

中华人民共和国国家标准

工业循环冷却水中土壤真菌的测定 平皿计数法

GB/T 14643.4—93

Industrial circulating cooling water—Examination of
soil fungi—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真菌的测定方法。

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

2 引用标准

GB 603 化学试剂 试验方法中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

本标准采用土壤真菌培养基,用平皿计数技术,在 $29\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 72h,测定工业循环冷却水中土壤真菌的总数。

4 试剂和材料

本实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 马铃薯:市售新鲜(无芽),去皮后切成约 $20\text{mm}\times 20\text{mm}\times 20\text{mm}$ 小块;
- 4.2 葡萄糖(HG 3—1094);
- 4.3 琼脂:生物试剂;
- 4.4 氯化钠(GB 1266);
- 4.5 乳酸;
- 4.6 乙醇(GB 678):75%(V/V)溶液;
- 4.7 硫代硫酸钠(GB 637);
- 4.8 牛皮纸;
- 4.9 医用脱脂棉;
- 4.10 医用脱脂纱布。

5 仪器和设备

- 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:1 000mL;

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 培养基的制备

称取约 200g 的马铃薯于铝锅中,加水约 1 000mL 在电炉上加热溶解后,趁热用四层医用脱脂纱布过滤到搪瓷量杯中,收集到约 900mL 滤液,滤液搅匀待用。于上述滤液中加入 20.0g 琼脂和 20.0g 葡萄糖,并放在电炉上加热,不断地搅拌,待琼脂完全溶化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,并用乳酸调节 pH 至 4.0 ± 0.1 ,并分装在 500mL 三角瓶中,每瓶分装量不超过其总量的 $2/3$,塞上棉塞,再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。

6.2 无菌稀释水的制备

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

6.2.2 将生理盐水(6.2.1)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。

6.3 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 每支刻度吸管用一条约 40~50mm 宽的牛皮纸条,以 45° 左右角螺旋形卷起来,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,若干支捆成一束,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 采样瓶的灭菌

将洗净并烘干后的 1 000mL 磨口试剂瓶瓶口和瓶颈用牛皮纸裹好,扎紧,置电热干燥箱中于 $160\pm 2^{\circ}\text{C}$ 灭菌 2h。

6.6 硫代硫酸钠的灭菌

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,以备测定前摇动。

7.1.2 若采集的水中有余氯,应在采样前,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

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)上标上稀释倍数。

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 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一支无菌吸管。

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 $45 \pm 1^\circ\text{C}$,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,若空白培养皿中出现菌落,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 若有两个稀释度,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小于 30,则应选择稀释度最低的培养皿计数(见表例 5)。

8.5 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)。

8.6 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)。

8.7 以个/mL 表示循环冷却水中土壤真菌的总数含量(X),按式(1)计算:

$$X = \frac{X_1}{F} \dots\dots\dots (1)$$

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

F ——计数组的样品稀释倍数。

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	—	<1×10	<10
7	—	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%。

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。