



中华人民共和国国家环境保护标准

HJ 1000-2018

水质 细菌总数的测定 平皿计数法

Water quality—Determination of total bacteria—Plate count method

(发布稿)

本电子版为发布稿。请以中国环境出版集团出版的正式标准文本为准。

2018-12-26 发布

2019-06-01 实施

生态环境部 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.....	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.....	2
9 分析步骤.....	3
10 结果计算与表示.....	4
11 精密度和准确度.....	5
12 质量保证和质量控制.....	5
13 废物处理.....	6
附录 A（资料性附录）细菌总数检验记录及报告推荐格式.....	7

前 言

为贯彻《中华人民共和国环境保护法》和《中华人民共和国水污染防治法》，保护生态环境，保障人体健康，规范水中细菌总数的测定方法，制定本标准。

本标准规定了测定地表水、地下水、生活污水和工业废水中细菌总数的平皿计数法。

本标准的附录A为资料性附录。

本标准首次发布。

本标准由生态环境部生态环境监测司、法规与标准司组织制订。

本标准起草单位：辽宁省环境监测实验中心。

本标准验证单位：大连市环境监测中心、丹东市环境监测中心站、锦州市环境监测中心站、辽阳市环境监测站、沈阳市疾病预防控制中心和辽宁北方环境检测技术有限公司。

本标准生态环境部2018年12月26日批准。

本标准自2019年6月1日起实施。

本标准由生态环境部解释。

水质 细菌总数的测定 平皿计数法

1 适用范围

本标准规定了测定水中细菌总数的平皿计数法。

本标准适用于地表水、地下水、生活污水和工业废水中细菌总数的测定。

2 规范性引用文件

本标准引用了下列文件或其中的条款。凡是不注日期的引用文件，其有效版本适用于本标准。

GB/T 14581 水质 湖泊和水库采样技术指导

HJ 494 水质 采样技术指导

HJ/T 91 地表水和污水监测技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

细菌总数 total bacteria

36℃培养 48 h，样品在营养琼脂上所生长的需氧菌和兼性厌氧菌菌落总数。

3.2

菌落形成单位 colony-forming units (CFU)

单位体积样品中的细菌群落总数。

4 方法原理

将样品接种于营养琼脂培养基中，在特定的物理条件下（36℃培养 48 h）培养，生长的需氧菌和兼性厌氧菌总数即为样品中细菌菌落的总数。

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。

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。

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 营养琼脂培养基。

成分：

蛋白胨	10 g
牛肉膏	3 g
氯化钠	5 g
琼脂	15~20 g

将上述成分或含有上述成分的市售成品溶解于1000 ml水中，调节pH至7.4~7.6，分装于玻璃容器中，经121℃高压蒸汽灭菌20 min，储存于冷暗处备用。避光、干燥保存，必要时在5℃±3℃冰箱中保存，不得超过1个月。配制好的营养琼脂培养基不能进行多次融化操作，以少量勤配为宜。当培养基颜色变化或脱水明显时应废弃不用。

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（6.4），溶于适量水中，定容至100 ml，此溶液可保存为30 d。

6.7 玻璃珠：直径3~8 mm。

7 仪器和设备

7.1 采样瓶：250 ml带螺旋帽或磨口塞的广口玻璃瓶。

7.2 高压蒸汽灭菌器：115℃、121℃可调。

7.3 恒温培养箱：允许温度偏差 $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 。

7.4 恒温水浴锅：47℃可调。

7.5 pH计：准确到0.1 pH单位。

7.6 放大镜或菌落计数器。

7.7 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应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/T 494和HJ/T 91的相关规定执行。

采集微生物样品时，采样瓶（7.1）不得用样品洗涤，采集样品于灭菌的采样瓶中。

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，约距水面 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 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 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℃ 以下冷藏并在 2 h 内检测。

9 分析步骤

9.1 样品稀释

将样品用力振摇 20~25 次，使可能存在的细菌凝团分散。根据样品污染程度确定稀释倍数。以无菌操作方式吸取 10 ml 充分混匀的样品，注入盛有 90 ml 无菌水（6.2）的三角烧瓶中（可放适量的玻璃珠），混匀成 1:10 稀释样品。吸取 1:10 的稀释样品 10 ml 注入盛有 90 ml 无菌水的三角烧瓶中，混匀成 1:100 稀释样品。按同法依次稀释成 1:1000、1:10000 稀释样品。每个样品至少应稀释 3 个适宜浓度。

注：吸取不同浓度的稀释液时，每次必须更换移液管。

9.2 接种

以无菌操作方式用 1 ml 灭菌的移液管吸取充分混匀的样品或稀释样品 1 ml，注入灭菌平皿中，倾注 15~20 ml 冷却到 44~47℃ 的营养琼脂培养基（6.1），并立即旋摇平皿，使样品或稀释样品与培养基充分混匀。每个样品或稀释样品倾注 2 个平皿。

9.3 培养

待平皿内的营养琼脂培养基冷却凝固后，翻转平皿，使底面向上（避免因表面水分凝结而影响细菌均匀生长），在 36℃ ± 1℃ 条件下，恒温培养箱（7.3）内培养 48 h ± 2 h 后观察结果。

9.4 空白试验

用无菌水做实验室空白测定，培养后平皿上不得有菌落生长，否则，该次样品测定结果无效，应查明原因后重新测定。

10 结果计算与表示

10.1 结果判读

平皿上有较大片状菌落且超过平皿的一半时，该平皿不参加计数。

片状菌落不到平皿的一半，而其余一半菌落分布又很均匀时，将此分布均匀的菌落计数，并乘以 2 代表全皿菌落总数。

外观（形态或颜色）相似，距离相近却不相触的菌落，只要它们之间的距离不小于最小菌落的直径，予以计数。紧密接触而外观相异的菌落，予以计数。

10.2 结果计算

以每个平皿菌落的总数或平均数（同一稀释倍数两个重复平皿的平均数）乘以稀释倍数来计算 1 ml 样品中的细菌总数。各种不同情况的计算方法如下：

优先选择平均菌落数在 30~300 之间的平皿进行计数，当只有一个稀释倍数的平均菌落数符合此范围时，以该平均菌落数乘以其稀释倍数为细菌总数测定值（见表 1 例 1）。

若有两个稀释倍数平均菌落数在 30~300 之间，计算二者的比值（二者分别乘以其稀释倍数后，较大值与较小值之比）。若其比值小于 2，以两者的平均数为细菌总数测定值；若大于或等于 2，则以稀释倍数较小的菌落总数为细菌总数测定值（见表 1 例 2、例 3、例 4）。

若所有稀释倍数的平均菌落数均大于 300，则以稀释倍数最大的平均菌落数乘以稀释倍数为细菌总数测定值（见表 1 例 5）。

若所有稀释倍数的平均菌落数均小于 30，则以稀释倍数最小的平均菌落数乘以稀释倍数为细菌总数测定值（见表 1 例 6）。

若所有稀释倍数的平均菌落数均不在 30~300 之间，则以最接近 300 或 30 的平均菌落数乘以稀释倍数为细菌总数测定值（见表 1 例 7）。

表 1 稀释倍数选择及菌落总数测定值

示例	不同稀释倍数的平均菌落数			两个稀释倍数 菌落数之比	菌落总数 (CFU/ml)
	10	100	1000		
1	1365	164	20	—	16400
2	2760	295	46	1.6	37750
3	2890	271	60	2.2	27100
4	150	30	8	2	1500
5	无法计数	1650	513	—	513000

续表

示例	不同稀释倍数的平均菌落数			两个稀释倍数 菌落数之比	菌落总数 (CFU/ml)
	10	100	1000		
6	27	11	5	—	270
7	无法计数	305	12	—	30500

10.3 结果表示

测定结果保留至整数位，最多保留两位有效数字，当测定结果 ≥ 100 CFU/ml时，以科学计数法表示；若未稀释的原液的平皿上无菌落生长，则以“未检出”或“ < 1 CFU/ml”表示。细菌总数检验记录及报告推荐格式参见附录 A。

11 精密度和准确度

11.1 精密度

6个实验室分别对低浓度（地下水，浓度均值为39 CFU/ml）、中浓度（地表水，浓度均值为 2.5×10^3 CFU/ml）和高浓度（生活污水，浓度均值为 1.3×10^5 CFU/ml）三个不同浓度细菌总数的样品及有证标准样品（浓度为95 MPN/ml，可接受范围为22~168 MPN/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2.4%~6.2%、0.6%~1.8%、0.3%~1.3%和1.7%~5.6%；实验室间相对标准偏差分别为18%、4.7%、2.4%和3.7%；实验室间95%置信区间见表2。

表2 实验室间95%置信区间

低浓度 (CFU/ml)		中浓度 (CFU/ml)		高浓度 (CFU/ml)		有证标准样品 (CFU/ml)	
均值	95%置信区间	均值	95%置信区间	均值	95%置信区间	均值	95%置信区间
39	31~50	2.5×10^3	$1.7 \times 10^3 \sim 3.6 \times 10^3$	1.3×10^5	$9.8 \times 10^4 \sim 1.8 \times 10^5$	65	55~76

11.2 准确度

6个实验室对含细菌总数浓度为95 MPN/ml的标准样品进行了6次重复测定：相对误差范围为-13%~-4.6%；相对误差最终值为 $-8.7\% \pm 6.5\%$ 。

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 质量保证和质量控制

12.1 培养基检验

更换不同批次培养基时要进行阳性菌株检验，以确保其符合要求。常用的阳性标准菌株

有大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 等。将上述标准菌株配成浓度为 30~300 CFU/ml 的菌悬液，充分混匀后取 1ml 菌悬液按接种 (9.2) 和培养 (9.3) 进行操作，平皿内均匀地产生 30~300 个菌落，表明该批次培养基合格。

12.2 空白试验

每次试验都要进行实验室空白测定 (9.4)，检查稀释水、玻璃器皿和其它器具的无菌性。

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。

附录 A

(资料性附录)

细菌总数检验记录及报告推荐格式

表 A.1 细菌总数测定检验记录

项目名称: _____ 检验日期: 年 月 日

检验方法		方法依据	
灭菌锅型号		出厂编号	
培养箱型号		出厂编号	
培养基灭菌温度(℃)		培养温度(℃)	
样品编号:	细菌总数: _____ CFU/ml		
样品用量	_____ ml	_____ ml	_____ ml
稀释倍数			
36℃培养 48 h 后, 菌落个数			
平均菌落数(个)			

检验者: _____ 校对: _____ 审核: _____

注: 可根据实际工作需要自行设计表格, 至少要包括上述信息。

表 A.2 细菌总数测定数据报告

样品来源			
采/送样日期		分析日期	
样品数量			
样品状态			
监测点位	样品编号	监测频次	
标准方法名称		标准方法编号	
测定值:	监测结果:		
备注			

注: 可根据实际工作需要自行设计表格, 至少要包括上述信息。