



中华人民共和国国家计量技术规范

JJF-XXXX-XXXX

生物降解试验中接种物活性 定量测量方法

Quantitative Measurement Method for Activity of Inoculum in
Biodegradation Tests

(征求意见稿)

XXXX-XX-XX发布 XXXX-XX-XX实施

国家市场监督管理总局发布

生物降解试验中接种物 活性定量测量方法

Quantitative Measurement Method

for Activity of Inoculum in

Biodegradation Tests

归口单位：全国生物计量技术委员会

主要起草单位：上海市检测中心

参加起草单位：中国计量科学研究院

环境保护部固体废物与化学品管理技术中心

本规范委托全国生物计量技术委员会负责解释

本规范主要起草人：

参加起草人：

目录

引言.....	II
1 范围.....	1
2 引用文件.....	1
3 术语和计量单位.....	1
3.1 生物降解试验.....	1
3.2 相对光单位.....	1
4 概述.....	2
5 校准条件.....	2
5.1 仪器.....	2
5.2 试剂.....	2
5.3 材料.....	2
5.4 环境条件.....	3
6 样品测定方法.....	3
6.1 ATP 标准曲线及相关参数.....	3
6.2 样品制备.....	3
6.3 样品 ATP 含量测定.....	4
6.4 样品细胞数的计算.....	4
7 质量控制.....	5
8 不确定度的评定及表述.....	5
9 参考文献.....	6
附录 A.....	7
附录 B.....	8
附录 C.....	12
附录 D.....	14

引言

本规范主要参考 ASTM D4012-15 《水中微生物三磷酸腺苷（ATP）含量标准检测方法》 [Standard Test Method for Adenosine Triphosphate (ATP) Content of Microorganisms in Water]和 JJF 1828-2020 《ATP 荧光检测仪校准规范》制定。

本规范为首次发布。

生物降解试验中接种物活性定量测量方法

1 范围

本方法适用于生物降解试验中接种物活性的定量测定。

2 引用文件

本规范引用了下列文件：

JJF 1828-2020 《ATP 荧光检测仪校准规范》

JJG196-2006 《常用玻璃量具》

JJF1135-2005 《化学分析测量不确定度评定》

CNAS-GL006 2019 《化学分析中不确定度的评估指南》

凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本规范；凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本规范。

3 术语和计量单位

3.1 生物降解试验 biodegradation test

评估受试物被接种物（一般含微生物）分解为 CO₂、水、矿物盐和新的细胞成分（生物量）的降解能力的试验。

注 1：生物降解性是物质危害性鉴别和风险评估的重要数据。生物降解试验方法可参考经济合作与发展组织(Organization for Economic Co-operation and Development, OECD)的《化学品测试准则》(Guidelines for the Testing of Chemicals) 和环境保护部《化学品测试方法-降解与蓄积卷》等有关标准。

注 2：接种物可以有多种来源，包括活性污泥；地表水和土壤；或这几种的混合物，也有很多预处理方法，如离心法、沉降法等。接种物中微生物的数量和丰度是影响生物降解试验结果的重要因素。

3.2 相对光单位 relative light unit, RLU

三磷酸腺苷(Adenosine Triphosphate, ATP)水解成一磷酸腺苷(Adenosine Monophosphate, AMP)和焦磷酸盐时释放化学能驱动荧光素在荧光素酶催化下氧化释放的光量子数的测量单位。

注：非 SI 单位，但与 ATP 浓度成比例关系。不同的检测仪对于同样的样品可能会产生不同的 RLU 读数。

4 概述

接种物的活性可以用单位体积内的活细胞数量表示。ATP 作为生物能量代谢过程中最重要的中间产物，其多寡直接反映微生物能量代谢的活性，进而换算为活细胞数。接种物中的 ATP 经提取后，在荧光素酶的作用下与荧光素结合产生 550nm 左右的生物发光。在一定范围内，荧光强度与 ATP 浓度成正比例关系。荧光强度用 ATP 荧光检测仪测定，结果用相对光单位（RLU）表示。根据相对光单位 RLU 值可以推算出接种物中的 ATP 浓度（nmol/L）。

通常每个细胞中的 ATP 含量相对恒定，约 $5 \times 10^{-16} \sim 5 \times 10^{-15} \text{g}^{[1]}$ （约 $10^{-9} \sim 10^{-8} \text{nmol}$ ）。由此可以计算得到接种物中的活细胞浓度，从而判定其活性是否符合相关试验要求。

5 测量条件

5.1 仪器

5.1.1 移液器：（1~10） μL ，（10~100） μL （或（20~200） μL ），（100~1000） μL 各 1 支，经检定合格。

5.1.2 电子天平：分度值 0.01mg，经检定合格。

5.1.3 ATP 荧光检测仪：经检定合格。

5.2 试剂

5.2.1 ATP 纯度有证标准物质

5.2.2 ATP 检测试剂：主要包括 ATP 提取剂、荧光素和荧光素酶。

注：建议使用含有 ATP 提取剂的商业化 ATP 检测试剂盒，具体依据试剂生产厂家的要求实施。

5.2.3 高压灭菌水或无菌水：要求无菌、无 ATP。

5.2.4 其它制备样品过程中需要的试剂。

注：采用符合经济合作与发展组织（OECD）的《化学品测试准则》和环境保护部《化学品测试方法-降解与蓄积卷》等有关标准、商业化接种物的使用说明或其它相关作业指导书规定的试剂。参见表 B.1（附录 B）。

5.3 材料

除非特别指明，实验过程中用到的材料，都应无菌，无 ATP。

5.3.1 离心管：2mL（或 5mL，10mL 等）。

5.3.2 96 孔板或其它与 ATP 荧光检测仪适配的器皿

注：建议使用不透光的 96 孔白板或黑板，以减少临近孔间的相互干扰。

5.3.3 其它制备样品过程中需要的材料。

注：具体按照经济合作与发展组织（OECD）的《化学品测试准则》和环境保护部《化学品测试方法-降解与蓄积卷》等有关标准、商业化接种物的使用说明或其它相关作业指导书实施。参见附录 B.2。

5.4 环境条件

5.4.1 温度：（20-25）℃

6 样品测定方法

6.1 ATP 标准曲线及相关参数

1) 用移液器分别移取至少 5 个浓度的 ATP 标准工作溶液，与荧光素-荧光素酶混合试剂混合反应。

注：建议的 ATP 标准溶液浓度点为：0.1nmol/L、1nmol/L、10nmol/L、100nmol/L 和 1000nmol/L（根据实际情况可适当调整范围）。

2) 用 ATP 荧光检测仪检测并记录荧光示值 RLU。

3) 每个浓度 ATP 标准工作溶液进行 3 次测定，以 3 次重复测定的荧光 RLU 示值的平均值作为该浓度 ATP 标准工作溶液的仪器示值 RLU。

4) 以仪器示值 RLU (y) 和 ATP 标准溶液浓度 (x) 绘制标准曲线，进行线性拟合，得到校准方程。按式 (1) 计算相关系数 r ，取 $r \geq 0.995$ 的浓度范围作为线性范围。若 $r < 0.995$ 时，根据实际情况适当调整浓度点，重新绘制标准曲线，直到相关系数 r 满足要求。

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \times \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} \quad (1)$$

式中，

r ——线性相关系数；

x_i ——第 i 个测量点的 ATP 标准溶液浓度，nmol/L；

\bar{x} ——用于计算线性范围的测量点的 ATP 标准溶液浓度的平均值，nmol/L；

y_i ——第 i 个测量点的仪器示值，RLU；

\bar{y} ——用于计算线性范围的测量点的仪器示值的平均值，RLU；

n ——用于计算限定范围的测量点的个数。

6.2 样品制备

测试样品是根据经济合作与发展组织（OECD）的《化学品测试准则》和环

境保护部《化学品测试方法-降解与蓄积卷》等有关标准、商业化接种物的使用说明或其它相关作业指导书等配制的浓度适宜的接种物悬液。

6.3 样品 ATP 含量测定

样品 ATP 含量测定应在样品制备完成后的 24 小时内完成。具体步骤如下：

- (1) 用移液器取样品溶液，加入 ATP 提取剂处理，释放 ATP；
- (2) 加入荧光素-荧光素酶混合试剂，充分混合反应；

注：步骤（1）和（2）可调整，具体依据试剂生产厂家的要求实施。

- (3) 用 ATP 荧光检测仪检测并记录荧光示值 RLU。

注：建议尽可能使样品溶液的 RLU 示值位于系列标准溶液 RLU 示值的中间。

(4) 重复测定 6 次。以 6 次测定结果的相对标准偏差（RSD 值）表示测量的重复性。按式（2）计算测量的重复性。

$$RSD = \frac{1}{\bar{R}} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (R_i - \bar{R})^2}{n-1}} \times 100\% \quad (2)$$

式中，

RSD——测量的重复性（相对标准偏差），%；

R_i ——第 i 个测量的结果，RLU；

\bar{R} —— n 次测量结果的平均值，RLU；

n ——测量次数。

6.4 样品细胞数的计算

将 6.3 中 6 次测定结果的平均值（RLU），代入 6.1 中得到的校准方程中，计算得到样品的 ATP 浓度的测定值（nmol/L）。按式（3）计算样品中的活细胞数 C_{cell} （个/L）范围。

$$C_{cell} = \frac{C \times V_1}{a \cdot V} \quad (3)$$

式中，

C ——由标准曲线测试样品溶液中 ATP 的含量，nmol/L；

V_1 ——样品稀释后总体积，L；

V ——样品体积，L；

a ——每个细胞中的 ATP 含量的理论值 $10^{-9} \sim 10^{-8}$ nmol。

7 质量控制

- (1) 以仪器示值 RLU (y) 和 ATP 标准溶液浓度 (x) 绘制标准曲线的相关系数 r 应不小于 0.995;
- (2) 单样品 6 次测量结果的重复性不得超过 10%;
- (3) 测量过程中应保证所有仪器设备的计量有效性;

8 不确定度的评定及表述

使用 ATP 法进行生物降解试验中接种物活性的定量中测量结果的不确定度来源包括样品体积 (V) 引入的相对标准不确定度 $u_{rel(v)}$ 、浓度 (C) 引入的相对标准不确定度 $u_{rel(c)}$ 。

测量结果的合成不确定度表示为:

$$u_c [y(x_1, x_2, \dots, x_n)] = \sqrt{\sum_{i=1}^n c_i^2 u(x_i)^2} \quad (4)$$

其中, $y(x_1, x_2, \dots, x_n)$ 为几个参数 x_1, x_2, \dots 的函数, c_i 为灵敏系数 (当各不确定度分量相互独立时, 灵敏系数为 1)。

ATP 法进行生物降解试验中接种物活性的定量中各不确定度分量相互独立, 因此, 测量结果的相对合成不确定度表示为:

$$u_{rel} = \sqrt{u_{rel(v)}^2 + u_{rel(c)}^2} \quad (5)$$

$$\text{相对扩展不确定度表示为: } U_{rel} = u_{rel} \times k \quad (k=2) \quad (6)$$

表 1 测量结果的不确定度评定表

不确定度分量	引入不确定度来源	评定类型	相对标准不确定度
$u_{rel(v)}$	测试样品体积及稀释体积	B	可忽略
	环境温度变化	B	
$u_{rel(c)}$	标准物质纯度	B	
	标准曲线线性拟合	B	
	测量结果重复性	A	
	ATP 荧光检测仪	B	

生物降解试验中接种物中 ATP 浓度为 $X = \bar{X} \pm \bar{X} \cdot U_{rel}$ nmol/L，样本中的活细胞浓度范围为 $N_1 \sim N_2$ 个/L。

9 参考文献

[1] ASTM D4012-15 水中微生物三磷酸腺苷 (ATP) 含量标准检测方法 [Standard Test Method for Adenosine Triphosphate (ATP) Content of Microorganisms in Water]

附录 A

ATP 系列标准溶液的配制

A.1 试剂与材料

A.1.1 ATP 纯度有证标准物质

A.1.2 高压灭菌水或无菌水：要求无菌、无 ATP。

A.1.3 离心管：2mL，要求无菌、无 ATP。

A.2 仪器

A.2.1 电子天平：分度值 0.01mg，经检定合格。

A.2.2 移液器：经检定合格。

A.3 ATP 系列标准溶液的配制

精确称取 ATP 标准物质 1.00mg(精确到 0.01mg)，置于离心管中，加水 1.75mL 充分溶解混匀，得到 ATP 标准母液，浓度为 1×10^6 nmol/L。每次临用前新鲜配制。

取 ATP 标准母液 100 μ L，置于离心管中，加水 9900 μ L，混匀，得到 ATP 标准中间液，浓度为 1×10^4 nmol/L。

取浓度为 1×10^4 nmol/L 的 ATP 标准中间液 100 μ L，置于离心管中，加水 900 μ L，混匀，得到 ATP 标准工作液，浓度为 1000 nmol/L。

重复上一步稀释方法，通过 10 倍梯度稀释，得到系列 ATP 标准工作液，浓度依次为 100nmol/L、10nmol/L、1nmol/L、0.1nmol/L。

附录 B

应用实例

生物降解试验中接种物活性定量测量方法

B.1 仪器与试剂

B.1.1 仪器

- 1) KMM700 系列多功能搅拌机 (KENWOOD, KMM700) ;
- 2) 高速大容量离心机 (BECKMAN COULTER, J-26XP) ;
- 3) 水份仪 (Mettler Toledo, HG63) ;
- 3) 电子天平 (Mettler Toledo, ME2002E/02) , 分度值 0.01mg;
- 4) 板式化学发光检测仪 (Berthold, Orion II) , 线性误差的扩展不确定度 ($k=2$) 为 9.3。

B.1.2 试剂

- 1) ATP 纯度有证标准物质: 按附录 A 配制 ATP 系列标准溶液。
- 2) ATP 检测试剂试剂盒: BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay (BacTiter-Glo™ 微生物细胞活力检测试剂盒, Promega, SN. G8230)
- 3) 高压灭菌水或无菌水: 要求无菌、无 ATP。
- 4) 矿质培养基: 按表 B.1 配制。

表 B.1 矿质培养基配制方法

贮备液	成分	浓度 (g/L)
贮备液 (a)	KH ₂ PO ₄	8.50
	K ₂ HPO ₄	21.75
	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	33.40
	NH ₄ Cl	0.5
贮备液 (b)	CaCl ₂	27.50
	或 CaCl ₂ ·2H ₂ O	36.40
贮备液 (c)	MgSO ₄ ·7H ₂ O	22.50
贮备液(d)	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.25
矿质培养基	将 10mL 溶液 (a) 加 800mL 无菌水, 再加溶液 (b)、(c) 和 (d) 1mL, 加无菌水定容到 1L, 用 HCl 或 NaOH 调 pH 到 7.2- 7.4。矿质培养基现配现用, 不保存。如果贮备液出现沉淀, 则需重新配制。	

注: 贮备液用分析纯试剂配制。

B.2 样品制备

样品为自某生活污水处理厂曝气池采集活性污泥。污水处理厂的处理工艺为厌氧好氧法（A/O）。污泥使用前保持曝气状态（尽可能减少从污水处理厂到实验室的转运未曝气状态）。其制备过程如下：

- 1) 用矿质培养基清洗污泥，每次加入矿质培养基混匀后，4000rpm，4℃，离心20min。离心分离后去除上清液，该程序重复3次。
- 2) 取0.4-0.5g洗过的污泥用水分仪（试验条件为105℃，1h）测定干重。
- 3) 根据处理后污泥干重计算配制污泥悬浮液所需取用污泥的量。取适量离心过的污泥分散于1L的矿质培养基，配制干重浓度为3g/L的活性污泥悬浮液，搅拌器搅匀后搅拌曝气待用。
- 4) 取浓度为3g/L的活性污泥悬液100mL，加矿质培养基900mL，混匀，得到浓度为300mg/L的活性污泥悬浮液。
- 5) 取浓度为300mg/L的活性污泥悬液100mL，加矿质培养基900mL，混匀，得到浓度为30mg/L的活性污泥悬浮液。

B.3 ATP 标线的测定

1) 按 Promega 提供的说明书，将试剂盒中 10mL BacTiter-Glo™ 缓冲液转移到 BacTiter-Glo™ 冻干粉中混匀溶解，得到底物溶液。

注：未开封的试剂盒在-20℃下保存。使用前需将 BacTiter-Glo™ 缓冲液恢复至室温。试验结束后，若溶液有剩余，可在-20℃下保存 7 天或在-80℃下保存 30 天。

2) 将 100μL 底物溶液分别于 100μL 不同浓度的 ATP 标准工作液混合，室温振荡 1min。

3) 将反应液放入板式化学发光检测仪中，测定反应液的荧光值 RLU。

4) 每个浓度的 ATP 标准工作液进行 3 次重复测定，取以 3 次重复测定的荧光 RLU 示值的平均值作为该浓度 ATP 标准工作溶液的仪器示值 RLU。

5) 以仪器示值 RLU (y) 和 ATP 标准工作溶液浓度 (x) 绘制标准曲线，进行线性拟合，得到校准方程，计算相关系数 r 。

表 B.2 ATP 标准工作溶液的测定结果

序号 i	ATP 浓度 x_i (nmol/L)	各浓度标准工作溶液的仪器示值 y_i (RLU)		标准曲线	线性相关系数 r
		实测值	平均值		
1	0.1	1782	1743	$y = 23858x -$	1

		1712		22929	
		1736			
2	1	15089	15086		
		15167			
		15003			
3	10	182618	181288		
		181263			
		179983			
4	100	2364229	2360155		
		2351123			
		2365112			
5	1000	23832476	23835304		
		23827551			
		23845885			

B.4 活性污泥 ATP 的测定

1) 移取 100 μ L 30mg/L 活性污泥悬液，至无菌 96 孔板中，加入 100 μ L 底物溶液，室温振荡反应 5min。

2) 将反应液放入板式化学发光检测仪中，测定反应液的荧光值 RLU。若该示值大于标准曲线中最高浓度点对应的 RLU 值或低于标准曲线最低浓度点对应的 RLU 值，增大或减小活性污泥悬液的浓度直到检测示值 RLU 在标准曲线范围内。

3) 重复测定 6 次，计算测量的重复性。

表 B.3 样品溶液的测定结果

编号	1	2	3	4	5	6
仪器荧光示值 RLU	210275	206355	227002	234751	204421	217837
样本溶液的仪器示值 RLU (平均值)	216774					
重复性 RSD %	5.10					

B.5 接种物活细胞浓度的计算

1) 计算 B.3 中 6 次重复测定的 RLU 示值的平均值, 代入 B.1 中数据得到的标准方程中, 计算得到此样品溶液中的 ATP 浓度的测定值。

2) 计算 30mg/L 活性污泥悬液中的活细胞浓度 C_{cell} 。

表 B.4 30mg/L 活性污泥悬液的活细胞浓度

样本溶液的仪器示值 RLU (平均值)	由校准方程求得的样本溶液 中 ATP 浓度的测定 nmol/L	样本中的活细胞浓度 C_{cell} , 个/L
216774	10.1	$1.01 \times 10^9 \sim 1.01 \times 10^{10}$

注: 每个细胞中的 ATP 含量的理论值为 $10^{-9} \sim 10^{-8}$ nmol。

B.6 测量不确定度的计算

根据第 9 条中对不确定度评定的描述, 对生物降解试验中接种物活性定量测量结果的不确定进行评定, 评定包括了样品体积 (V) 引入的相对标准不确定度 $u_{rel(v)}$ 、浓度 (C) 引入的相对标准不确定度 $u_{rel(c)}$ 。由表 B.5 给出了各不确定度分量评定结果。

表 B.5 ATP 法定量生物降解试验中接种物活性测量结果的不确定度评定

标准不确定度分量	引入不确定度来源	评定类型	相对标准不确定度
$u_{rel(v)}$	测试样品体积及稀释体积	B	1.58×10^{-3}
	环境温度变化	B	可忽略
$u_{rel(c)}$	标准物质纯度	B	3.80×10^{-5}
	标准曲线线性拟合	B	0.45
	测量结果重复性	A	0.02
	ATP 荧光检测仪	B	2.15×10^{-5}

根据公式 (5) 和 (6), 计算相对合成标准不确定度 $u_{rel} = 0.45$, 相对扩展不确定度 $U_{rel} = 0.9$ 。

B.7 结论

30mg/L 活性污泥悬液中 ATP 的浓度为 10.1 nmol/L, 样本中的活细胞数范围为 $1.01 \times 10^9 \sim 1.01 \times 10^{10}$ 个/L, $U=0.9$ 。

附录 C

原始记录格式

(推荐性表格)

测试单位:

测试日期: 年月日

样品名称:

来源:

样品浓度 (可选):

ATP 荧光检测仪名称:

生产厂商:

规格型号:

ATP 检测试剂名称:

生产厂商:

货号:

测试地点:

环境温度: °C

相对湿度: %

ATP 标准物质溶液母液的配制:

ATP 称样量: mg, 溶于 1.75mL 超纯水中, 母液浓度: nmol/L

表 C.1 校准用 ATP 标准工作溶液的测定结果

序号 i	ATP 浓度 x_i (nmol/L)	各浓度标准工作溶液的仪器示值 y_i (RLU)		标准曲线	线性相关系数 r
		实测值	平均值		
1					
2					
3					
4					
5					

表 C.2 样品溶液 (BOD seed) 的测定结果

编号	1	2	3	4	5	6
仪器荧光示值 RLU						
样品溶液的仪器示值 RLU (平均值)						
重复性 RSD %						

表 C.3 样品溶液的活细胞浓度

样品溶液的仪器示值 RLU (平均值)	由校准方程求得的样品溶液中 ATP 浓度的测定 nmol/L	样品中的活细胞浓度 C_{cell} , 个/L

附录 D

测试报告内页推荐格式

D.1 测试报告内页

报告编号 XXXXXX-XXXX

测试所参考的技术文件（代号、名称）：			
测试环境条件及地点：			
温 度	℃	地 点	
相对湿度	%RH	其 他	
测试使用的主要设备			
名称/型号	测量范围	不确定度/准确度等级/ 最大允许误差	检定/校准证书编号/ 有效期

第 X 页共 X 页

报告编号 XXXXXX-XXXX

测试结果

测试项目及结果:

测试项目	测试结果
样品名称	
活细胞浓度 (个/L)	
重复性RSD% (n=6)	

——以下空白——

第 X 页共 X 页