ICS

CCS

河北省质量文化协会团体标准

T/HBZLWH 001-2024

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 by fluorescence spectrophotometry

（征求意见稿）

2024-0\*-\*\* 发布 2024-0\*-\*\*实施

河北省质量文化协会 发 布

目 次

前言············································1

1 范围···········································2

2 规范性引用文件······································2

3 术语和定义········································2

4 实验室生物安全 ·····································2

5 方法原理·········································2

6 试剂和材料········································2

6.1 总大肠菌群和大肠埃希氏菌培养基（Tectalert CCA）成分·················2

6.2 粪大肠菌群培养基（Tectalert FCA）成分························3

 6.3 无菌水·······································3

7 仪器和设备········································3

7.1 无菌采样瓶或采样袋··································3

7.2 检测瓶········································3

7.3全自动微生物检测系统·································3

7.4高压蒸汽灭菌器：121℃可调·······························3

7.5 一般实验室常用仪器和设备·······························3

8 样品的采集与保存·····································3

8.1样品采集·······································3

8.2样品保存·······································3

9 样品测定·········································4

9.1接种·········································4

9.2培养·········································4

10 对照实验········································4

10.1空白对照······································4

10.2阴性和阳性对照···································4

11 结果与报告·······································4

11.1污水样品测定结果···································5

11.2污泥样品·······································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专利的责任。

本文件由石家庄高新技术产业开发区污水处理厂提出并归口。

本文件主要起草单位：石家庄高新技术产业开发区污水处理厂、石家庄高新技术产业开发区供水排水公司、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、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。

本文件主要起草人：白玉玮、宁静、薛飞、赵伦、李亚娜、林孔亮、郭林水、辛超英、王冰然、马聪士、戚娟娟、刘翠棉、刘娟、冀建南、王珣、张丽、贡丽楠、李诗话、杨东洁、刘俊、董龙周、窦红、张靖、李再兴、王彦雷、王兵、张伟、朱亚强。

本文件为首次发布。

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测定荧光光度法。

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

检出限：本方法的检出限为1CFU/100mL，方法测定上限1×108CFU/100mL。

1. 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

GB/T19489　实验室生物安全通用要求

HJ91.1污水监测技术规范

CJ/T221 城镇污泥标准检验方法

1. 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

1. 实验室生物安全

应符合GB19489的相关规定。

1. 方法原理

一定量的经预处理后的污水及污泥与选择性培养基混合均匀放置于35.0 ℃或44.5 ℃环境下，总大肠菌群、大肠埃希氏菌和粪大肠菌群与各特性培养基反应释放出荧光。疏水的荧光产物聚合至光学检测区，通过光度计（波长：350nm～650nm）测定，依据荧光强度与样品总大肠菌群、大肠埃希氏菌和粪大肠菌群浓度的关系，从而得出总大肠菌群、大肠埃希氏菌和粪大肠菌群浓度。

1. 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，实验用水为无菌水。”

* 1. 总大肠菌群和大肠埃希氏菌培养基（Tectalert CCA）成分：

A硫酸铵 8.72g

B无水硫酸镁 0.17g

C氯化钠 17.44g

D氯化钙 0.09g

E亚硫酸钠 0.07g

F两性霉素 B 0.01g

H邻硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷 0.87g

I 4-甲基伞形酮-β-D-葡萄糖醛酸苷 0.13g

J无菌水 1000mL

也可采用市售商品化培养基制品。

* 1. 粪大肠菌群培养基（Tectalert FCA）成分：

A硫酸铵 8.76g

B无水硫酸镁 0.18g

C氯化钠 17.52g

D氯化钙 0.09g

E亚硫酸钠 0.07g

F两性霉素 B 0.01g

H邻硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷 0.88g

I无菌水 1000mL

也可采用市售商品化培养基制品。

* 1. 无菌水：满足GB/T6682三级及以上分析实验用水要求，经121 ℃高压灭菌20 min。
1. 仪器和设备
	1. 无菌采样瓶或采样袋：500 mL。

7.2 检测瓶：100mL。

7.3全自动微生物检测系统：

——恒温培养单元：不少于 2 个温控系统，温度控制精度±

-0-0-1.0 ℃，可自动调节待检测样本培养度 （35.0 ℃±1.0 ℃和44.5 ℃±0.5 ℃）。

7.4高压蒸汽灭菌器：121℃可调。

7.5 一般实验室常用仪器和设备

8 样品的采集与保存

8.1样品采集：应符合《污水监测技术规范》HJ91.1、《城镇污泥标准检验方法》CJ/T221 的要求。

8.2样品保存：

8.2.1污水样品：采样后应避光冷藏在0—5℃冷藏冰箱中并尽快检测，不得超过6h，如水样中有余氯，每 1L样品中加入80mgNa2S2O3·5H2O

8.2.2污泥样品：湿污泥置于白色瓷盘中均匀摊开，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(总量不得少于20g), 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℃冷藏冰箱中，保存时间不应超过24 h。否则将影响检验结果。

9 样品测定

9.1接种

9.1.1污水接种：将100mL待测样品放入含有2g培养基（6.1或6.2）的检测瓶（7.2）中，混匀。

9.1.2污泥接种：制备后的污泥样品10.0g放于无菌瓶内，加无菌水至100 mL 。 充分摇匀，若污泥样品颗粒较大，可将无菌瓶置于振荡器上振荡3 min, 制成均匀菌液。用10mL灭菌移液管吸取10 mL均匀菌液加入含有2g培养基（6.1或6.2）的检测瓶（7.2）中，使用无菌水定容至100 mL，混匀成1:10稀释度的均匀菌液A。若样品污染比较重，可制备成1:100稀释度的均匀菌液A，必要时可按同法加大稀释度，记录均匀菌液的稀释度 D。

9.2培养

打开仪器电源开关，将接种后的检测瓶放置于全自动微生物检测系统中，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，培养结束后仪器自动得出结果。

10.对照实验

10.1空白对照

以100 mL无菌水为阴性对照样品，按照9.1和9.2的步骤与被检样品同步进行测定。

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1。

表1

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 检测指标 | 阳性菌种 | 阴性菌种 |
| 总大肠菌群 | 大肠埃希氏菌 | 假单胞菌属 |
| 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 |

定期进行阴性和阳性对照实验，将标准菌株制成菌悬液，将菌悬液按照9.1和9.2的步骤，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。

11结果与报告

11.1污水样品测定结果保留两位有效数字，当测定结果≥100CFU/100mL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/100mL。

11.2污泥样品：

11.2.1计算

测得每100 mL水样中的“总大肠菌群和大肠埃希氏菌”或“粪大肠菌群”的最大可能数后，每克污泥样品中的“总大肠菌群和大肠埃希氏菌”或“粪大肠菌群”C(CFU/g),可按下式计算：



式中：

C—--每克污泥样品中的“总大肠菌群和大肠埃希氏菌”或“粪大肠菌群” （CFU/g）；

CFU—— 每100 mL 水样中的“总大肠菌群和大肠埃希氏菌”或“粪大肠菌群”的最大可能数；

D ——均匀菌液A的稀释度；

m ——污泥称重，单位为克 (g)。

测定结果保留两位有效数字，大于100时以科学计数法表示。