in water: ASTM D4012—23a[S].

- [17] 邱颖, 邱贺民, 李玉婵, 等. ATP 发光技术快速检测饮用水中菌落总数[J]. 实用预防医学, 2011, 18(02).
- [18] 高红阁, 彭芳, 俞玲玲, 等. ATP 生物发光法在快速检测饮用水菌落总数中的应用[J]. 职业与健康, 2014, 30(10).
- [19] 张寒, 周珉, 张利华, 等. ATP 技术用于工业水厂微生物监测的研究[J]. 环境科学导刊, 2015, 34(05).
- [20] 赵苏阳, 李艳军, 钱小燕, 等. 空间站水循环处理系统中微生物的检测技术[J]. 航天器环境工程, 2015, 32(02).
- [21] 王惠荣, 池勇志, 辛丽花, 等. ATP 生物发光法在饮用水和再生水活菌生物量快速检测中的应用[J]. 给水排水, 2016, 52(04).
- [22] 曾滔, 许宝华, 高文静, 等. ATP 生物荧光技术在口腔治疗用水污染状况现场快速检测中的应用初探[J]. 中国卫生监督杂志, 2016, 23(05).
- [23] 苏静, 王佳奇, 沈瑾, 等. 牙科综合治疗台出水端水质调查及检测方法[J]. 中国消毒学杂志, 2016, 33(01).
- [24] 许萍, 习伟进, 张晋童, 等. ATP 法测水中细菌数目效果评价及预警限值研究[J]. 工业安全与环保, 2018, 44(03).
- [25] 徐明明, 周海刚, 董晓通, 等. ATP 生物发光检测法在油田采出水中的应用[C]. 第二届全国缓蚀剂学术讨论会论文集, 2018.
- [26] 沈春玲. 不同季节山区饮用水处理系统微生物多样性和时空分布特征[J]. 甘肃科学学报, 2019, 31(04).
- [27] 王秋华, 许元龙, 王璐璐, 等. 水中细菌 ATP 荧光检测影响因素实验研究[J]. 应用化, 2021, 50(09).
- [28] 杨石红, 赵益杰, 宋飞, 等. ATP 检测技术在自来水处理中的应用[J]. 供水技术, 2022, 16(03).
- [29] 孙坚伟. 基于 ATP 生物荧光法的供水系统生物安全评估[J]. 净水技术, 2022, 41(09).
- [30] 铁路食(饮)具洁净度 ATP 生物发光检测法和分级判定: TB/T 3121—2005[S].
- [31] 食品接触表面清洗消毒效果试验方法 三磷酸腺苷生物发光法: GB/T 36004—2018[S].
- [32] 餐(饮)具及公共用品用具表面 ATP 含量的测定和限值要求: T/CAQI 220—2021[S].
- [33] 食品接触表面清洁效果评价 ATP 监测及限值要求: T/CCA 029—2022[S].
- [34] 医疗机构环境表面清洁度 ATP 生物荧光现场评价与检测方法: DB31/T 1070—2017[S].
- [35] 医疗机构物体表面洁净度 ATP 生物荧光检测规范: DB32/T 3422—2018[S].
- [36] 医疗机构物体表面清洗效果现场快速检测-ATP 生物荧光法: DB42/T 1412—2018[S].
- [37] 标准化工作导则 第 1 部分: 标准化文件的结构和起草规则: GB/T 1.1—2020[S].
- [38] 环境监测分析方法标准制定技术导则: HJ 168—2020[S].

方法验证报告

方法名称：水中微生物三磷酸腺苷（ATP）的测定 生物发光法

项 目 承 担 单 位 ： 上海浦东水务（集团）有限公司
东方国际集团上海环境科技有限公司
上海南汇自来水有限公司

验 证 单 位 ： 天津泰达水业有限公司
上海青浦自来水有限公司
上海市松江自来水有限公司
上海市自来水奉贤有限公司
沈阳水务水质检测技术发展有限公司

项 目 负 责 人 及 职 称 ： 李梅（高级工程师）

通 讯 地 址 ： 上海市浦东新区沪南路9800号

报 告 编 写 人 及 职 称 ： 蒋增辉（正高级工程师）

报 告 日 期 ： 2024年1月25日

1 数据汇总

1.1 验证实验室基本情况

选择了 5 家城镇供水行业专业实验室作为验证实验室进行方法验证,验证实验室及人员基本情况见附表 1,主要仪器和试剂情况见附表 2。其中,验证实验室编号 1 为天津泰达水业有限公司(具备 CMA 资质),编号 2 为上海青浦自来水有限公司,编号 3 为上海市松江自来水有限公司,编号 4 为上海市自来水奉贤有限公司,编号 5 为沈阳水务水质检测技术发展有限公司(具备 CMA 资质)。(以下编号同)

附表 1. 验证实验室及人员情况汇总表

编号	验证单位	姓名	性别	年龄	职称	所学专业	相关分析工作年限
1	天津泰达水业有限公司	李晨	女	54	高级工程师	环境工程	25 年
		张建柱	男	42	高级工程师	环境工程	20 年
		张怡然	女	36	高级工程师	环境工程	9 年
		陈卓然	女	29	中级工程师	环境工程	6 年
2	上海青浦自来水有限公司	张叶	女	46	中级工程师	行政管理	20 年
		潘旭康	男	39	中级工程师	高分子材料	15 年
		施胜利	男	30	检验工 3 级	应用化学	7 年
3	上海市松江自来水有限公司	何璐晨	男	36	技术员	行政管理	9 年
		庄李清	男	34	中级工程师	机械设计制造及自动化	3 年
4	上海市自来水奉贤有限公司	陆彬斌	男	36	中级工程师	电气工程自动化	13 年
		张龙	男	35	中级工程师	机械设计制造自动化	13 年
		秦钰芬	女	28	助理工程师	材料化学	7 年
5	沈阳水务水质检测技术发展有限公司	张琦	女	38	中级工程师	环境微生物	14 年
		王舒	女	39	中级工程师	环境工程	13 年
		王超群	女	36	中级工程师	生物物理学	5 年
		白杰	女	32	助理工程师	化学工程与工艺	9 年

附表 2. 主要仪器和试剂情况汇总表

仪器和试剂名称	型号(规格)	产品编号	用途(浓度)
光度计	TX1315/PBM-TF(套)	PBM 13281/PM 13422	荧光测定
光度计	TX1315/PBM-TF(套)	PBM 13078/PM 13634	荧光测定
裂解液	UltraLyse™ 7 (125 mL)	UL7-453、UL7-465、UL7-480、 UL7-481、UL7-483、UL7-470、 LC-522	破坏细胞结构释放胞内 ATP
固定液	UltraLute™ (9 mL)	ULu-954-c、ULu-1049-F、 ULu-1050-B	稀释提取液,固定和保存 ATP
荧光素-荧光素酶	Luminase™ Enzyme	Lu-760、Lu-784、Lu-785、 Lu-791、Lu-799、Lu-995	与 ATP 反应
荧光素-荧光素酶缓冲液	Luminase™ Buffer	ULu-1045、ULu-1026、 ULu-1028、ULu-1029、 ULu-1030	与 ATP 反应

单点校准标液	UltraCheck™ 1 (2.5 mL)	UC1-55g、UC1-56d、UC1-57g、 UC1-59a、UC1-59e、UC1-58b	单点校准标准物质 (1000 pg/mL)
校准曲线标液	UltraCheck™ 0.01 (2.5 mL)	UC0.01-56b、UC0.01-57e	校准曲线标准物质 (10 pg/mL、100 pg/mL、1000 pg/mL、 10000 pg/mL、100000 pg/mL)
	UltraCheck™ 0.1 (2.5 mL)	UC0.1-56b、UC0.1-57e	
	UltraCheck™ 1 (2.5 mL)	UC1-56b、UC1-57e	
	UltraCheck™ 10 (2.5 mL)	UC10-56b、UC10-57e	
	UltraCheck™ 100 (2.5 mL)	UC100-56b、UC100-57e	

1.2 方法检出限、测定下限数据汇总

各验证实验室选择预估 ATP 浓度接近方法检出限且 ATP 浓度 < 1 pg/mL 的实际样品，按照分析步骤制备试样，样品过滤体积为 50 mL，对试样进行 7 次重复测定，计算方法检出限 MDL，以 4 倍方法检出限作为测定下限，根据光度计最小示值（1 RLU）计算仪器检出限，数据汇总见附表 3。

附表 3. 方法检出限、测定下限和仪器检出限数据汇总表

试样重复测定编号		验证实验室编号				
		1	2	3	4	5
ATP 测定结果 (pg/mL)	1	0.121	0.284	0.220	0.547	0.315
	2	0.115	0.304	0.254	0.571	0.248
	3	0.115	0.284	0.254	0.552	0.248
	4	0.205	0.311	0.215	0.605	0.253
	5	0.097	0.307	0.225	0.649	0.219
	6	0.230	0.302	0.278	0.629	0.238
	7	0.181	0.244	0.259	0.561	0.234
平均值 $\bar{x}_i$ (pg/mL)		0.152	0.291	0.244	0.588	0.251
极差 R_s (pg/mL)		0.133	0.027	0.063	0.102	0.095
标准偏差 S_i (pg/mL)		0.052	0.023	0.024	0.040	0.030
t 值		3.143	3.143	3.143	3.143	3.143
仪器检出限 (pg/mL)		0.010	0.009	0.010	0.010	0.010
计算的方法检出限 (pg/mL)		0.165	0.073	0.074	0.126	0.096
方法检出限 MDL (pg/mL)		0.17	0.08	0.08	0.13	0.10
测定下限 (pg/mL)		0.68	0.32	0.32	0.52	0.40

检出限测试数据中，当样品体积为 50 mL 时，ATP 的检出限为 0.08 pg/mL~0.17 pg/mL，测定下限为 0.32 pg/mL~0.68 pg/mL。

1.3 方法精密度数据汇总

各验证实验室对 ATP 极低浓度（ATP < 1 pg/mL）、低浓度（1 pg/mL ≤ ATP < 10 pg/mL）、中浓度（10 pg/mL ≤ ATP < 100 pg/mL）和高浓度（ATP ≥ 100 pg/mL）中至少 3 个浓度的样品按照分析步骤制备试样，样品体积原则上为 50 mL，对试样进行 5 次重复测定，计算 5 次重复测定的平均值 $\bar{x}$ 、标准偏差 S_i 和相对标准偏差 RSD，数据汇总见附表 4~表 7。

附表 4. 极低浓度样品精密度数据汇总表

试样重复测定编号	验证实验室编号					
	1	1	2	3	4	5

测定结果 x_i (pg/mL)	浓度范围	ATP<1						
	1	0.497	0.507	0.284	0.220	0.547	0.315	0.155
	2	0.493	0.466	0.304	0.254	0.571	0.248	0.141
	3	0.424	0.513	0.284	0.254	0.552	0.248	0.126
	4	0.376	0.507	0.311	0.215	0.605	0.243	0.112
	5	0.372	0.483	0.307	0.225	0.649	0.219	0.102
平均值 $\bar{x}_i$ (pg/mL)		0.432	0.495	0.298	0.234	0.585	0.255	0.127
标准偏差 S_i (pg/mL)		0.061	0.020	0.013	0.019	0.042	0.036	0.022
相对标准偏差 RSD (%)		14.0	4.0	4.4	8.1	7.3	14.1	16.9
极差 R_S (pg/mL)		0.125	0.047	0.027	0.039	0.102	0.096	0.053

附表 5. 低浓度样品精密度数据汇总表

试样重复测定编号		验证实验室编号					
		1	2	3	4	5	5
测定结果 x_i (pg/mL)	浓度范围	$1 \leq \text{ATP} < 10$					
	1	7.83	5.38	5.64	2.73	3.77	5.17
	2	6.18	5.10	5.98	2.68	3.61	5.07
	3	7.41	4.94	5.85	2.67	3.62	5.04
	4	7.16	6.28	5.52	2.77	3.61	5.22
	5	7.97	6.08	5.49	2.80	3.54	5.20
平均值 $\bar{x}_i$ (pg/mL)		7.31	5.56	5.69	2.73	3.63	5.14
标准偏差 S_i (pg/mL)		0.71	0.60	0.21	0.06	0.09	0.08
相对标准偏差 RSD (%)		9.7	10.7	3.7	2.1	2.3	1.5

附表 6. 中浓度样品精密度数据汇总表

试样重复测定编号		验证实验室编号					
		1	1	2	3	4	4
测定结果 x_i (pg/mL)	浓度范围	$10 \leq \text{ATP} < 100$					
	1	17.9	57.8	23.9	20.0	45.6	17.9
	2	18.2	52.4	25.9	22.7	45.3	18.6
	3	20.3	73.8	24.4	21.3	43.4	17.8
	4	16.7	52.1	24.0	22.9	43.9	18.0
	5	21.6	56.0	23.0	22.3	45.2	18.7
平均值 $\bar{x}_i$ (pg/mL)		18.9	58.4	24.2	21.8	44.7	18.2
标准偏差 S_i (pg/mL)		2.0	8.9	1.1	1.2	0.97	0.42
相对标准偏差 RSD (%)		10.4	15.3	4.4	5.5	2.2	2.3

附表 7. 高浓度样品精密度数据汇总表

试样重复测定编号		验证实验室编号								
		1	2	2	2	3	3	4	5	5
测定结果 x_i (pg/mL)	浓度范围	$\text{ATP} \geq 100$								
	1	430.3	131.0	530.5	890.5	1194	142.8	380.3	135.2	109.7
	2	319.6	138.8	532.0	1026	1222	152.8	358.9	136.6	112.3
	3	440.0	133.3	519.3	895.0	1414	145.1	385.5	136.1	107.7

	4	461.9	144.8	467.8	849.9	1181	147.2	384.1	136.7	113.2	250.8
	5	319.8	138.7	550.4	823.5	1200	154.6	373.9	134.9	117.8	229.0
平均值 $\bar{x}_i$ (pg/mL)		394.3	137.3	520.0	897.0	1242	148.5	376.5	135.9	112.1	238.8
标准偏差 S_i (pg/mL)		69.1	5.4	31.2	78.0	97.2	5.0	10.8	0.82	3.8	8.0
相对标准偏差 RSD (%)		17.5	3.9	6.0	8.7	7.8	3.4	2.9	0.60	3.4	3.3

试样精密度数据中，ATP 极低浓度样品（ATP<1 pg/mL）的标准偏差为 0.013 pg/mL~0.061 pg/mL，相对标准偏差为 4.0 %~16.9 %，极差为 0.027 pg/mL~0.125 pg/mL；低浓度样品（1 pg/mL≤ATP<10 pg/mL）的标准偏差为 0.06 pg/mL~0.71 pg/mL，相对标准偏差为 1.5 %~10.7 %；中浓度样品（10 pg/mL≤ATP<100 pg/mL）的标准偏差为 0.42 pg/mL~8.9 pg/mL，相对标准偏差为 2.2 %~15.3 %；高浓度样品（ATP≥100 pg/mL）的标准偏差为 3.8 pg/mL~97.2 pg/mL，相对标准偏差为 0.60%~17.5%。

1.4 方法正确度数据汇总

1.4.1 校准曲线标液正确度数据汇总

各验证实验室对 ATP 浓度为 10 pg/mL、100 pg/mL、1000 pg/mL、10000 pg/mL 和 100000 pg/mL 的校准曲线标液中 5 个标准物质进行测定，计算相对误差 RE_i ，数据汇总见附表 8；绘制校准曲线，计算回归方程和相关系数 r ，数据汇总见附表 9。

附表 8. 正确度数据汇总表

ATP 标准 物质浓度 (pg/mL)	验证实验室编号									
	1		2		3		4		5	
	测定结果 (pg/mL)	相对 误差 RE_i (%)	测定结果 (pg/mL)	相对 误差 RE_i (%)	测定结果 (pg/mL)	相对 误差 RE_i (%)	测定结果 (pg/mL)	相对 误差 RE_i (%)	测定结果 (pg/mL)	相对 误差 RE_i (%)
10	10.86	8.6	10.65	6.5	10.04	0.40	10.31	3.1	10.52	5.2
100	100.5	0.50	101.9	1.9	98.8	-1.2	103.9	3.9	104.6	4.6
1000	986.5	-1.4	1040.0	4.0	1010.6	1.1	1008.9	0.89	1030.8	3.1
10000	10061.0	0.61	10396.2	4.0	10072.6	0.73	9832.4	-1.7	10330.8	3.3
100000	94339.0	-5.7	101904.1	1.9	96881.1	-3.1	96811.4	-3.2	97776.0	-2.2

附表 9. 校准曲线和相关系数数据汇总表

验证实验室编号	回归方程	相关系数 r	中间点浓度测定相对误差
1	$y = 1.0608x - 134.2580$	0.9999	3.4%
2	$y = 0.9816x - 41.9051$	1.0000	-2.7%
3	$y = 1.0327x - 83.1017$	1.0000	3.1%
4	$y = 1.0332x - 39.4601$	1.0000	3.2%
5	$y = 1.0235x - 117.7399$	0.9999	2.1%

校准曲线标液（标准物质）正确度数据中，ATP 浓度为 10 pg/mL 的标准物质的相对误差范围为 0.40%~8.6%，ATP 浓度为 100 pg/mL 的标准物质的相对误差范围为-1.2%~4.6%，ATP 浓度为 1000 pg/mL 的标准物质的相对误差范围为-1.4%~4.0%，ATP 浓度为 10000 pg/mL 的标准物质的相对误差范围为-1.7%~4.0%，ATP 浓度为 100000 pg/mL 的标准物质的相对误差范围为-5.7%~1.9%，总体相对误差范围为-5.7%~8.6%。校准曲线的相关系数范围为 0.9999~1.0000，根据回归方程计算中间点 50000 pg/mL 的 ATP 浓度结果的相对误差范围为

-2.7%~3.4%。

1.4.2 试样加标正确度数据汇总

选择 ATP 极低浓度样品（ATP<1 pg/mL）、低浓度样品（1 pg/mL≤ATP<10 pg/mL）和高浓度样品（ATP>100 pg/mL），采用 1:1 加标方式（500 μL 试样+500μL 浓度为 1000 pg/mL 的单点校准标液）开展试样加标实验，计算加标回收率，数据汇总见附表 10。

附表 10. 试样加标正确度数据汇总表

重复试样序号	样品浓度（pg/mL）	加标回收率 P （%）	平均加标回收率（%）
1-1	0.573	117.7	117.4
1-2		117.0	
2-1	2.13	120.4	122.9
2-2		125.4	
3-1	276.8	117.0	118.8
3-2		120.5	
4-1	335.1	105.7	106.8
4-2		107.9	

试样加标正确度数据中，ATP 极低浓度样品（ATP<1 pg/mL）的加标回收率范围为 117.0%~117.7%，低浓度样品（1 pg/mL≤ATP<10 pg/mL）的加标回收率范围为 120.4%~125.4%，高浓度样品（ATP>100 pg/mL）的加标回收率范围为 105.7%~120.5%。

1.5 空白实验数据汇总

对无菌水、市售瓶装水、超纯水和部分出厂水作为试样测定后，ATP 浓度均<方法检出限。分析步骤中所使用的测光管本底 RLU₀ 均<10。

1.6 单点校准数据汇总

各验证实验室在开展验证试验过程中对单点校准采用 2 次重复测定的方式，计算 2 次重复测定的相对偏差 R_{vc} ，数据汇总见附表 11。

附表 11. 单点校准重复测定数据汇总表

验证实验室 编号	1		2		3		4		5	
单点校准重 复测定序号	RLU	相对偏 差 R_{vc} （%）	RLU	相对偏 差 R_{vc} （%）	RLU	相对偏 差 R_{vc} （%）	RLU	相对偏 差 R_{vc} （%）	RLU	相对偏 差 R_{vc} （%）
1-1	19910	1.7	22315	1.3	17213	1.4	20630	0.07	21028	0.29
1-2	19243		21748		16744		20657		20905	
2-1	16724	1.1	22420	1.2	22135	2.4	21598	0.82	20814	1.1
2-2	16367		21895		21087		21247		20363	
3-1	23298	0.77	22740	1.1	20836	1.7	20649	0.05	21688	0.82
3-2	22940		22260		20133		20670		21336	
4-1	14798	0.08	21658	0.08	20836	1.7	18480	0.93	21448	1.5
4-2	14821		21691		20133		18827		20804	
5-1	17126	0.92	20783	1.1	19347	3.5	19464	1.1	19820	0.92

5-2	16813		20337		18044		19028		19457	
-----	-------	--	-------	--	-------	--	-------	--	-------	--

当单点校准 2 次重复测定的操作步骤控制在 1 min 内迅速完成时, 相对标准偏差 R_{vc} 范围为 0.05%~3.5%。

1.7 试样重复测定数据汇总

根据各验证实验室单点校准 RLU 来计算最接近方法检出限 (0.17 pg/mL) 的 RLU, 数据汇总见附表 12。

附表 12. 接近方法检出限的 RLU 数据汇总表

验证实验室编号	接近检出限的 RLU 值及对应 ATP 浓度计算结果	<检出限	>检出限
1	接近检出限的 RLU	19	20
	对应 ATP 浓度计算结果	0.164 pg/mL	0.173 pg/mL
2	接近检出限的 RLU	19	20
	对应 ATP 浓度计算结果	0.169 pg/mL	0.178 pg/mL
3	接近检出限的 RLU	18	19
	对应 ATP 浓度计算结果	0.167 pg/mL	0.176 pg/mL
4	接近检出限的 RLU	19	19
	对应 ATP 浓度计算结果	0.168 pg/mL	0.177 pg/mL
5	接近检出限的 RLU	18	19
	对应 ATP 浓度计算结果	0.167 pg/mL	0.176 pg/mL

对于 ATP 极低浓度样品和低浓度样品, 在进行试样重复测定时, 相对标准偏差 R_{vc} 不适合作为评价指标, 而极差 R_s 更适合作为评价指标, 根据各验证实验室单点校准 RLU 值计算最接近方法检出限 (0.17 pg/mL) 的 RLU 结果均 < 20。

对 5 家验证实验室重复测定 RLU_{S1} 和 RLU_{S2} 中至少有一个 > 100 时的测定结果计算相对偏差 R_{vs} , R_{vs} 范围为 0.04%~5.8%。

2 方法验证结论

2.1 检出限及测定下限

对《水中微生物三磷酸腺苷 (ATP) 的测定 生物发光法》中方法检出限测试数据进行汇总: 当样品体积为 50 mL 时, ATP 的方法检出限范围为 0.08 pg/mL~0.17 pg/mL, 测定下限范围为 0.32 pg/mL~0.68 pg/mL; 标准偏差范围为 0.023 pg/mL~0.052 pg/mL, 极差范围为 0.027 pg/mL~0.133 pg/mL, 均小于最大方法检出限 0.17 pg/mL; 根据最终检出限取各验证实验室最大值的规定, 本标准拟规定 ATP 的检出限为 0.17 pg/mL, 测定下限为 0.68 pg/mL。

2.2 精密度

5 家验证实验室分别对 ATP 极低浓度 ($ATP < 1$ pg/mL)、低浓度 (1 pg/mL $\leq$ $ATP < 10$ pg/mL)、中浓度 (10 pg/mL $\leq$ $ATP < 100$ pg/mL) 和高浓度 ($ATP \geq 100$ pg/mL) 样品, 按照分析步骤操备试样, 对试样进行 5 次重复测定, 计算精密度结果: 极低浓度的最大标准偏差为 0.061 pg/mL, 最大极差为 0.125 pg/mL, 均小于方法检出限 0.17 pg/mL, 相对标准偏差范围为 4.0%~16.9%; 低浓度样品的标准偏差范围为 0.06 pg/mL~0.71 pg/mL, 相对标准偏差范围为 1.5%~10.7%; 中浓度样品的标准偏差范围为 0.42 pg/mL~8.9 pg/mL, 相对标准偏差范围为 2.2%~15.3%; 高浓度样品的标准偏差范围为 3.8 pg/mL~97.2 pg/mL, 相对标准

偏差范围为 0.60%~17.5%；总体精密度相对标准偏差范围为 0.60%~17.5%。

2.3 正确度

5 家验证实验室分别对 ATP 浓度为 10 pg/mL、100 pg/mL、1000 pg/mL、10000 pg/mL 和 100000 pg/mL 的标准物质进行测定，相对误差范围分别为 0.40%~8.6%、-1.2%~4.6%、-1.4%~4.0%、-1.7%~4.0%和-5.7%~1.9%，总体相对误差范围为-5.7%~8.6%。5 家验证实验室分别使用上述浓度梯度的标准物质绘制校准曲线，相关系数 r 的范围为 0.9999~1.0000。

5 家验证实验室分别对 ATP 极低浓度、低浓度和高浓度样品进行试样加标实验，加标回收率范围分别为 117.0%~117.4%、120.4%~125.4%和 105.7%~125.4%，总体加标回收率范围为 105.7%~125.4%。

3 本标准主要方法指标的验证结论

通过对上述数据汇总分析，得到本标准主要方法指标的验证结论。

3.1 空白实验

本标准拟规定：每批（或 20 个）样品应对 1 个空白试样进行全程序空白实验，测定结果应 $\leq$ 方法检出限。

本标准拟规定：测光管本底 $RLU_0 \leq 10$ 。

3.2 单点校准

本标准拟规定：单点校准重复测定结果 RLU_{C1} 和 RLU_{C2} 均必须 ≥ 5000 ，且 RLU_{C1} 和 RLU_{C2} 的相对偏差 R_{VC} 应 $\leq 5\%$ 。

3.3 试样测定

本标准拟规定：当 RLU_{S1} 和 RLU_{S2} 均 ≤ 100 时，重复测定极差 R_S 应 ≤ 20 ；当 RLU_{S1} 和 RLU_{S2} 中至少有一个值 > 100 时， RLU_{S1} 和 RLU_{S2} 的相对偏差 R_{VS} 应 $\leq 10\%$ 。

3.4 正确度

本标准拟规定：试样加标回收率应控制在 90%~130%之间。

本标准拟规定：定期使用校准曲线标液绘制校准曲线以评估光度计性能，浓度系列为 0 pg/mL、10 pg/mL、100 pg/mL、1000 pg/mL、10000 pg/mL 和 100000 pg/mL，校准曲线的相关系数 r 应 ≥ 0.99 。

4 根据各验证实验室提出的对方法的各种意见，考虑是否对方法进行改进及理由

各验证实验室均按照验证方案要求完成方法验证工作，未提出改进建议。

团体标准征求意见反馈表

标准名称：水中微生物含量的测定 三磷酸腺苷（ATP）生物发光法

反馈人姓名：

单位：

反馈人职务、职称：

联系电话：

邮箱：

序号	标准章条编号及原文	修改建议	理由

备注：1.本表可复制 2.若无意见请填写“无”后反馈