

《水质 菌落总数的测定 酶底物法》

(☒征求意见稿☐送审稿☐报批稿)

编制说明

主编单位：辽宁省河库管理服务中心（辽宁省水文局）

2025 年 06 月 24 日

目 录

一、工作简况.....	1
1.任务来源.....	1
2.工作过程.....	1
3.主要起草人及其所做的工作.....	3
二、主要内容说明及来源依据.....	4
1.标准编制原则.....	4
2.标准编制的必要性分析.....	4
3.标准主要条文内容说明.....	6
3.1 规定了适应范围.....	6
3.2 规定了规范性引用文件.....	6
3.3 规定了术语定义.....	7
3.4 规定了方法原理.....	7
3.5 规定了所有的试剂和材料.....	7
3.6 规定了所有的仪器设备.....	7
3.7 规定了样品的采集和保存方法.....	8
3.8 规定了分析步骤.....	8
3.9 规定了数据处理方法.....	10
3.10 规定了质量保证与控制要求.....	10
3.11 规定了废液处理方法.....	11
4.方法研究与验证.....	11
4.1 方法研究.....	11
4.1.1 样品保存时间.....	11
4.1.2 不同培养基条件实验.....	11
4.1.3 培养时间.....	13
4.1.4 培养温度条件实验.....	13
4.1.5 阴性对照.....	14
4.1.6 精密度.....	14
4.1.7 正确度.....	16
4.2 方法验证.....	17
4.2.1 验证单位及人员.....	17
4.2.2 方法验证方案.....	18
4.2.2.1 方法精密度的验证.....	18
4.2.2.2 方法准确度的验证.....	19
4.2.3 方法验证过程.....	20
4.2.4 方法验证总结.....	21
三、专利情况说明.....	21
四、与相关标准的关系分析.....	21
五、重大分歧或重难点的处理经过和依据.....	23
六、预期效益（报批阶段填写）.....	23
七、其他说明事项.....	23
附件：.....	24

编制说明

一、工作简况

1.任务来源

根据《辽宁省水利学会团体标准管理办法》（试行）（辽水学〔2020〕8号）的要求，编制单位于2025年3月17日向辽宁省水利学会提交了《水质 菌落总数的测定 酶底物法》标准制修订立项申请书。

2025年5月21日，辽宁省水利学会在沈阳组织召开了《水质 菌落总数的测定 酶底物法》立项审查会。通过专家论证并公示后，辽宁省水利学会于2025年5月21日以“关于批准《水质 高锰酸盐指数的测定连续流动分析分光光度法》和《水质 菌落总数的测定 酶底物法》立项的通知”批复了《水质 菌落总数的测定 酶底物法》立项，编制单位为辽宁省河库管理服务中心（辽宁省水文局）。

2.工作过程

（1）查询相关标准和文献资料

2024年11月～2025年3月，根据《辽宁省水利学会团体标准管理办法》（试行）的相关规定，检索、查询和收集国内外标准和文献。参照《地下水质量标准》（GB/T 14848-2017）、《标准编写规则》（GB/T 20001.4）第4部分：试验方法标准、《环境监测分析方法标准制修订技术导则》（HJ 168-2020）、《测量方法与结果的准确度（正确度与精密度）》（GB/T 6379）、《生活饮用水标准检测方法》（GB/T 5750-2023）、《水环境

《中细菌总数的测定》（EPA 40 CFR Part 136 9215）和《水质 细菌总数的测定 平皿计数法》（HJ 1000-2018）、《水质大肠埃希氏菌和大肠菌群检测》（ISO 9308-2018）第2部分：最大可能数法、《培养基制备指南》（SN/T1538.1-2016）第1部分：实验室培养基制备质量保证通则、《培养基制备指南》（SN/T1538.2-2016）第2部分：培养基性能测试实用指南、《食品安全国家标准食品 微生物学检验 培养基和试剂的质量要求》（GB4789.28-2024）等国家和行业标准相关要求开展标准编制的前期准备工作。

（2）成立标准编制工作组

2025年3月，向辽宁省水利学会提交标准立项申请书，编制单位成立了标准编制工作组，工作组成员由具有多年菌落总数分析经验的技术人员组成。

（3）标准开发研制

2025年3月至5月，标准编制单位开展了标准的研制工作。摸索试验条件，包括样品保存时间的选择、不同培养基对同一类型水体中菌落总数的影响、相同培养基对不同类型水体中菌落总数的影响、培养时间和培养温度对结果的影响等，主要围绕精密度、准确度等进行方法研制的条件实验，结合微生物分析相关的实验室质量保证、器具的洗涤和灭菌、培养基的制备、微生物样品的采集和保存，在广泛阅读、认真研究相关资料的基础上，编写了标准文本及编制说明初稿。

（4）标准立项

2025年5月21日，辽宁省水利学会组织召开标准立项会议，并批复

了标准立项。

（5）组织验证单位开展方法验证

2025 年 4 月至 5 月，编制单位筛选并邀请了六家具有实验室资质的单位参加方法验证，分别为辽宁省锦州水文局、辽宁省抚顺水文局、辽宁省本溪水文局、辽宁省辽阳水文局、辽宁省朝阳水文局和辽宁省葫芦岛水文局，编制单位组织各验证单位按照方法验证实施方案开展相关验证工作，并对各验证单位提交的方法验证报告进行汇总分析。

（6）编写标准征求意见稿和编制说明

2025 年 6 月，修改完善标准文本及标准编制说明，形成征求意见稿。

3.主要起草人及其所做的工作

本标准由辽宁省河库管理服务中心（辽宁省水文局）编制，标准主要起草人为：吕宝阔、李荧荧、周宇、白伟桦、费卓越、周鸿飞、周寒、孙阳、万太斌、景丽彬、刘阳、孙岩、张静、胡耘赫、李芳雨。

吕宝阔：作为标准方法开发及验证的技术总负责人，负责制定标准编制的技术路线、方法研究及验证的技术方案并组织实施，编制标准文本及编制说明等技术报告。

李荧荧：作为标准方法开发的主要负责人，参与标准编制的技术路线、方法研究及验证工作并向各验证单位提供所需的技术支持，审定标准文本及编制说明。

周宇：作为标准方法开发的主要负责人，在技术上负责标准方法开发研制工作和方法验证工作，负责标准文本和标准编制说明等技术报告的编

写工作。

二、主要内容说明及来源依据

1.标准编制原则

（1）监测分析方法的制修订应符合《辽宁省水利学会团体标准管理办法（试行）》（辽水学〔2020〕8号）的要求。

（2）制定的标准方法应满足相关水利标准和水资源保护工作的需要，确保方法标准的科学性、先进性、可行性和可操作性。

（3）标准文本按照《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》（GB/T 1.1-2009）、《标准编写规则 第4部分：试验方法标准》（GB/T 20001.4-2015）的规则起草。

（4）监测分析方法的验证工作参考《水质监测分析方法标准编制技术导则》（T/CHES 53-2021）的要求开展。

（5）方法具有普遍适用性，易于推广使用。

2.标准编制的必要性分析

细菌在自然界的分布很广，存在于土壤、水、空气和动植物体表面及消化道等处。水中菌落总数就是指在一定条件下（如培养基、培养温度和培养时间等）每毫升水样所生长出来的细菌总数。据世界卫生组织统计，全球1400余种人类传染病中，60%以上源于动物源性病原细菌（如沙门氏菌、弯曲杆菌、肉毒梭菌等），全球每年约有三分之一的人群受到致病菌侵害，发展中国家更加严重。

我国的《地下水质量标准》（GB/T 14848-2017）等标准中均有菌落总数指标，我国现有标准中对菌落总数的分类及限值见表 1。目前国内生活饮用水中菌落总数的测定方法为酶底物法和平皿计数法，地下水中菌落总数的测定方法只有平皿计数法，缺少酶底物法检测地下水中菌落总数的相关标准。

表 1 我国现有标准中对菌落总数的限值规定

序号	标准号	标准名称	水质类别	标准值	单位
1	GB/T14848-2017	地下水质量标准	I 类~III类	≤ 100	CFU/mL
			IV类	≤ 1000	
			V类	> 1000	
2	GB5749-2022	生活饮用水卫生标准		100	CFU/mL 或 MPN/mL

随着细菌种类的不断更新，传统平皿计数法不适用于检测厌氧菌、非嗜中温及对繁殖所需营养有特殊要求的细菌，平皿计数法所得的菌落总数实质上可能低于真正存在的活细菌的数量。平皿计数法因在操作过程中步骤复杂易引入污染，结果判定相对困难易造成较大的人为误差，对试验技术人员和试验环境无菌条件要求极高，在实验室应急监测和大批样品检测方面存在不足之处。

本标准所采用的酶底物培养基含有多种独特的复合酶物质，每一种都针对不同的细菌酶设计，并且已包含了所有最普遍的介水传播的细菌，所有的酶底物在被分解时都产生相同的信号，这个信号在 366nm 紫外灯下的产生荧光，信号清晰醒目无干扰，便于读取阳性孔数，将发荧光的孔数通过表格转化为最大可能数(MPN 值)。在 95%的置信区间内，无需稀释的条件下最大可检测到 738MPN/mL。若采用成品培养基，则无需在专业无菌

室内操作，操作步骤简单且耗时较少，45~72 小时内读取结果均有效。

酶底物法检测地下水中菌落总数具有菌类响应完全、结果判读准确、对试验环境要求不高、检测效率高等明显的优势，因此有必要制定酶底物法测定地下水中菌落总数的标准方法。

3.标准主要条文内容说明

3.1 规定了适应范围

本方法规定了饮用水和地下水中菌落总数的测定方法。

本方法适用于饮用水和地下水中菌落总数的测定。

本方法未稀释水样的检测范围为 $\leq 738\text{MPN/mL}$ 。当样品中菌落总数含量超过 738MPN/mL 时，宜经稀释后测定。

3.2 规定了规范性引用文件

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 5750.12—2023 生活饮用水标准检测方法 第 12 部分：微生物指标

EPA 40 CFR Part 136 9215 水环境中细菌总数的测定

EPA 9223 大肠菌群检测 B 酶底物法

SL 219-2013 水环境监测规范

HJ 1000-2018 水质 细菌总数的测定 平皿计数法

3.3 规定了术语定义

菌落总数（Total bacteria）是指在一定条件下，经一定时间培养所得单位体积水样中的微生物菌落的总数。

最大可能数（Most probable number; MPN）源自于统计学和微生物学结合的一种定量检测方法。基于泊松分布，利用统计学原理，根据一定体积不同稀释度样品经培养后产生的目标微生物阳性数，估算一定体积样品中目标微生物存在的数量，即单位体积目标微生物的最大可能数。

3.4 规定了方法原理

本标准规定了酶底物法测定水中菌落总数的基本原理。

3.5 规定了所有的试剂和材料

除非另有说明，分析时均使用符合国家标准的分析纯试剂或生物试剂，实验用水为蒸馏水或去离子水。

3.6 规定了所有的仪器设备

- （1）采样容器：无菌玻璃瓶、塑料瓶或无菌塑料袋。
- （2）电子天平：精度为 0.0001g
- （3）滤膜：孔径 0.22 μm 。
- （4）抽滤装置
- （5）高压蒸汽灭菌器:121℃、101.3kpa。要求容量足够，能提供均匀的温度，并且能够在 30min 之内达到所需的灭菌温度。

(6) 培养盘：定量培养用无菌塑料盘，含有 84 个孔槽，每个孔槽容纳 0.06mL 待测水样。

(7) 培养箱： $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

(8) 紫外灯：波长为 366nm。

(9) pH 计：至少准确至 0.1。

(10) 一般实验常用仪器和设备：玻璃器皿要严格灭菌。

3.7 规定了样品的采集和保存方法

3.7.1.样品的采集

点位布设及采样频次按照 SL219-2-013 相关规定执行。

如果采集的是含有活性氯的样品，需在样品采集时加入硫代硫酸钠溶液（每 125mL 容积加入 0.1mL 硫代硫酸钠溶液），以去除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（每 125mL 容积加入 0.3mL 乙二胺四乙酸二钠溶液），以消除干扰。

3.7.2.样品的保存

采样后应在 2h 内检测，否则，应 10°C 以下冷藏但不超过 6h。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 2h 内检测。

3.8 规定了分析步骤

(1) 水样稀释

方法规定了水样稀释方法。

检测所需水样为 1mL。若水样污染严重，可对水样进行稀释。以无菌操作方法用无菌吸管或移液器吸取 1mL 充分混匀的水样，注入盛有 9mL 无菌生理盐水的试管中，充分振荡混匀后取 1mL 进行检测，必要时可加大稀释度，以 10 倍逐级稀释。

（2）接种培养

方法规定了接种培养方法。

向无菌试管中加入 9mL 制备好的液体培养基；如选用符合要求的成品培养基，则向装有 0.1g 培养基的试管中加入 9mL 无菌生理盐水。取 1mL 水样加入上述试管中，振荡混匀。

将混匀后的水样倒入培养盘中心位置，将培养瓶盖好，放置在水平桌面上，紧贴桌面顺时针轻柔晃动培养盘，将待测水样分配到培养盘的所有孔槽中。

将培养盘 90°~120° 竖起，使多余的水样由盘内海绵条吸收，将培养盘缓慢翻转过来，倒置放于 $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养箱中，培养 48h。可叠放培养，不宜超过 10 层。

（3）结果计数

方法规定了结果计数方法。

将培养后的培养盘取出，倒置于暗处或紫外灯箱内，在 6W 366nm 紫外等下约 13cm 处观察，记录产生蓝色荧光的孔数。如未放置在紫外灯箱内，观察时需佩戴防紫外线的护目镜。培养盘中的 84 个孔，无论荧光强弱，只要呈现蓝色荧光即为阳性，但海绵条的荧光不计入结果。

3.9 规定了数据处理方法

(1) 结果报告

根据显蓝色荧光的孔数，对照 MPN 表查出孔数对应的每毫升样品中的菌落总数的 MPN 值。如果样品进行了稀释，读取结果应乘以稀释倍数并报告之，结果以 MPN/mL 表示。如果所有孔均未显荧光，则可报告为菌落总数未检出。

(2) 不同稀释度的选择及报告方法

选择菌落总数在 ≤ 738 MPN/mL 范围内的稀释度，如果只有一个稀释度的结果符合此范围，则将结果乘以稀释倍数报告结果。

若有两个或两个以上稀释度的结果均落在 ≤ 738 MPN/mL 范围内，则选择稀释度最小的结果乘以稀释倍数报告结果。

若所有稀释度的培养盘上均无蓝色荧光，则以未检出报告结果。

3.10 规定了质量保证与控制要求

(1) 阳性对照

方法规定了阳性对照方法。每新购或新配制一批培养基，都应做阳性对照，可选有证的菌落总数质控标样，接种培养后计数结果与标样的标准值比对。

(2) 阴性对照

方法规定了阴性对照方法。每新购或新配制一批培养基，都应做阴性对照，用 1mL 无菌水代替实际水样。接种培养后如无荧光产生则为阴性。

3.11 规定了废液处理方法

使用后的样品瓶和定量盘等器皿和耗材须经 121℃ 高压灭菌器灭菌 30min。灭菌后器皿方可清洗，废物作为一般废物处理。

4.方法研究与验证

4.1 方法研究

4.1.1 样品保存时间

本研究的样品保存时间遵从《水质 细菌总数的测定 平皿计数法》（HJ 1000-2018）中的相关规定：采样后应在 2h 内检测，否则，应 10℃ 以下冷藏但不超过 6h。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 2h 内检测。

4.1.2 不同培养基条件实验

标准编制组采用同一批次标准样品和第三批不同含量地下水样品对市售成品培养基和实验室自配复合酶底物培养基进行比较研究，测定结果见表 2。

表 2 两种培养基的测定结果

序号	水样类型	自配培养基		市售培养基	
		计数结果 (MPN/mL)	结果对数	计数结果 (MPN/mL)	结果对数
1	标准样品	276	2.44	266	2.42
2		248	2.39	266	2.42
3		231	2.36	276	2.44
4		266	2.42	276	2.44

序号	水样类型	自配培养基		市售培养基	
		计数结果 (MPN/mL)	结果对数	计数结果 (MPN/mL)	结果对数
5		248	2.39	299	2.48
6		231	2.36	287	2.46
7	地下水 1	68	1.83	74	1.87
8		77	1.89	71	1.85
9		71	1.85	74	1.87
10		74	1.87	71	1.85
11		77	1.89	77	1.89
12		71	1.85	74	1.87
13		355	2.55	324	2.51
14	地下水 2	414	2.62	414	2.62
15		311	2.49	414	2.62
16		324	2.51	414	2.62
17		339	2.53	339	2.53
18		392	2.59	311	2.49
19		1240	3.09	1240	3.09
20	地下水 3	1200	3.08	1080	3.03
21		1320	3.12	1120	3.05
22		1080	3.03	1160	3.06
23		1120	3.05	1040	3.02
24		1280	3.11	1280	3.11

使用 Excel 数据分析对测试结果进行 t 检验（配对样本分析），为了使两组数据呈正态分布，先对数据进行以 10 为底的对数处理，检验结果见表 3。

表 3 两种培养基的 t 检验结果

	自配培养基	市售培养基
平均	2.472341887	2.483796166
方差	0.197468633	0.189616435
观测值	24	24
泊松相关系数	0.992235913	
假设平均差	0	
df	23	

t Stat	-1.010388509	
P(T<=t) 单尾	0.161410631	
t 单尾临界	1.713871528	
P(T<=t) 双尾	0.322821262	
t 双尾临界	2.06865761	

t 检验结果为 $t = -1.01 < t_{0.05/28} = 2.05$, $P = 0.32 > 0.05$, 表明两种培养基无显著性差异。

4.1.3 培养时间

《水环境中细菌总数的测定》(EPA 40 CFR Part 136 9215) 和《生活饮用水标准检验方法》(GB5750-2003) 规定的培养时间均为 48h, 故本标准沿用已有标准的规定, 培养时间亦选取 48h。

4.1.4 培养温度条件实验

《水环境中细菌总数的测定》(EPA 40 CFR Part 136 9215) 规定的培养温度为 $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 《生活饮用水标准检验方法》(GB5750-2003) 规定的培养温度为 $36 \pm 1^\circ\text{C}$, 两个标准在培养温度的选择上存在差异。标准编制组分别设置了 34°C 、 35°C 、 36°C 、 37°C 四个温度开展菌落总数标准样品 48h 培养测定, 不同温度结果比对见表 4。

表 4 不同培养温度结果比对

培养温度	平行组别	1#	2#	3#	4#	5#	6#
34℃	计数结果 (MPN/mL)	287	239	287	223	239	257
	结果对数	2.46	2.38	2.46	2.35	2.38	2.41
35℃	计数结果 (MPN/mL)	266	257	266	231	239	266

	结果对数	2.42	2.41	2.42	2.36	2.38	2.42
36℃	计数结果 (MPN/mL)	223	248	231	231	248	239
	结果对数	2.35	2.39	2.36	2.36	2.39	2.38
37℃	计数结果 (MPN/mL)	223	209	287	223	257	287
	结果对数	2.35	2.32	2.46	2.35	2.41	2.46

对以上数据进行单因素方差分析，结果见表 5

表 5 不同培养温度单因素方差分析

	平方和	自由度(df)	均方(MS)	F	P (显著性)
组间 (SSB)	0.003914	3	0.001305	0.777043	0.520521
组内 (SSW)	0.033576	20	0.001679		
总数 (SST)	0.03749	23			

由上表可见， $p=0.52>0.05$ ，四个培养温度条件下细菌总数的测定结果在统计学意义上没有显著性差异。由于各地培养箱精密度不同，为保证绝大多数培养箱能够满足实验要求，本标准培养温度选用 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

4.1.5 阴性对照

用无菌水做实验室阴性对照，经培养后，培养盘不得显荧光，否则，该批次样品测定无效，需查明原因重新测定。

4.1.6 精密度

对某一含量的样品在第 i 个实验室内进行 n 次平行测定，实验室内相对标准偏差按如下公式进行计算：

$$\bar{x}_i = \frac{\sum_{k=1}^n x_k}{n} \quad (1)$$

$$S_i = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^n (x_k - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2)$$

$$RSD_i = \frac{S_i}{\bar{x}_i} \times 100\% \quad (3)$$

式中：

x_k —第*i*个实验室内对某一含量样品进行的第*k*次测试结果；

$\bar{x}_i$ —第*i*个实验室对某一含量样品测试的平均值；

S_i —第*i*个实验室对某一含量样品测试的标准偏差；

RSD_i —*i*个实验室对某一含量样品测试的相对标准偏差。

(1) 标准样品的精密度

对含量为 229MPN/mL 的有证标准样品进行 6 次平行测定，计算平均值、标准偏差和相对标准偏差。结果见表 6。

表 6 标准样品精密度测试数据

实验室号	标准样品精密度		
	平均值 (MPN/mL)	S_i	RSD%
1	278	0.02	0.00
2	193	0.05	2.40
3	259	0.03	1.40
4	196	0.02	0.98
5	246	0.03	1.20
6	221	0.03	1.15

由表可见，标准样品相对标准偏差为 0.00 %~2.40 %。

(2) 实际样品的精密度

分别对不同含量实际样品进行 6 次平行测定，计算平均值、标准偏差和相对标准偏差。结果见表 7。

表 7 实际样品精密度测试数据

实验室号	饮用水			地下水 1			地下水 2			地下水 3		
	平均值	S _i	RSD%	平均值	Si	RSD%	平均值	S _i	RSD%	平均值	S _i	RSD%
1	75	0.03	1.86	74	0.01	0.71	369	0.06	2.30	1153	0.03	1.13
2	24	0.07	4.93	31	0.04	2.97	411	0.04	1.64	952	0.07	2.45
3	58	0.03	1.66	91	0.03	1.58	468	0.03	1.29	1282	0.02	0.65
4	4	0.00	0.00	89	0.01	0.74	257	0.02	0.98	1652	0.01	0.40
5	69	0.03	1.43	64	0.03	1.76	130	0.04	1.88	1377	0.03	0.89
6	15	0.06	4.68	75	0.02	1.26	229	0.06	2.34	3525	0.02	0.43

由表可见，不同含量的实际样品测定的实验室内相对标准偏差为分别 0.00%~4.93 %、0.71%~2.97 %、0.98 %~2.34 %、0.40%~2.45%。

4.1.7 正确度

对含量为 229MPN/mL 有证标准样品进行 6 次平行测定，计算平均值和相对误差。结果见表 8。

相对误差按如下公式进行计算：

$$RE_i \% = \frac{\bar{x}_i - \mu}{\mu} \times 100\% \quad (4)$$

式中： $\bar{x}_i$ —第*i*个实验室对某一浓度（含量）水平有证标准物质标样测试的平均值；

μ —有证标准物质的浓度（含量）。

表 8 有证标准物质测试数据

实验室号	平均值	RE%
1	2.37	0.61
2	2.29	-3.15
3	2.41	2.27
4	2.29	-2.86
5	2.39	1.32
6	2.34	-0.65
备注：表内的计算结果都是以相应样品结果的常用对数值计算得来。		

由表可见，有证标准样品测定的相对误差为-3.15%~2.27%。

4.2 方法验证

4.2.1 验证单位及人员

本标准共有六家验证单位参加方法验证工作，包括：辽宁省锦州水文局、辽宁省抚顺水文局、辽宁省本溪水文局、辽宁省辽阳水文局、辽宁省朝阳水文局和辽宁省葫芦岛水文局，具体见表 9。参与验证的人员、使用仪器及试剂情况见附件《方法验证汇总报告》。

表 9 验证单位情况表

实验室号	单位名称	分级	所在流域	所在城市
1	辽宁省锦州水文局	地市级	松辽流域	辽宁锦州
2	辽宁省抚顺水文局	地市级	松辽流域	辽宁抚顺
3	辽宁省本溪水文局	地市级	松辽流域	辽宁本溪
4	辽宁省辽阳水文局	地市级	松辽流域	辽宁辽阳
5	辽宁省朝阳水文局	地市级	松辽流域	辽宁朝阳

6	辽宁省葫芦岛水文局	地市级	松辽流域	辽宁葫芦岛
---	-----------	-----	------	-------

4.2.2 方法验证方案

参照《水质监测分析方法标准编制技术导则》（T/CHES 53-2021）的规定，组织六家有资质的实验室进行验证。

根据影响方法的精密度、准确度的主要因素和数理统计学的要求，编制方法验证报告。

验证数据主要包括精密度和准确度。验证单位按《水质监测分析方法标准编制技术导则》（T/CHES 53-2021）的要求，完成了方法验证报告。主编单位根据验证单位提交的方法验证报告，编制了方法验证汇总报告。

4.2.2.1 方法精密度的验证

六家验证单位分别对 229MPN/mL 有证标准样品进行 6 次平行测定，计算平均值、实验室内和实验室间标准偏差和相对标准偏差。各验证单位分别采集本地区不同含量、有代表性的不同类型水体的实际样品进行 6 次平行测定，计算平均值、实验室内标准偏差和相对标准偏差。

（1）实验室内相对标准偏差

对不同含量的样品在第 i 个实验室内进行 n 次平行测定，实验室内相对标准偏差按如下公式进行计算：

$$\bar{x}_i = \frac{\sum_{k=1}^n x_k}{n} \quad (5)$$

$$S_i = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^n (x_k - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (6)$$

$$RSD_i = \frac{S_i}{\bar{x}_i} \times 100\% \quad (7)$$

式中：

x_k —第 i 个实验室内对某一浓度水平样品进行的第 k 次测试结果；

$\bar{x}_i$ —第 i 个实验室对某一浓度水平样品测试的平均值；

S_i —第 i 个实验室对某一浓度水平样品测试的标准偏差；

RSD_i — i 个实验室对某一浓度水平样品测试的相对标准偏差。

(2) 实验室间相对标准偏差

对相同含量的样品在第 l 个实验室内进行测定，实验室间相对标准偏差按如下公式进行计算：

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^l \bar{x}_i}{l} \quad (8)$$

$$S' = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^l (\bar{x}_i - \bar{x})^2}{l-1}} \quad (9)$$

$$RSD' = \frac{S'}{\bar{x}} \times 100\% \quad (10)$$

式中： $\bar{x}_i$ —第 i 个实验室对某一个浓度水平样品测试的平均值；

$\bar{x}$ — l 个实验室对某一浓度水平样品测试的平均值；

S' —实验室间标准偏差；

RSD' —实验室间相对标准偏差；

4.2.2.2 方法准确度的验证

六家验证单位分别对含量为 229MPN/mL 有证标准样品进行 6 次平行测定，计算平均值和相对误差。

(1) 相对误差

计算公式如下：

$$RE_i \% = \frac{\bar{x}_i - \mu}{\mu} \times 100\% \quad (11)$$

$$\overline{RE} = \frac{\sum_{i=1}^l RE_i}{l} \quad (12)$$

$$S_{\overline{RE}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^l (RE_i - \overline{RE})^2}{l-1}} \quad (13)$$

(2) 相对误差最终值： $\overline{RE} \pm 2S_{\overline{RE}}$

式中： $\bar{x}_i$ —第*i*个实验室对某一浓度（含量）水平有证标准物质标样测试的平均值；

μ —有证标准物质的浓度（含量）；

RE_i —第*i*个实验室对某一浓度（含量）水平有证标准物质标样测试的相对误差；

$\overline{RE}$ —*l*个验证实验室的相对误差均值；

$S_{\overline{RE}}$ —*l*个验证实验室的相对误差的标准偏差。

4.2.3 方法验证过程

4.2.3.1 筛选方法验证单位

为使本标准方法验证工作具有代表性和普遍适用性，编制单位综合考虑省内不同水文地理环境因素，筛选覆盖全省各地区饮用水和地下水监测任务的地市水文局水环境监测中心（分中心）进行方法验证工作。

4.2.3.2 方法验证前期工作

培训参加验证的人员，使其能够熟悉和掌握方法原理、操作步骤及流

程。方法验证过程所使用的试剂、仪器和设备符合方法的相关要求。编制单位制定了方法验证的具体实施方案，验证单位负责购置测试精密度、准确度等所需的标准样平并采集所在区域不同含量区间有代表性的实际样品，按实施方案开展验证工作。

4.2.3.3 方法验证

方法验证单位按方法验证实施方案，完成方法验证报告，提交编制单位汇总。各验证单位的《方法验证报告》附后。

4.2.4 方法验证总结

4.2.4.1 精密度

六家实验室对含量为 229MPN/mL 的统一标准样品和四种不同含量的实际样品进行测定，实验室内相对标准偏差为 0.00 %~2.40 %、0.00 %~4.93 %、0.71%~2.97 %、0.98 %~2.34 %、0.40%~2.45%。

4.2.4.2 准确度

六家实验室对含量为 229MPN/mL 的标准样品进行测定，相对误差为-3.15%~2.27%，相对误差最终值分别为-0.41%±4.46%。

三、专利情况说明

无。

四、与相关标准的关系分析

水中菌落总数的检测方法分为平皿计数法和酶底物法，现对国内外对

水中菌落总数测定的主要分析方法如下表所示。

表 10 国内外现有标准方法汇总

方法名称	方法原理	适用范围
水质 菌落总数的测定 平皿计数法 《HJ 1000-2018》	平皿法	地表水、地下水、生活污水和工业废水
《生活饮用水标准检验方法》 (GB/T 5750.12-2023)	平皿计数法 酶底物法	生活饮用水和水源水
《水环境中细菌总数的测定》 (EPA 40 CFR Part 136.9215)	酶底物法	水

菌落总数就是指在一定条件下（如培养基、培养温度和培养时间等）每毫升水样所生长出来的细菌总数。

本标准所采用的酶底物培养基含有多种独特的复合酶物质，每一种都针对不同的细菌酶设计，并且已包含了所有最普遍的介水传播的细菌，所有的酶底物在被分解时都产生相同的信号，无需稀释的条件下最大可检测到 738MPN/mL。若采用成品培养基，则无需在专业无菌室内操作，操作步骤简单且耗时较少，45~72 小时内读取结果均有效。酶底物法检测地下水中菌落总数具有菌类响应完全、结果判读准确、对试验环境要求不高等且检测效率高等明显的优势。

酶底物法测定水中菌落总数，尤其是针对地下水中菌落总数的酶底物法测定，为国内首次研制。

五、重大分歧或重难点的处理经过和依据

无。

六、预期效益（报批阶段填写）

包括预期的经济效益、社会效益和生态环境效益。

七、其他说明事项

无。

附件：

方法验证汇总报告

方法名称：水质 菌落总数的测定 酶底物法

项目主编单位：辽宁省河库管理服务中心（辽宁省水文局）

吕宝阔（高级工程师）

项目负责人及职称：

通讯地址：辽宁省沈阳市和平区十四纬路 5-2 号
18742484386

联系电话：

报告编写人及职称：李荧荧（高级工程师）

报告日期：2025 年 06 月 24 日

1 原始测试数据

1.1 实验室基本情况

附表 1 参加验证的人员情况登记表

姓名	性别	年龄	职务或职称	所学专业	工作年限	验证单位
李荧荧	女	39	高级工程师	分析化学	15	辽宁省锦州水文局
孙阳	女	35	工程师	食品科学与工程	10	
周鸿飞	男	39	工程师	化学工程与工艺	12	辽宁省抚顺水文局
周寒	女	38	高级工程师	环境科学	13	
孙岩	女	45	高级工程师	水利水电工程	23	辽宁省本溪水文局
万太斌	男	46	高级工程师	农业水利工程	22	
景丽彬	女	40	高级工程师	化学工程与工艺	17	辽宁省辽阳水文局
李芳雨	女	31	工程师	水文与水资源工程	9	
张静	女	42	高级工程师	应用化学	15	辽宁省朝阳水文局
刘阳	女	40	高级工程师	化学工程与工艺	15	
费卓越	男	37	高级工程师	应用化学	9	辽宁省葫芦岛水文局
胡耘赫	男	32	工程师	水利工程	9	

附表 2 仪器设备登记表

仪器名称	生产厂家	规格型号	性能状况	验证单位
立式高压蒸汽灭菌器	上海申安医疗器械厂	LDZX-30KBS	良好	辽宁省锦州水文局
生化培养箱	北京市永光明医疗器械有限公司	SPX250	良好	
紫外灯	北京博士创科技有限公司	366nm	良好	
立式高压蒸汽灭菌器	致微（厦门）仪器有限公司	GI54	良好	辽宁省抚顺水文局
生化培养箱	上海天恒医疗器械有限公司	SPX-250A-JBS	良好	
紫外灯	SPECTROLINE	CM-10A	良好	
立式高压蒸汽灭菌器	上海申安医疗器械厂	LDZX-50FB	良好	辽宁省本溪水文局
生化培养箱	菏泽市华强仪	HSP-250	良好	

仪器名称	生产厂家	规格型号	性能状况	验证单位
	器仪表有限公司			辽宁省辽阳水文局
紫外灯	北京博士创科技有限公司	BSC-366A	良好	
手提式高压蒸汽灭菌器	上海力辰邦西仪器科技有限公司	LC-BPS-18A	良好	
生化培养箱	天津市泰斯特仪器有限公司	DH4000B II	良好	
紫外灯	东莞市川谷照明科技有限公司	366nm	良好	辽宁省朝阳水文局
立式高压蒸汽灭菌器	上海申安医疗器械厂	LDZX-30FBS	良好	
生化培养箱	上海精宏实验设备有限公司	BNP-9272	良好	
紫外灯	北京博士创科技有限公司	366nm	良好	
手提式高压蒸汽灭菌器	上海申安医疗器械厂	DSX-280B	良好	辽宁省葫芦岛水文局
生化培养箱	天津市泰斯特仪器有限公司	SPX-150BXIII	良好	
紫外灯	北京中仪博腾科技有限公司	BOT-IA	良好	

附表 3 使用试剂登记表

名称	生产厂家、规格	纯化处理方法	验证单位
酶底物检测试剂盒	爱德士 (IDEXX Laboratories)、单剂 25 样品培养基+定量盘	无	辽宁省锦州水文局
	爱德士 (IDEXX Laboratories)、单剂 25 样品培养基+定量盘	无	辽宁省抚顺水文局
	爱德士 (IDEXX Laboratories)、单剂 25 样品培养基+定量盘	无	辽宁省本溪水文局
	爱德士 (IDEXX Laboratories)、单剂 25 样品培养基+定量盘	无	辽宁省辽阳水文局
	爱德士 (IDEXX Laboratories)、单剂 25 样品培养基+定量盘	无	辽宁省朝阳水文局
	爱德士 (IDEXX Laboratories)、单剂 25 样品培养基+定量盘	无	辽宁省葫芦岛水文局
葡萄糖	天津市天力化学试剂有限公司、500g/瓶	无	辽宁省锦州水文局
	天津市天力化学试剂有限公司、500g/瓶	无	辽宁省抚顺水文局
	天津市天力化学试剂有限公司、500g/瓶	无	辽宁省本溪水文局
	天津市天力化学试剂有限公司、501g/瓶	无	辽宁省辽阳水文局

名称	生产厂家、规格	纯化处理方法	验证单位
	天津市天力化学试剂有限公司、502g/瓶	无	辽宁省朝阳水文局
	天津市天力化学试剂有限公司、503g/瓶	无	辽宁省葫芦岛水文局
无水硫酸镁	天津市科密欧化学试剂有限公司、500g/瓶	无	辽宁省锦州水文局
	天津市科密欧化学试剂有限公司、500g/瓶	无	辽宁省抚顺水文局
	天津市科密欧化学试剂有限公司、500g/瓶	无	辽宁省本溪水文局
	天津市科密欧化学试剂有限公司、501g/瓶	无	辽宁省辽阳水文局
	天津市科密欧化学试剂有限公司、502g/瓶	无	辽宁省朝阳水文局
	天津市科密欧化学试剂有限公司、503g/瓶	无	辽宁省葫芦岛水文局
蛋白胨	北京陆桥技术股份有限公司、250g/瓶	无	辽宁省锦州水文局
	北京陆桥技术股份有限公司、250g/瓶	无	辽宁省抚顺水文局
	北京陆桥技术股份有限公司、250g/瓶	无	辽宁省本溪水文局
	北京陆桥技术股份有限公司、251g/瓶	无	辽宁省辽阳水文局
	北京陆桥技术股份有限公司、252g/瓶	无	辽宁省朝阳水文局
	北京陆桥技术股份有限公司、253g/瓶	无	辽宁省葫芦岛水文局
酵母提取物	北京麦克林生化科技股份有限公司、100g/瓶	无	辽宁省锦州水文局
	北京麦克林生化科技股份有限公司、100g/瓶	无	辽宁省抚顺水文局
	北京麦克林生化科技股份有限公司、100g/瓶	无	辽宁省本溪水文局
	北京麦克林生化科技股份有限公司、101g/瓶	无	辽宁省辽阳水文局
	北京麦克林生化科技股份有限公司、102g/瓶	无	辽宁省朝阳水文局
	北京麦克林生化科技股份有限公司、103g/瓶	无	辽宁省葫芦岛水文局
4-甲基伞形酮磷酸酯	山东科源生化有限公司、500mg/瓶	无	辽宁省锦州水文局
	山东科源生化有限公司、500mg/瓶	无	辽宁省抚顺水文局
	山东科源生化有限公司、500mg/瓶	无	辽宁省本溪水文局
	山东科源生化有限公司、501mg/瓶	无	辽宁省辽阳水文局

名称	生产厂家、规格	纯化处理方法	验证单位
	山东科源生化有限公司、502mg/瓶	无	辽宁省朝阳水文局
	山东科源生化有限公司、503mg/瓶	无	辽宁省葫芦岛水文局
4-甲基伞形酮- β -D-葡萄糖苷	山东科源生化有限公司、500mg/瓶	无	辽宁省锦州水文局
	山东科源生化有限公司、500mg/瓶	无	辽宁省抚顺水文局
	山东科源生化有限公司、500mg/瓶	无	辽宁省本溪水文局
	山东科源生化有限公司、501mg/瓶	无	辽宁省辽阳水文局
	山东科源生化有限公司、502mg/瓶	无	辽宁省朝阳水文局
	山东科源生化有限公司、503mg/瓶	无	辽宁省葫芦岛水文局
氯化钠	国药集团化学试剂有限公司、500g/瓶	无	辽宁省锦州水文局
	国药集团化学试剂有限公司、500g/瓶	无	辽宁省抚顺水文局
	国药集团化学试剂有限公司、500g/瓶	无	辽宁省本溪水文局
	国药集团化学试剂有限公司、500g/瓶	无	辽宁省辽阳水文局
	国药集团化学试剂有限公司、500g/瓶	无	辽宁省朝阳水文局
	国药集团化学试剂有限公司、501g/瓶	无	辽宁省葫芦岛水文局

1.2 方法精密度测试数据

六家验证单位对相同含量标准样品进行测定，对不同含量饮用水和地下水实际样品进行测定，得到精密度数据见附表 4~附表 9。

附表 4 精密度测试数据

平行号		试样				
		标准样品	饮用水	地下水 1	地下水 2	地下水 3
测定结果 (MPN/mL)	1	266	71	74	324	1240
	2	266	65	71	414	1080
	3	276	74	74	414	1120
	4	276	80	71	414	1160
	5	299	80	77	339	1040
	6	287	77	74	311	1280
平均值 (MPN/mL)		278	75	74	369	1153
标准偏差 S_i		0.02	0.03	0.01	0.06	0.03
相对标准偏差 RSD%		0.81	1.86	0.71	2.30	1.13

附表 5 精密度测试数据

平行号		试样				
		标准样品	饮用水	地下水 1	地下水 2	地下水 3
测定结果 (MPN/mL)	1	209	26	33	392	1080
	2	189	21	28	355	830
	3	189	21	33	392	1040
	4	231	19	33	470	800
	5	161	26	26	414	800
	6	177	28	30	440	1160
平均值 (MPN/mL)		193	24	31	411	952
标准偏差 S_i		0.05	0.07	0.04	0.04	0.07
相对标准偏差 RSD%		2.40	4.93	2.97	1.64	2.45

附表 6 精密度测试数据

平行号		试样				
		标准样品	饮用水	地下水 1	地下水 2	地下水 3
测定结果 (MPN/mL)	1	239	51	80	470	1280
	2	266	56	90	470	1280
	3	276	59	90	440	1370
	4	248	59	93	414	1240
	5	239	59	97	507	1320
	6	287	62	97	507	1200
平均值符号 (MPN/mL)		259	58	91	468	1282
标准偏差 S_i		0.03	0.03	0.03	0.03	0.02
相对标准偏差 RSD%		1.40	1.66	1.58	1.29	0.65

附表 7 精密度测试数据

平行号		试样				
		标准样品	饮用水	地下水 1	地下水 2	地下水 3
测定结果 (MPN/mL)	1	209	4	86	257	1710
	2	189	4	86	231	1610
	3	183	4	93	266	1610
	4	189	4	86	257	1710
	5	202	4	90	266	1660
	6	202	4	90	266	1610
平均值 (MPN/mL)		196	4	89	257	1652
标准偏差 S_i		0.02	0.00	0.01	0.02	0.01
相对标准偏差 RSD%		0.98	0.00	0.74	0.98	0.40

附表 8 精密度测试数据

平行号		试样				
		标准样品	饮用水	地下水 1	地下水 2	地下水 3
测定结果 (MPN/mL)	1	248	71	68	132	1370
	2	266	68	56	120	1320
	3	231	74	65	141	1460
	4	248	62	62	124	1280
	5	223	71	68	116	1320
	6	257	68	65	146	1510
平均值 (MPN/mL)		246	69	64	130	1377
标准偏差 S_i		0.03	0.03	0.03	0.04	0.03
相对标准偏差 RSD%		1.20	1.43	1.76	1.88	0.89

附表 9 精密度测试数据

平行号		试样				
		标准样品	饮用水	地下水 1	地下水 2	地下水 3
测定结果 (MPN/mL)	1	209	12	80	276	3390
	2	239	15	74	257	3550
	3	231	17	71	202	3550
	4	231	17	71	223	3720
	5	209	15	80	209	3390
	6	209	15	74	209	3550
平均值 (MPN/mL)		221	15	75	229	3525
标准偏差 S_i		0.03	0.06	0.02	0.06	0.02
相对标准偏差 RSD%		1.15	4.68	1.26	2.34	0.43

1.3 方法正确度测试数据

六家验证单位对含量为 229MPN/mL，可接受范围为（115～344）MPN/mL 的标准样品进行测定，得到正确度数据见附表 10~附表 15。

附表 10 正确度测试数据

验证单位：辽宁省锦州水文局

平行号		标准样品	
		测定结果	对数值
测定结果 (MPN/mL)	1	223	2.35
	2	248	2.39
	3	231	2.36
	4	231	2.36
	5	248	2.39
	6	239	2.38
平均值 (MPN/mL)		237	2.37
标准样品标准值 (MPN/mL)		229	2.36
相对误差 REi%			0.61
备注：测定结果为平行双样结果的平均值			

附表 11 正确度测试数据

验证单位：辽宁省抚顺水文局

平行号		标准样品	
		测定结果	对数值
测定结果 (MPN/mL)	1	209	2.32
	2	189	2.28
	3	189	2.28
	4	231	2.36
	5	161	2.21
	6	177	2.25
平均值 (MPN/mL)		193	2.29
标准样品标准值 (MPN/mL)		229	2.36
相对误差 REi%			-3.15
备注：测定结果为平行双样结果的平均值			

附表 12 正确度测试数据

验证单位：辽宁省本溪水文局

平行号		标准样品	
		测定结果	对数值
测定结果 (MPN/mL)	1	239	2.38
	2	266	2.42
	3	276	2.44
	4	248	2.39
	5	239	2.38
	6	287	2.46
平均值 (MPN/mL)		259	2.41
标准样品标准值 (MPN/mL)		229	2.36
相对误差 REi%			2.27
备注：测定结果为平行双样结果的平均值			

附表 13 正确度测试数据

验证单位：辽宁省辽阳水文局

平行号		标准样品	
		测定结果	对数值
测定结果 (MPN/mL)	1	209	2.32
	2	189	2.28
	3	183	2.26
	4	189	2.28
	5	202	2.31
	6	202	2.31
平均值 (MPN/mL)		196	2.29
标准样品标准值 (MPN/mL)		229	2.36
相对误差 REi%			-2.86
备注：测定结果为平行双样结果的平均值			

附表 14 正确度测试数据

验证单位：辽宁省朝阳水文局

平行号		标准样品	
		测定结果	对数值
测定结果 (MPN/mL)	1	248	2.39
	2	266	2.42
	3	231	2.36
	4	248	2.39
	5	223	2.35
	6	257	2.41
平均值 (MPN/mL)		246	2.39
标准样品标准值 (MPN/mL)		229	2.36
相对误差 REi%			1.32
备注：测定结果为平行双样结果的平均值			

附表 15 正确度测试数据

验证单位：辽宁省葫芦岛水文局

平行号		标准样品	
		测定结果	对数值
测定结果 (MPN/mL)	1	209	2.32
	2	239	2.38
	3	231	2.36
	4	231	2.36
	5	209	2.32
	6	209	2.32
平均值 (MPN/mL)		221	2.34
标准样品标准值 (MPN/mL)		229	2.36
相对误差 REi%			-0.65
备注：测定结果为平行双样结果的平均值			

2 方法验证数据汇总

2.1 方法精密度数据汇总

附表 16 各实验室精密度验证结果

实验室号	标准样品			饮用水			地下水 1			地下水 2			地下水 3		
	平均值	Si	RSD%	平均值	Si	RSD%	平均值	Si	RSD%	平均值	Si	RSD%	平均值	Si	RSD%
1	278	0.02	0.00	75	0.03	1.86	74	0.01	0.71	369	0.06	2.30	1153	0.03	1.13
2	193	0.05	2.40	24	0.07	4.93	31	0.04	2.97	411	0.04	1.64	952	0.07	2.45
3	259	0.03	1.40	58	0.03	1.66	91	0.03	1.58	468	0.03	1.29	1282	0.02	0.65
4	196	0.02	0.98	4	0.00	0.00	89	0.01	0.74	257	0.02	0.98	1652	0.01	0.40
5	246	0.03	1.20	69	0.03	1.43	64	0.03	1.76	130	0.04	1.88	1377	0.03	0.89
6	221	0.03	1.15	15	0.06	4.68	75	0.02	1.26	229	0.06	2.34	3525	0.02	0.43

结论：六家实验室对含量为 229MPN/mL 的统一标准样品和四种不同含量的实际样品进行测定，实验室内相对标准偏差为 0.00 %~2.40 %、0.00 %~4.93 %、0.71%~2.97 %、0.98 %~2.34 %、0.40%~2.45%。

2.2 方法正确度数据汇总

附表 17 各实验室正确度验证结果

实验室号	平均值	RE%(相对误差)
1	2.37	0.61
2	2.29	-3.15
3	2.41	2.27
4	2.29	-2.86
5	2.39	1.32
6	2.34	-0.65
平均值	2.35	
真值	2.36	
$\overline{RE}$ (%)	-0.41	
S_{RE} (%)	2.23	
备注：表内的计算结果都是以相应样品结果的常用对数值计算得来。		

结论：六家实验室对含量为 229MPN/mL 的标准样品进行测定，相对误差为-3.15%~2.27%，相对误差最终值分别为-0.41%±4.46%。

