

中华人民共和国国家标准

工业循环冷却水中土壤菌群的测定 平皿计数法

GB/T 14643.2—93

Industrial circulating cooling water—Examination of
soil micro-biots—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土壤菌群的测定方法。

本标准适用于工业循环冷却水中土壤菌群的测定,也适用于原水、生活用水及其他水中土壤菌群的测定。

2 引用标准

GB 603 化学试剂 试验方法所用试剂及制品的制备

GB 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 方法提要

本方法采用混合培养基,利用平皿计数技术,在 $29 \pm 1^\circ\text{C}$ 培养 72h,测定循环冷却水中土壤菌群总数。

4 试剂和材料

本试验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:生物试剂;
- 4.2 蛋白胨:生物试剂;
- 4.3 琼脂:生物试剂;
- 4.4 氯化钠(GB 1226);
- 4.5 硝酸钠(GB 636);
- 4.6 磷酸氢二钾(HG 3—1228)
- 4.7 氯化钾(GB 646);
- 4.8 硫酸镁(GB 671);
- 4.9 硫酸亚铁(GB 664);
- 4.10 蔗糖(HG 3—1001);
- 4.11 土壤(果园土、菜园土);
- 4.12 氢氧化钠(GB 629)溶液:40g/L;
- 4.13 乙醇(GB 678)溶液:75%(V/V);
- 4.14 硫代硫酸钠(GB 637);

- 4.15 牛皮纸;
- 4.16 医用脱脂棉;
- 4.17 医用脱脂纱布。

5 仪器和设备

常规微生物实验室设备和:

- 5.1 无菌箱(室)或超净工作台;
- 5.2 蒸汽压力灭菌器;
- 5.3 生化培养箱;
- 5.4 鼓风电热干燥箱:温度可控制在 $60\sim 280\pm 2^{\circ}\text{C}$;
- 5.5 铝锅: $\phi 200\text{mm}$;
- 5.6 搪瓷量杯:1 000mL;
- 5.7 磨口三角瓶:100mL;
- 5.8 培养皿: $\phi 90\text{mm}$;
- 5.9 磨口试剂瓶:1 000mL;
- 5.10 刻度吸管:1mL;
- 5.11 刻度吸管:5mL;
- 5.12 三角瓶:500mL。

6 试验前的准备

6.1 土壤浸出液的制备

称取约 100g 土壤加入 300g 水中,采用蒸汽压力灭菌器在 $121\pm 1^{\circ}\text{C}$ 灭菌 15min,静置 24h 后第二次灭菌,再静置 24h 后进行第三次灭菌。瓶中的上层清液为土壤浸出液。

6.2 培养基的制备

称取下列试剂:

- 牛肉膏:1.5g;
- 蛋白胨:5.0g;
- 氯化钠:2.5g;
- 硝酸钠:2.5g;
- 磷酸氢二钾:0.5g;
- 氯化钾:0.2g;
- 硫酸镁:0.25g;
- 硫酸亚铁:0.005g;
- 蔗糖:20.0g;
- 土壤浸出液:5mL;
- 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,用热水补充至 1 000mL,用氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.0 ± 0.2 ,并分装在 500mL 三角瓶中,每瓶分装量不超过其总量的三分之二。塞上棉塞,用牛皮纸把瓶口包好,用蒸汽压力灭菌器于 $121\pm 1^{\circ}\text{C}$ 灭菌 15min。

6.3 无菌稀释水的制备

6.3.1 生理盐水的配制:称取 8.5g 氯化钠,溶解在 1 000mL 水中,混匀。

6.3.2 将生理盐水(6.3.1)分装在 1 000mL 磨口三角瓶中,每瓶 45mL,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,用蒸汽压力灭菌器于 $121\pm 1^{\circ}\text{C}$ 灭菌

15min。

6.4 刻度吸管的灭菌

6.4.1 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。

6.4.2 每支刻度吸管用一条约40~50mm宽的牛皮纸条,以45°左右角度螺旋形捲起来,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,若干支捆成一束,置电热干燥箱中,于160±2℃灭菌2h。

6.5 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,用牛皮纸捲成一筒,置电热干燥箱中于160±2℃灭菌2h。

6.6 采样瓶的灭菌

将洗净并烘干后的1000mL磨口试剂瓶瓶口和瓶颈用牛皮纸裹好,扎紧,置电热干燥箱于160±2℃灭菌2h。

6.7 硫代硫酸钠灭菌

将硫代硫酸钠放入无菌箱(室)内,并均匀地摊在离紫外线灯30cm处,灭菌30min。

7 测定步骤

7.1 水样的采集

7.1.1 用无菌采样瓶采集被测样品,在采样过程中,要保护瓶口和瓶颈,防止这些部分受杂菌污染。瓶内要留下足够的空间,以备测定之前摇晃。

7.1.2 若采集的水中有余氯,应于采样前在无菌操作下于无菌采样瓶(6.6)中加入灭过菌的硫代硫酸钠(6.7),加入量为每升水样约0.1g。

7.1.3 水样采集后应立即进行测定,如果2h内不能进行测定,应把水样放在冰箱中,于4~10℃保存,保存时间不宜超过24h。经冷冻保存后的水样需测定时,从冰箱中取出于30℃左右活化4~5h,再进行测定。

7.2 无菌箱(室)灭菌

7.2.1 将实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30min。

7.3 水样的稀释和接种

7.3.1 关掉紫外线灯,打开荧光灯,将待测水样放入无菌箱(室)中,立即用75%(V/V)的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条的操作应在无菌箱(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培养皿中生长的菌落数小于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 10^{-1} 水样移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个皿,每皿接种1mL,接种时左手掌托住培养皿,大拇指和食指轻轻将培养皿提起,吸管与培养皿底成45°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。每接种一个稀释度更换1支无菌吸管。

7.3.6 另取一组培养皿不接水样,作为空白。同时操作。

7.3.7 将灭过菌的培养基(6.1)冷却至45±1℃,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,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 表示循环冷却水中土壤菌群的总数含量(X)按下式计算:

$$X = \frac{X_1}{F}$$

式中: X_1 ——按(8.2)方法计数得出的培养皿中长出的平均菌落数,个;
 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	粘泥真菌总数 (个/mL)	报告方式 (个/mL)
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}			
1	—	164	20	—	16 400	1.6×10^4
2	—	295	46	1.6	37 750	3.6×10^4
3	—	271	60	2.2	27 100	2.7×10^4
4	>6 500	3 475	313	—	31 300	3.1×10^5
5	27	11	5	—	270	2.7×10^2
6	0	0	0	—	$<1 \times 10$	<10
7	0	306	12	—	30 600	3.1×10^4

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%。

GB/T 14643.2-93

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市化学工业研究设计院负责起草。

本标准主要起草人曾昭琪、解正宽、王勇、张林群。