

# 中华人民共和国国家标准

## 工业循环冷却水中粘液形成菌的测定 平皿计数法

GB/T 14643.1—93

Industrial circulating cooling water—  
Examination of bacteria formed deposits  
—Standard of plate count

### 1 主题内容与适用范围

本标准规定了工业循环冷却水中粘液形成菌的测定方法。

本标准适用于工业循环冷却水中悬浮的粘泥中的异养菌的测定。也适用于工业循环冷却水中沉积的粘泥中异养菌的测定,还适用于原水,生活用水及其他水中粘液异养菌的测定。

### 2 引用标准

GB 603 化学试剂 试验方法所用制剂及制品的制备。

GB 6682 分析实验室用水规格和试验方法

### 3 方法提要

本法采用 25 号浮游生物网收集循环冷却水中的粘泥,所得的粘泥用石英砂充分研磨使细胞分散,再利用平皿计数技术在  $29\pm 1^{\circ}\text{C}$  培养 72h 来测定粘泥中的异养菌总数。

### 4 试剂和材料

本试验测定方法中,除特殊规定外,应使用分析纯试剂和符合 GB 6682 中三级水规格的水。

- 4.1 牛肉膏:生化试剂;
- 4.2 蛋白胨:生化试剂;
- 4.3 氯化钠(GB 1266);
- 4.4 琼脂:生物试剂;
- 4.5 氢氧化钠(GB 629):40g/L 溶液;
- 4.6 盐酸(GB 622)溶液:1+11;
- 4.7 乙醇(GB 678)溶液:75%(V/V);
- 4.8 牛皮纸;
- 4.9 医用脱脂棉;
- 4.10 医用脱脂纱布;
- 4.11 石英砂:210~150 $\mu\text{m}$ 。

## 5 仪器和设备

- 5.1 25号浮游生物网；
- 5.2 量筒:25mL；
- 5.3 量筒:500mL；
- 5.4 转子流量计；
- 5.5 瓷研钵；
- 5.6 无菌箱(室)或超净工作台；
- 5.7 蒸汽压力灭菌器；
- 5.8 生化培养箱；
- 5.9 电热干燥箱:温度可控制在 $60\sim 280\pm 2^{\circ}\text{C}$ ；
- 5.10 刻度吸管:1mL；
- 5.11 刻度吸管:5mL；
- 5.12 磨口三角瓶:100mL；
- 5.13 容量瓶:1 000mL；
- 5.14 培养皿: $\phi 90\text{mm}$ ；
- 5.15 三角瓶:500mL；
- 5.16 搪瓷量杯:1 000mL。

## 6 试验前的准备

### 6.1 培养基的制备

称取下列试剂:

- 牛肉膏 3.0g；
- 蛋白胨 10.0g；
- 氯化钠 5.0g；
- 琼脂 15.0g。

将上述试剂加水约950mL,在电炉上加热溶解后,趁热用四层医用脱脂纱布过滤于搪瓷量杯中,并用热水补充至1 000mL。用氢氧化钠溶液(4.5)或盐酸溶液(4.6)调节pH值至 $7.2\pm 2$ ,并分装在500mL三角瓶中,每瓶分装量不超过其总容量的2/3。塞上棉塞,用牛皮纸把瓶口包好,用蒸汽压力灭菌器 $121\pm 1^{\circ}\text{C}$ 灭菌15min。

### 6.2 无菌稀释水的制备

6.2.1 生理盐水的配制:称取8.50g氯化钠溶解在1 000mL水中,混匀。

6.2.2 将生理盐水(6.2.1)分装在100mL磨口三角瓶中,每个三角瓶塞子和瓶口间插入一小纸片,塞紧瓶塞,每个瓶子的瓶口均用牛皮纸包扎以防污染,用蒸汽压力灭菌器 $121\pm 1^{\circ}\text{C}$ 灭菌15min。

### 6.3 刻度吸管的灭菌

6.3.1 将洗净并烘干后的吸管粗端塞上医用脱脂棉,棉花量要适宜,长度大约10~15mm,棉花不宜露在口外,多余的棉花可以用火焰烧掉。

6.3.2 每支刻度吸管用1条约40~50mm宽的牛皮纸条,以 $45^{\circ}$ 左右角度螺旋形卷起来,吸管的尖端在头部,粗端用多余的纸条折叠打结,不使散开,标上量度,若干支扎成一束,置电热干燥箱中,于 $160\pm 2^{\circ}\text{C}$ 灭菌2h。

### 6.4 培养皿的灭菌

将洗净并烘干后的培养皿10个左右叠在一起,用牛皮纸卷成一筒,置电热干燥箱中,于 $160\pm 2^{\circ}\text{C}$ 灭菌2h。

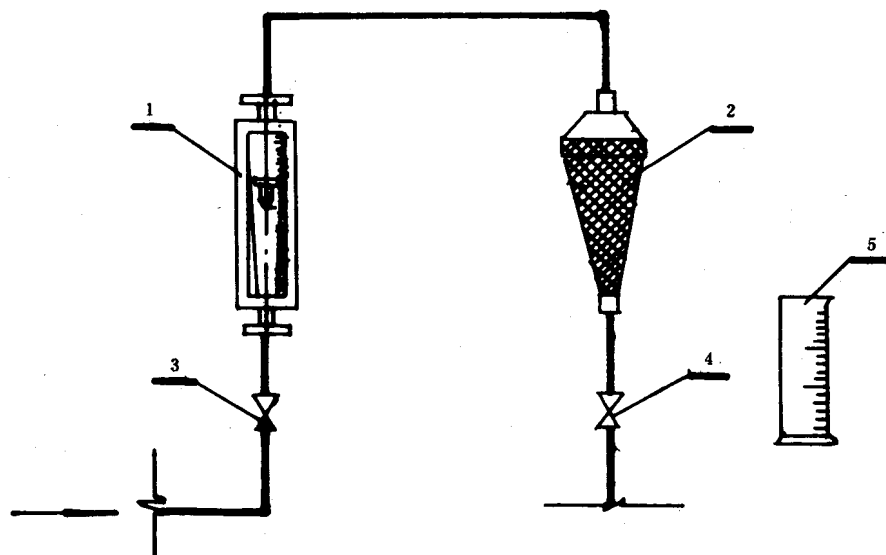
## 6.5 石英砂灭菌

将洗净烘干后的石英砂装入磨口三角瓶中,按(6.2.2)包扎、灭菌。

## 7 测定步骤

### 7.1 样品的采集

7.1.1 采集粘泥装置见下图。



1—转子流量计;2—浮游生物网;3—J11X-10 截止阀;4—X43W-10 旋塞阀;5—量筒

7.1.2 调节采样装置中阀门,使冷却水的流速控制在  $0.8\text{m/s}$  左右,水流量在  $1\text{m}^3/\text{h}$  左右,然后关上浮游生物网旋塞阀,过滤  $1\text{m}^3$  水。

7.1.3 关闭水阀,取下浮游生物网,打开旋塞阀,将粘泥收集在  $500\text{mL}$  量筒内,用自来水冲洗滤网,洗涤液也收集在  $500\text{mL}$  量筒内,沉淀  $30\text{min}$  后倾出上层清液。将剩余浊液转移至  $25\text{mL}$  量筒内,静止  $30\text{min}$ ,记录沉淀出的粘泥体积。

以  $\text{mL}/\text{m}^3$  表示循环冷却水中的粘泥量,粘泥量( $V$ )按式(1)计算:

$$V = \frac{V_2}{V_1} \dots\dots\dots (1)$$

式中:  $V_2$ ——量筒中粘泥体积,  $\text{mL}$ ;

$V_1$ ——通过浮游生物网过滤的循环水量,  $\text{m}^3$ 。

7.1.4 用无菌吸管移去  $25\text{mL}$  量筒内的上清液,将量筒内的粘泥或部分粘泥(7.1.3)转移至洗净并烘干后瓷研钵中,加入约  $2\text{g}$  灭过菌的石英砂(6.5),充分研磨后转移至  $1\,000\text{mL}$  洗净并烘干后的容量瓶中,用无菌稀释水稀释至刻度,充分混匀,并立即进行测定。

### 7.2 无菌箱(室)灭菌

把试验所用的无菌稀释水,无菌培养皿、无菌吸管等用品放入无菌箱(室)内,打开紫外线灯灭菌  $30\text{min}$ 。

### 7.3 水样的稀释和接种

7.3.1 粘泥水样(7.1.4)放入灭过菌的无菌箱(室)(7.2)中,立即用  $75\%(V/V)$  乙醇溶液浸泡的医用脱脂棉球擦手,点燃无菌箱(室)内的酒精灯。

7.3.2.~7.3.7 的操作应在无菌箱(室)内的火焰区进行。

7.3.2 选择适宜的稀释度,应使最后一个稀释度接种后平皿上生长的菌落数小于 300 个。在空白稀释水样瓶(6.2)上标上稀释度数。

7.3.3 用 10 倍稀释法稀释水样,即用 5mL 无菌吸管(6.3)吸取 5mL 水样(7.1.4)注入到 45mL 空白稀释水中充分摇匀,此时稀释度为  $10^{-1}$ 。

7.3.4 另取一支 5mL 无菌吸管吸取 5mL 稀释度为  $10^{-1}$  水样注入到第二个稀释水中,充分摇匀,此时稀释度为  $10^{-2}$ 。依次类推,直至需要的稀释度为止。

7.3.5 将不同稀释度的水样分别接种到无菌培养皿(6.4)中,每个稀释度重复接种 3~5 皿,每皿接种 1mL,接种时左手手撑托住培养皿,大拇指和食指轻轻将培养皿盖提起,使右手中的吸管恰好插入,吸管与培养皿底成  $45^\circ$  角相接,移开吸管时吸管不宜再碰到培养皿,接种时间不宜超过 4s。每接一个稀释度更换一支无菌吸管。

7.3.6 另取一组培养皿不接水样,作为空白。

7.3.7 将灭过菌的培养基(6.1)冷却至  $45 \pm 1^\circ\text{C}$ ,按(7.3.5)掀开培养皿盖,将培养基灌入培养皿内,每皿应灌 15~20mL。灌皿时不要使培养基直接灌在水样上,灌皿后要将融化的培养基和皿中水样彻底混合,小心勿使混合液溅到培养皿的边缘。测定一个水样从接种到灌皿不得超过 20min。

#### 7.4 培养

待培养皿中培养基(7.3.7)固化后,倒置平皿,在生化培养箱中  $29 \pm 1^\circ\text{C}$  培养 72h。

### 8 计数与报告

8.1 培养之后,取出培养皿,若空白培养皿出现菌落,表明测定过程中有污染,本次测定无效。

8.2 选择平均菌落数在 30~300 之间的稀释度,立即进行计数,求得平均菌落数,并修约成二位有效数字(见表例 1)。

8.3 若有二个稀释度,其生长菌落数均在 30~300 之间,则视二者之比值来决定,若其比值小于 2,应报告其平均数;若大于 2 则报告其中较小的数字(见表例 2 及例 3)。

8.4 若所有稀释度的平均菌落数均大于 300,则应选择稀释度最高的培养皿计数(见表例 4)。

8.5 若所有稀释度的平均菌落数均小于 30,则应选择稀释度最低的培养皿计数(见表例 5)。

8.6 若所有稀释度均无菌落生长,则以“小于 1 乘以最低稀释倍数”报告之(见表例 6)。

8.7 若所有稀释度的平均菌落数均不在 30~300 之间,其中一部分大于 300 而另一部分小于 30 时,则选择最接近 30 或 300 的培养皿计数(见表例 7)。

8.8 以个/mL 表示循环冷却水中粘液形成菌的数量(X)按式(2)计算:

$$X = \frac{X_1 \times 1\,000}{F \cdot V_1 \times 1\,000\,000} = \frac{k \cdot X_1 \cdot V}{F \cdot V_3 \times 1\,000} \quad (2)$$

式中:  $X_1$ ——按(8.2)方法计数得出的培养皿上生长的平均菌落数,个;

$V$ ——按(7.1.3)计算的粘泥量, mL/m<sup>3</sup>;

$V_3$ ——按(7.1.4)测定时所取的粘泥体积, mL;

$k$ ——按(7.1.4)测定时,所取粘泥体积( $V_3$ )与粘泥总体积( $V_2$ )之比值;

$F$ ——计数组的样品稀释度数。

例表

例次	稀释度及菌落数			两稀释度菌落数之比	粘液形成菌总数 个/mL	报告方式 个/mL
	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$			
1		164	20	—	16 400	$1.6 \times 10^4$
2	—	295	46	1.6	37 750	$3.8 \times 10^4$
3	—	271	60	2.2	27 100	$2.7 \times 10^4$
4	>6 500	估计 3 475	313	—	313 000	$3.1 \times 10^5$
5	27	11	5	—	270	$2.7 \times 10^2$
6	0	0	0	—	$<1 \times 10$	$<10$
7	—	306	12	—	30 600	$3.1 \times 10^4$

## 9 精密度

9.1 由于微生物能以单独个体,双双成对、链状、成簇或一团团等形式存在,而且没有单独一种培养基能满足一个水样中所有细菌的生理要求。所以,由此法所得的菌落数可能要低于其正常存在的活细胞的数目。

9.2 标准平皿计数的正确度随着平行样皿的增加而增加,当使用 5 个平行皿,每皿加 1mL 样品时测定结果的置信度为 95%。

### 附加说明:

本标准由中华人民共和国化学工业部提出。

本标准由化学工业部天津化工研究院归口。

本标准由南京大学和南京中山水处理公司负责起草。

本标准主要起草人蒋振祥、丁美芳、解正宽、曾昭琪。